



**HAL**  
open science

# Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale et pathologique des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices

Nicolas Hipp

► **To cite this version:**

Nicolas Hipp. Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale et pathologique des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices. Immunologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B024 . tel-03701333

**HAL Id: tel-03701333**

**<https://theses.hal.science/tel-03701333>**

Submitted on 22 Jun 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : Immunologie

Par

**Nicolas Hipp**

## **Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale et pathologique des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices**

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 21 Juin 2019

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

Thèse N° :

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Marion Espéli Chargée de recherche, Inserm U1160 /  
Pierre Milpied Chargé de Recherche, Centre Immunologie Marseille-luminy

### **Composition du Jury :**

Président :	Prénom Nom	Fonction et établissement d'exercice (9) ( <i>à préciser après la soutenance</i> )
Examineurs :	Sandra Weller	Chargée de recherche, Université Paris Descartes
	Karin Tarte	PU-PH, Université de Rennes1
	Olivier Decaux	PU-PH, Université de Rennes1
	Thierry Fest	PU-PH, Université de Rennes1
	Xavier Leleu	PU-PH CHU de Poitiers
Dir. de thèse :	Céline Delaloy	Chargée de recherche, Université de Rennes1

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Immunologie*

**Ecole doctorale Biologie-Santé**

présentée par

**Nicolas Hipp**

Préparée à l'unité de recherche Inserm U1236

Microenvironnement, Cell differentiation, iMmunology And Cancer

UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Dynamique  
transcriptionnelle de  
la différenciation  
normale et  
pathologique des  
lymphocytes B naïfs  
en cellules effectrices**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 21 juin 2019**

devant le jury composé de :

**Marion Espéli**

Chargée de recherche, Inserm U1160 / rapporteur

**Pierre Milpied**

Chargé de Recherche, Centre Immunologie  
Marseille-luminii / rapporteur

**Karin Tarte**

PU-PH, Université de Rennes1 / examinateur

**Sandra Weller**

Chargée de recherche, Université Paris Descartes /  
examinateur

**Olivier Decaux**

PU-PH, Université de Rennes1 / examinateur

**Xavier Leleu**

PU-PH CHU de Poitiers / examinateur

**Thierry Fest**

PU-PH, Université de Rennes1 / examinateur

**Céline Delaloy**

Chargée de recherche, Université de Rennes1 /  
*Directrice de thèse*

## Remerciements (sortez les violons)

Il paraît qu'une bonne thèse se termine toujours par une embrouille avec son directeur de thèse. Si cela est vrai, je suis heureux d'avoir effectué une thèse banale. Mes premiers remerciements vont vers toi Céline, je ne saurais par où commencer pour décrire l'admiration que je te porte. Merci pour ton implication scientifique, ta gentillesse et ta bienveillance qui ont rendu cette aventure aussi géniale.

Je tiens à remercier le Dr Marion Espéli et le Dr Pierre Milpied d'avoir accepté de rapporter ce travail. La justesse des commentaires ont permis d'améliorer grandement la qualité du manuscrit. Merci aux Dr Sandra Weller, Pr Olivier Decaux, Pr Xavier Leleu d'avoir accepté d'examiner ce travail. Votre expertise dans vos domaines respectifs promet une discussion très intéressante lors de la soutenance.

Merci au Pr Thierry Fest d'avoir accepté d'examiner ce travail, mais aussi pour l'ensemble de ces 4 années de thèse où les réunions avec l'ensemble du groupe auront permis des échanges constructifs sur l'avancée des différents projets.

Merci au Pr Karin Tarte pour l'examen de ce rapport, mais plus généralement encore pour ton engagement dans la direction du laboratoire. Tout le travail que tu effectues nous permet d'évoluer dans un environnement plus qu'adéquate pour le développement scientifique.

J'aimerais ensuite remercier la fine équipe des thésards du labo pour l'ensemble des bons moments qu'on a passé dans le bureau et en bas de la rue de Brest.

Hannah, merci de m'avoir accueilli au début de mon M2 et pour l'ensemble du travail que tu as effectué et merci à Shubham pour ta bonne humeur et tes conseils. Audrey, heureusement que le chevauchement de nos thèses n'a pas été plus long, mon foie serait décédé, félicitations pour l'ensemble de ta thèse et merci pour les conseils avisés de dernière année ! Merci à Marvin de nous montrer qu'il est possible de manipuler avant 7h du matin, d'aller au sport le midi, et d'avoir encore la force de faire des blagues à longueur de journée. Léa, tu es l'une des thésardes les plus créatives que j'ai vu, capable de fabriquer une guillotine à amygdale et de travailler sur des sujets totalement exotiques dans la même journée, merci pour ta fraîcheur d'esprit. Kathleen, notre bébé thésard, la relève des jeux de mots pourris du bureau, la première candidate de The Voice du bureau, merci pour ta bonne humeur et ne t'inquiète pas au boulot, ta capacité de travail fait que tout ira bien pour la fin de ta thèse ! Jugjug, la

deuxième candidate de The Voice du bureau, merci pour ta bonne humeur, j'attends avec impatience l'avancée de ta thèse ! Merci aussi à toi Amandine de m'avoir toujours proposé ton aide, d'avoir éteint, fermé, vérifié tous les trucs que j'avais oublié en 4 ans (et y'en a eu 😊). Merci à l'équipe médicale du bureau, Claire et Juliette pour votre humeur toujours au top, tous les conseils (!!!), votre sélection d'anecdotes médicales qui contribuent à l'ambiance du bureau.

Impossible d'oublier les membres du bureau caché au fond de la bio-mol sans qui ce labo tournerait au ralenti ! Merci Yo (le MacGyver du labo) pour tes phrases magiques toujours placées au bon moment, Rachou pour tous tes conseils de culture et ta (méga) bonne humeur. Lolo, merci pour l'ensemble de ton œuvre, pour ces moments passés au trieur à raconter des blagues et aussi d'être là même le samedi matin pour calmer l'Aria quand il s'énerve ! Merci à Céline N pour ta bonne humeur et ta disponibilité pour gérer l'arrivée des échantillons. Céline M merci pour ta bienveillance et d'avoir été disponible pour participer à l'ensemble des manipes de bio-mol pas toujours marrante qu'on a fait. Enfin Marion, le capitaine, merci pour toute ces crises de rigolades, je me souviendrai longtemps de l'après-midi passer au cryostat...

Je profite aussi de ces quelques lignes pour remercier l'ensemble du bureau des cell. Le Dr Fredédouch Mourcin pour tes Mourcinades qui mériteraient un ouvrage et tes conseils scientifiques, ma maman du laboratoire Gersende Lacombe pour les répliques Kamelonnese et ton statut de Reine de la cytométrie. David Roulois pour les parties du jeu de la vache, ta bonne humeur et aussi cette force que tu as de promouvoir cette science obscure qu'est l'épigénétique.... et comme je sais que t'adores ça, encore félicitations pour tes publications dans Cell et Nature 😊. Merci à Kyriaky pour ta bonne humeur mais aussi de nous rappeler que le soleil existe en Grèce contrairement à notre cher pays. Une pensée pour Radadouille qui à coup de « Tu préfères » et de « Sarah Connors » aura bien animé les pauses déjeuner.

Merci aussi à l'ensemble de la team bioinfo de l'unité à qui j'ai posé bon nombre de questions et qui s'attache à faire régner l'ordre sur le cluster ! Merci Delphine, Vonick, Fabrice et Simon. Vos conseils m'ont été précieux pour évoluer dans « la matrice » comme l'appelle mes co-thésards.

Patricia merci de mettre dans le labo ta bonne humeur et pour l'ensemble de tes conseils ! Je ne suis pas près d'oublier la soirée de ton départ chez les anglais ! Merci Elise, Steph, Fabienne d'être toujours souriant !! Merci aussi à toi Céline B pour ta gentillesse au quotidien et aussi

pour tout le travail que tu fais chaque jour pour nous faciliter la vie ! Merci aussi à l'ensemble du SITI, Princesse Nadège, Joëlle, Maelle, Isabelle, Séverine, Miceal, Cédric P, Cédric M, Erwann, Céline P, Jéjé, Thomas, pour votre bienveillance et pour avoir toujours été présents pour apporter votre aide.

Merci à l'ensemble des étudiants qui sont passés dans le labo, notamment Marion (merci pour les photos de moelle), Steeve, Ryan, Brice, William et tous les anciens qui ont apporté leur bonne humeur !

Merci à toi Simon le recordman officiel du nombre de desserts ingurgités, qui malgré la fatigue souris toujours et travailles pour 15. Ne change rien, on a bien rigolé. Enfin Mumu, je ne sais même pas comment te remercier pour ta gentillesse au cours de ces 4 années, pour ton aide, et toute les discussions (merci +++++ ça vaut bien un check truite).

Enfin je voudrais exprimer tout mon amour à l'ensemble de ma famille et mes proches en dehors du labo qui assure un soutien sans faille à tout ce que j'entreprends. Merci à ma maman, mon frère, Marie d'avoir toujours veillé sur moi et de m'avoir soutenu dans ces aventures, et pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci à la famille Rolland et plus particulièrement à l'ainé des 5 frères de toujours s'intéresser à nos projets, et de nous offrir des sacrés moments de détente le week-end. Merci à toi Laëtitia pour tout ce que tu fais pour nous, Marie pour ta joie de vivre, et finalement l'ensemble de la famille Boussicaud pour tous ces bons moments partagés qui sont autant de bons souvenirs.

Merci à Arnaud, Vincent, Marion, Nono, Manu (et Jeanne), Arnaud, Marine, Marc, Marie, les Cagoles, et toutes ces personnes oubliées avec qui nous passons d'excellents moments.

Merci Émilie de partager ma vie, de ton soutien essentiel tous les jours, de supporter mon caractère et d'avoir mis au monde la plus belle petiote de tous les temps. Comme dirait l'autre « ça fait 7 ans qu'on sort ensemble depuis 2 semaines ».

Ps : Si j'ai un conseil pour les thésards, adoptez un chien ça vous aérera l'esprit et vous prendrez du recul sur vos manipes en le promenant ! Merci mon Badou.

<Insérer ici une citation>

## **TABLE DES MATIERES**



<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>10</b>
<b>L'émergence des cellules B naïves circulantes</b> .....	<b>11</b>
<b>Chapitre 1 : Activation de la cellule B</b> .....	<b>19</b>
<b>I- Localisation de l'activation des lymphocytes B</b> .....	<b>19</b>
A- Les ganglions lymphatiques.....	20
B- La rate.....	21
C- Les organes lymphoïdes associés aux muqueuses.....	22
<b>II- Les acteurs de la présentation de l'antigène</b> .....	<b>22</b>
A- La cellule folliculaire dendritique.....	22
B- Le macrophage.....	24
C- La cellule dendritique.....	25
D- Le lymphocyte B.....	26
E- La diffusion passive des antigènes.....	26
<b>III- Natures et forces d'activation</b> .....	<b>27</b>
A- Le récepteur des cellules B.....	27
B- Renforcement de l'activation B par les Toll Like Receptors.....	31
<b>IV- La synapse avec le lymphocyte T</b> .....	<b>32</b>
A- Interactions physiques.....	33
B- Les messagers solubles.....	39
<b>Chapitre 2 : Vers une cellule productrice d'anticorps</b> .....	<b>46</b>
<b>I- La régulation transcriptionnelle</b> .....	<b>47</b>
A- Les acteurs de l'identité B.....	47
B- Les acteurs de l'identité plasmocytaire.....	55
<b>II- La différenciation extrafolliculaire</b> .....	<b>60</b>
A- Différenciation T indépendante.....	60
B- La différenciation T dépendante.....	65
<b>III- La réponse du centre germinatif</b> .....	<b>67</b>
A- Mise en place du centre germinatif.....	68
B- La zone sombre.....	68
C- Passage dans la zone claire.....	71
D- La zone claire.....	72
E- Sortie du centre germinatif.....	80
<b>IV- La niche médullaire des PC</b> .....	<b>82</b>
<b>Chapitre 3 : La pathologie de Waldenström</b> .....	<b>87</b>
<b>I- Caractéristiques générales de la maladie</b> .....	<b>87</b>
A- Origines de la maladie.....	88
B- Prédispositions génétiques – Cas Familiaux.....	91
<b>II- Les facteurs génétiques associés à cette pathologie</b> .....	<b>92</b>
A- Myeloid differentiation primary response 88.....	93
B- C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR-4).....	96
C- AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A).....	97
<b>III- Les composants cellulaires de cette pathologie</b> .....	<b>98</b>
A- Le compartiment médullaire.....	98
B- Les cellules du micro-environnement.....	99

C-	Le compartiment sanguin.....	103
<b>IV-</b>	<b>La pathologie de WM : L'hypothèse d'une différenciation avortée.....</b>	<b>103</b>
A-	La différenciation avortée .....	103
B-	Rôles de BACH2 dans la lymphomagénèse.....	105
	<b>Objectifs .....</b>	<b>108</b>
	<b>Résultats.....</b>	<b>111</b>
	Projet 1 : IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. ....	111
	Projet 2 : Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices.....	148
	Projet 3 : Étude de la différenciation <i>in vitro</i> des cellules circulantes des patients atteints de la pathologie de Waldenström .....	171
	<b>Discussion Expérimentale - Technologique.....</b>	<b>188</b>
	<b>Discussion-Perspectives.....</b>	<b>194</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>205</b>

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

## Liste des illustrations

Tableau 1 : Tableau comparatif des phénotypes des sous populations B présentes dans le compartiment périphérique.

Figure 1 : Différenciation terminale T dépendante d'un lymphocyte B.

Figure 2 : Réseau de gènes gouvernant l'identité lymphocytaire B.

Figure 3 : Représentation schématique d'un ganglion.

Figure 4 : Acquisition d'icosome présenté par la FDC au LB.

Figure 5 : Mécanismes de transduction et de régulation du signal BCR.

Figure 6 : Modèles proposés du renforcement de l'activation par les TLR

Figure 7 : Interaction entre le pre-GC LTFH et le LB activé.

Figure 8 : Internalisation du BCR et présentation du peptide antigénique au LT preLTFH

Figure 9 : Activation des voies JAK/STAT par les cytokines de type I

Figure 10 : Réponse T indépendante par les LB de la zone marginale

Figure 11 : Orientation de la différenciation T dépendante

Figure 12 : Mise en place du centre germinatif

Figure 13 : Mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN suite à l'action d'AID

Figure 14 : Dynamique au sein du centre germinatif

Figure 15 : Exemple de mécanisme de commutation de classe d'une IgM vers une IgA

Figure 16 : Contrôle du cycle cellulaire des centroblastes par les signaux trophiques du dialogue LB/LT

Figure 17 : Évolution clonale des centres germinatifs.

Figure 18 : Organisation des domaines de *MYD88*.

Figure 19 : Voies de signalisations sous-jacentes à *MYD88* et *CXCR4* dans la pathologie de Waldenström

Figure 20 : Illustration de l'infiltrat médullaire chez les patients atteint de la maladie de Waldenström.

Figure 21 : Microenvironnement médullaire du clone tumoral dans la maladie de Waldenström

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

## Liste des abréviations

**AA:** Acide Aminé

**ABCB1:** ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**AID:** Activation-induced cytidine deaminase

**AP-1:** Activator Protein 1

**APRIL:** Proliferation-inducing ligand

**ARNm:** acide ribonucléique messenger

### B

**BACH2:** BTB and CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper transcription factor 2

**BAFF-R:** B cell-activating factor receptor

**BAFF:** B cell-activating factor

**BCL-2:** B cell lymphoma 2

**BCL-6:** B cell lymphoma 6

**BCR:** B Cell Receptor

**BER:** Base excision repair

**BLNK:** B-cell linker protein

**BMSC:** Bone Marrow Stromal Cell

**BTK:** Bruton's tyrosine kinase

### C

**CB:** Centroblaste

**CC:** Centrocyte

**CCL:** Chemokine (C-C motif) ligand

**CD:** Cluster of Differentiation

**CD40L:** Cluster Of Differentiation Ligand

**CFSE:** Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

**ChIP:** Chromatin Immuno Precipitation

**cKO:** Conditional KnockOut

**CMHII:** Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

**CPA:** Cellule Presentative d'Antigène

**CRC:** Cxcl12-expressing reticular cells

**CSR:** Class Switch Recombination

**CXCL:** C-X-C motif chemokine

**CXCR:** CXC-chemokine receptor

### D

**DAG:** diacylglycerol

**DAMPs:** Damage-associated molecular pattern

**DC-SIGN:** Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

**DC:** Dendritic Cell

**DLBCL:** Diffuse-Large B Cell Lymphoma

**DZ :** Dark Zone

### E

**ETS :** E26-Transformation-Specific family

**EAT-2:** Ewing's sarcoma-associated transcript 2

**EICE:** Interferon Composite Element

**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay

**ERK:** Extracellular signal-regulated kinases

**ERT:** EAT-2-related transducer

**ETS:** Like-1 protein Elk-1

### F

**FC:** Fragment Constant

**FDC:** Follicular Dendritic Cell

**FRC:** Follicular Reticular Cells

**FRET:** Förster resonance energy transfer ou FRET,

### G

**GC:** Germinal Center

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**Grb2:** Growth factor receptor-bound protein 2

### H

**HDAC:** histones déacétylases

**HEV:** High Endothelial Venules

### I

**ICAM:** intracellular adhesion molecule 1

**ICOS:** Inducible T-cell costimulator

**ICOSL:** Inducible T-cell costimulator Ligand

**ID2:** DNA-binding protein inhibitor 2

**Ig:** Immunoglobuline

**IGH:** Immunoglobulin Heavy chain

**IL:** Interleukine

**IRF4:** Interferon regulatory factor

**IP3**: Inositol trisphosphate  
**ISRE**: interferon-stimulated response element  
**ITAM**: immunoreceptor tyrosine- based activation motif  
**ITIM**: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif  
**ITSM**: immunoreceptor tyrosine-based switch motif

## J

**JAK**: Janus kinases  
**JNK**: c-Jun N-terminal kinases  
**Kb**: kilobase  
**KO**: KnockOut  
**LB**: Lymphocyte B

## L

**LCMV**: Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus  
**LFA-1**: Lymphocyte Function- Associated Antigen 1  
**LPS**: Lipopolysaccharide  
**LTFH**: Lymphocyte T Follicular Helper  
**LTfr**: Lymphocyte T régulateur  
**LTH**: Lymphocyte T Helper  
**LTreg**: Lymphocyte T régulateurs  
**LZ**: Light Zone

## M

**MALT**: Mucosa Associated Lymphoid Tissue  
**MAPK**: Mitogen-activated protein kinases  
**MARCO**: macrophage receptor with collagenous  
**mlg**: Immunoglobuline de membrane  
**MIIC**: Multilaminar class II compartment  
**MICI**: Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
**MTOC**: Microtubule Organizing Center  
**mTOR**: mammalian Target Of Rapalycin  
**Myd88**: myeloid differentiation primary response 88,  
**MZ**: Marginal Zone

## N

**NET**:(Neutrophil Extracellular Traps),

**NFKB**: nuclear factor-kappa B  
**NP-KLH**: 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl hapten-Keyhole Limpet Hemocyanin

## O

**OBF1**: OCT-Binding Factor 1  
**OLS**: Organe Lymphoïde Secondaire  
**OVA**: Ovalbumine  
**p53**: Tumor protein 53, TP53 ou p53 Paired box protein 5 Pax5  
**PALS**: periarteriolar lymphoid sheath  
**PAMPs**: Pathogen Associated Molecular Patterns  
**PC**: Plasmocyte  
**PD1**: programmed cell death protein 1  
**PE**: phycoerythrine  
**PI(4,5)P2** : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PI3K**: phosphoinositide 3-kinase  
**PLCY2**: 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2  
**PRDM1**: PR domain zinc finger protein 1

## R

**RE**: Reticulum Endoplasmique  
**RNAseq**: RNA sequencing

## S

**S1P**: sphingosine 1-phosphate  
**SAP**: (SLAM)-associated protein  
**SCID**: syndrome sévère combiné d'immunodéficience  
**SCS**: Subcapsular Sinus  
**SHM**: Somatic hypermutation  
**SLAM**: Signaling lymphocytic activation molecule  
**Socs**: suppressor cytokine signaling  
**SPADE**: Sequential PAttern Discovery using Equivalence classes  
**SRBC**: Sheep Red Blood Cells  
**STAT**: Signal Transducer and Activator of Transcription proteins  
**Syk**: spleen tyrosine kinase

## T

**T1-2-3**: Transitionnel (1-2-3)  
**TF**: Transcription Factor

**TI-1 , TI-2** antigène T Indépendant  
**TIRF**: total internal reflection  
fluorescence microscopy  
**TLR**: Toll Like Receptor  
**TNFR**: tumor necrosis factor receptor  
**TRAFs**: TNF receptor associated factors  
**TRC**: T-zone Reticular Cells  
**TRIF**: Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-  
domain-containing adaptor inducing  
interferon- $\beta$

## **U**

**UNG**: uracile-ADN glycosylase  
**UPR**: Unfolding protein response

## **V**

**VCAM**: vascular cell adhesion molecule 1  
**VLA-4**: Very Late Antigen 4

## **W**

**WT**: Wild Type

## **X**

**XBP1**: X-Box Binding Protein 1



## **INTRODUCTION**

## Introduction

Le système immunitaire a pour fonction de protéger l'organisme des lésions causées par l'invasion de microorganismes. Cette fonction défensive est assurée notamment par les lymphocytes et des cellules accessoires qui de façon coordonnée interagissent les uns avec les autres afin d'organiser une réponse immune coordonnée. La perturbation de cette réponse est à l'origine de nombreuses pathologies, immunodéficiences, maladies auto-immunes et cancers.

Les lymphocytes sont les cellules centrales du système immunitaire. Ils reconnaissent spécifiquement les éléments étrangers. Les immunoglobulines, présentes à la surface des lymphocytes B (LB), ont la fonction de récepteur pour l'antigène, permettant aux LB de répondre aux stimuli antigéniques en se différenciant sous le contrôle de signaux cellulaires apportés par le microenvironnement : partenaires cellulaires et molécules diffusibles. Cette différenciation terminale des LB se traduit par une spécialisation des cellules nécessaire à l'immunité adaptative, aboutissant à la production de cellules immunitaires mémoires, les LB mémoires, ainsi que des plasmocytes (PC), cellules sécrétrices d'anticorps, les molécules effectrices de la réponse humorale.

Les objectifs de ma thèse s'inscrivent dans le travail de compréhension des processus physiologiques engageant le lymphocyte B vers la différenciation plasmocytaire : mécanismes intrinsèques et mécanismes résultant de l'interaction du LB avec son microenvironnement, pour tester leurs implications dans les processus de lymphomagenèse. La littérature est riche d'études déterminant les rôles de différents facteurs trophiques orientant le LB vers la voie de la différenciation terminale. Ce manuscrit s'attachera à décrire les principaux mécanismes influençant la différenciation terminale de la cellule B. Nous aurons un regard plus attentif dans le premier chapitre sur les mécanismes d'activation de la cellule B et les signaux délivrés par la cellule T (LT) marquant les phases précoces d'une différenciation T dépendante. Le deuxième chapitre sera focalisé sur les connaissances actuelles de la régulation transcriptionnelle gouvernant la différenciation terminale des LB, ainsi que les différentes voies possibles menant à la production des cellules effectrices. Enfin, le chapitre 3 sera consacré à l'état des connaissances sur la différenciation plasmocytaire avortée à l'origine de la maladie de Waldenström. Cette revue de la littérature permettra d'introduire les différentes études menées au cours de cette thèse.

En effet, la première partie de mon projet de thèse s'est attaché à comprendre les mécanismes sous-jacents à l'intégration, par le LB activé, de l'interleukine 2 (IL-2), cytokine sécrétée par les LT et dont le rôle dans le devenir du LB a été peu étudié. Les résultats obtenus et publiés seront présentés dans la première section des résultats. Ils mettent en avant la contribution du facteur de transcription BACH2 dans le destin cellulaire du LB.

J'ai ensuite étudié la dynamique transcriptionnelle du processus de différenciation plasmocytaire, décrivant la modulation de l'expression des gènes du LB naif humain au cours des stades intermédiaires de différenciation jusqu'à la cellule sécrétrice d'anticorps. Les résultats seront présentés dans la deuxième section des résultats. Une nouvelle vision de la contribution du facteur de transcription BACH2 dans les stades intermédiaires de différenciation est proposée.

Le versant pathologique de la différenciation plasmocytaire avortée à l'origine de la maladie de Waldenstrom a été l'objet d'un second questionnement au cours de ma thèse. Les résultats préliminaires et obtenus très récemment sont présentés dans la troisième partie des résultats

## L'émergence des cellules B naïves circulantes

Le LB qui va subir la différenciation terminale est un LB naïf présent dans la circulation sanguine. Ce LB naïf est issu d'une longue sélection débutée dans la moelle osseuse, lieux de l'hématopoïèse chez l'adulte. Cette différenciation médullaire précoce menant un progéniteur lymphoïde commun vers un LB immature est caractérisée par l'expression d'un récepteur des cellules B (B-Cell Receptor BCR) fonctionnel et en grande partie non auto-réactif<sup>1,2</sup>.

Néanmoins, la sélection des clones non auto-réactifs dans la moelle, aussi appelée tolérance centrale, est un mécanisme imparfait puisque 40% des LB transitionnels exportés de la moelle possèdent une auto-réactivité<sup>3</sup>. Cette efficacité faible peut s'expliquer par de nombreux phénomènes dont l'absence d'expression, ou de rencontre avec des antigènes présents dans les tissus périphériques par exemple.

Malgré tout l'export des cellules B sélectionnées dans la moelle reste un processus finement régulé. La littérature décrit un phénomène d'export actif contrôlé par une collaboration étroite entre les cellules du micro-environnement (cellules stromales, ostéoblastes, cellules endothéliales et les cellules péri-vasculaires) et les cellules B contrôlant l'émergence des

cellules dans la circulation sanguine. La liste de ces collaborations est vaste, parmi les plus étudiées se trouve l'axe de communication CXCL12/CXCR4 (C-X-C motif chemokine 12 /C-X-C chemokine receptor type 4). Ce couple de messenger/récepteur a été décrit dans de nombreuses lignées hématopoïétiques comme participant au confinement des cellules dans la moelle osseuse. Dans le cadre de la différenciation lymphocytaire B, en utilisant un modèle de souris CXCR4<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>Cre/+</sup>, (Cluster of Differentiation CD), Nie et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'expression du récepteur par les cellules précurseurs de la lignée B permettait d'éviter la sortie précoce de ces progéniteurs immatures <sup>4</sup>.

Par la suite, Beck et ses collaborateurs, en utilisant un antagoniste de CXCR4, ont confirmé ces observations. L'étude a ainsi démontré que lors de la sélection négative des clones B, les cellules présentant une activité BCR en réponse à un auto-antigène maintenaient une expression forte de CXCR4. Cette expression forte, induisant une expression de l'intégrine alpha 4 Béta 1, permet aux cellules de rester liées aux cellules stromales VCAM-1+. En présence de l'antagoniste de CXCR4 les cellules B sont retrouvées en plus grand nombre dans le sang périphérique.<sup>5</sup>

Parallèlement à ce grand axe de communication, d'autres études ont démontré que la famille des récepteurs S1P (Sphingosine-1-phosphate receptor) pouvait être impliquée dans la mobilité des cellules B de la moelle et participer à la régulation de l'export de ces cellules de la moelle. Pour n'en citer qu'une, l'étude menée par le groupe de Cyster a démontré que des souris invalidées pour S1P1 spécifiquement dans la lignée B possédaient une répartition des cellules B anormale entre le parenchyme et les sinus médullaires, défavorisant ainsi l'export de ces cellules dans la circulation sanguine<sup>6</sup>.

Ainsi, la sortie de la moelle est un processus finement régulé qui aboutira à l'export de LB immatures, sélectionnés comme non auto-réactifs, par les sinus médullaires vers la circulation sanguine.

De nombreuses études chez la souris ont décrit les stades de maturation de LB immatures en cellule B naïves matures. Malheureusement, de nombreux marqueurs discriminants chez la souris n'ont pu être extrapolés à l'homme (Tableau 1).

Table 1. Phenotypic features of human and murine peripheral B-cell subsets.		
B-cell subset	Phenotype	
	Murine B cells	Human B cells
Transitional 1	B220 <sup>+</sup> AA4.1 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD21 <sup>lo</sup> CD23 <sup>lo/hi</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>lo</sup>	CD10 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>lo</sup> CD27 <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> CD5 <sup>hi</sup> CD9 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD21 <sup>lo</sup> CD44 <sup>lo</sup> CD23 <sup>lo</sup> Bcl-2 <sup>lo</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>lo</sup> TACI <sup>-</sup>
Transitional 2	B220 <sup>+</sup> AA4.1 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD23 <sup>hi</sup> IgM <sup>hi</sup> IgD <sup>hi</sup>	CD10 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> CD5 <sup>hi</sup> CD9 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD44 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> Bcl-2 <sup>lo</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>hi</sup> TACI <sup>-</sup>
Transitional 3 (human 'pre-naive' CD5 <sup>+</sup> )	B220 <sup>+</sup> AA4.1 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup> IgM <sup>lo</sup>	CD5 <sup>hi</sup> CD9 <sup>lo</sup> CD10 <sup>-</sup> CD23 <sup>+</sup> CD24 <sup>int</sup> CD38 <sup>int</sup> IgD <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>hi</sup> TACI <sup>-</sup>
Naive	B220 <sup>+</sup> IgD <sup>hi</sup> IgM <sup>lo</sup> CD21 <sup>lo</sup> CD23 <sup>hi</sup> MHC class II <sup>+</sup>	CD10 <sup>-</sup> CD20 <sup>+</sup> IgM <sup>lo</sup> IgD <sup>hi</sup> CD27 <sup>-</sup> CD5 <sup>lo</sup> CD9 <sup>lo</sup> CD24 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD39 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD44 <sup>+</sup> CD23 <sup>++</sup> CD77 <sup>-</sup> CD80 <sup>-</sup> CD86 <sup>-</sup> CD95 <sup>-</sup> Bcl-2 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>hi</sup> TACI <sup>-</sup>
Germinal center	B220 <sup>+</sup> CD95 <sup>hi</sup> GL-7 <sup>+</sup> CD38 <sup>+/+</sup> MHC class II <sup>+</sup>	CD10 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> Ig <sup>lo</sup> CD23 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD39 <sup>-</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD44 <sup>+/+</sup> CD23 <sup>++</sup> CD40 <sup>+</sup> CD77 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> Bcl-2 <sup>-</sup> CXCR4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> MHC class II <sup>+</sup> TACI <sup>+/+</sup> BCMA <sup>+</sup>
Memory	B220 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> CD73 <sup>+</sup> CD62L <sup>hi</sup> MHC class II <sup>+</sup>	CD10 <sup>-</sup> CD20 <sup>+</sup> IgM/G/A <sup>+</sup> IgD <sup>lo</sup> CD27 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD38 <sup>lo</sup> CD21 <sup>hi</sup> CD44 <sup>+</sup> CD23 <sup>lo/hi</sup> CD77 <sup>-</sup> CD39 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> Bcl-2 <sup>hi</sup> CXCR4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>lo</sup> TACI <sup>+</sup> BCMA <sup>-</sup>
Plasma cell	B220 <sup>lo/-</sup> CD138 <sup>++</sup> CD19 <sup>lo/-</sup> B220 <sup>lo/-</sup> MHC class II <sup>-</sup> CD38 <sup>+/+</sup> CD43 <sup>-</sup> CXCR5 <sup>-</sup> CXCR4 <sup>+</sup> BCMA <sup>+</sup>	CD10 <sup>-</sup> CD20 <sup>lo</sup> sIg <sup>lo</sup> dIg <sup>hi</sup> CD9 <sup>hi</sup> CD21 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> CD27 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD39 <sup>hi</sup> CD40 <sup>+</sup> CD21 <sup>lo</sup> CD44 <sup>+</sup> CD23 <sup>-</sup> CD77 <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> CD138 <sup>+/+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> MHC class II <sup>+</sup> BAFF-R <sup>lo/-</sup> BCMA <sup>+/+</sup>

BAFF-R: B-cell-activating factor receptor; Bcl: B-cell lymphoma; BCMA: B-cell maturation antigen; CCR: C-C chemokine receptor; CXCR: C-X-C chemokine receptor; TACI: transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor.  
Phenotype of human and murine B cells was derived from references [16,19,23,54,56,61-63,97-103].

**Tableau 1 : Tableau comparatif des phénotypes des sous populations B présentes dans le compartiment périphérique (Suryani et Tangye 2010<sup>7</sup>)**

Chez l'homme, ces stades transitoires du développement B ont pu être mis en évidence chez des patients ayant subi une délétion complète de la lignée B après traitement au rituximab par exemple <sup>8</sup>. Ainsi chez l'homme, 3 principaux stades ont été décrits (Transitionnel 1, T2, T3 ou cellules pré-naïves). Les cellules T1 émergentes de la moelle vont, via la circulation sanguine, rejoindre la rate et coloniser les gaines lymphoïdes periarteriolaires (periarteriolar lymphoid sheath ; PALS). La réactivité de leurs BCR va y être testée contre les antigènes du soi. Wardemann et ses collaborateurs ont mis en évidence que cette étape de tolérance périphérique diminuait fortement le taux de LB auto-réactifs, sans pour autant qu'il devienne nul<sup>3</sup> (passant de 40% à 20%, déterminé par test ELISA dirigé contre un lysat protéique de cellules HEP-2). (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA)

Trois mécanismes majoritaires ont été mis en évidence permettant de contrôler la maturation des LB à cette étape : la délétion clonale, l'édition du récepteur des cellules B et l'anergie. La délétion clonale correspond à une mort de la cellule non sélectionnée, il a été démontré que la cellule transitionnelle possédait une expression plus faible de la protéine anti-apoptotique BCL-2 et qu'elle était donc plus prône à mourir par apoptose si elle n'est pas sélectionnée pour

maturer<sup>9</sup>. Couplé à cette prédisposition à la mort, le signal BCR chez ces cellules est moins efficace dans sa fonction anti-apoptotique<sup>10</sup>. La révision du récepteur (mécanisme similaire à l'édition du récepteur se déroulant au stade Pré-B dans la moelle), va permettre de « sauver » de la mort certains clones auto-réactifs par modification de la séquence de la chaîne légère du BCR (illustré dans <sup>11</sup>). Enfin, l'anergie des cellules B concerne des cellules potentiellement auto-réactives. Ces cellules entrent dans un état d'insensibilité à la stimulation BCR, malgré la liaison possible à l'antigène. Elles vont par la suite réprimer l'expression de l'immunoglobuline M (IgM) de membrane. Des études relatent qu'elles sont néanmoins sensibles *in vitro* à des signaux mimant l'aide apportée par la cellule T CD4 comme le CD40L (Cluster of Differentiation 40 Ligand) ou l'interleukine-4 (IL-4)<sup>12,13</sup>. Ces mécanismes ont été mis en évidence grâce à des modèles murins ingénieux dans les années 1990, notamment ceux développés par l'équipe de C.C. Goodnow <sup>14</sup>. Par manipulation génétique, ces chercheurs ont fait exprimer la protéine HEL de manière constitutive par les cellules de la souris, ainsi qu'un BCR réactionnel pour cette protéine par les cellules B (HEL+). Ainsi, ils ont mis en évidence que les LB HEL+ émigrants de la moelle subissaient une délétion clonale et la souris était déclarée tolérante à la protéine HEL<sup>15</sup>.

Par la suite, il a été décrit que la signalisation BCR est nécessaire à la maturation des LB. Certaines publications relatent la nécessité d'un signal tonique du BCR (ligand-indépendant) permettant la progression des cellules B transitionnelles vers un stade mature<sup>16</sup>. En utilisant un élégant modèle de BCR transgénique étant incapable de lier un substrat extra-cellulaire, mais avec des domaines intra-cellulaires intacts, cette nécessité d'une signalisation tonique a été démontrée permettant la progression des cellules immatures vers le contingent mature. La majeure partie des études sur ce sujet concerne des BCR entièrement fonctionnels avec liaison à l'antigène. En utilisant des souris déficientes pour la signalisation BCR (Syk<sup>-/-</sup>, CD45<sup>-/-</sup>, Btk<sup>-/-</sup>...), les auteurs ont observé un arrêt du développement B avant l'apparition des cellules B matures circulantes<sup>17,18</sup>. Outre l'aspect qualitatif de la signalisation BCR, un aspect quantitatif de cette signalisation a été mise en évidence pour que la cellule B progresse dans la maturation. La force du signal BCR peut être évaluée à la capacité de regroupement de ces récepteurs. Comme développé plus tard dans ce manuscrit, plus le nombre de récepteurs regroupés à la surface de la cellule est grand, plus la signalisation sera importante. Dans le cas où moins de 5% des BCR de la cellule se regroupe lors de la stimulation par l'auto-antigène, le

LB survit. Si le regroupement des BCR concerne entre 5 et 45% des BCR, la cellule s'oriente vers l'anergie. Enfin, les cellules ayant une réponse BCR plus forte que les deux conditions précédentes vont subir une délétion clonale<sup>19,20</sup>.

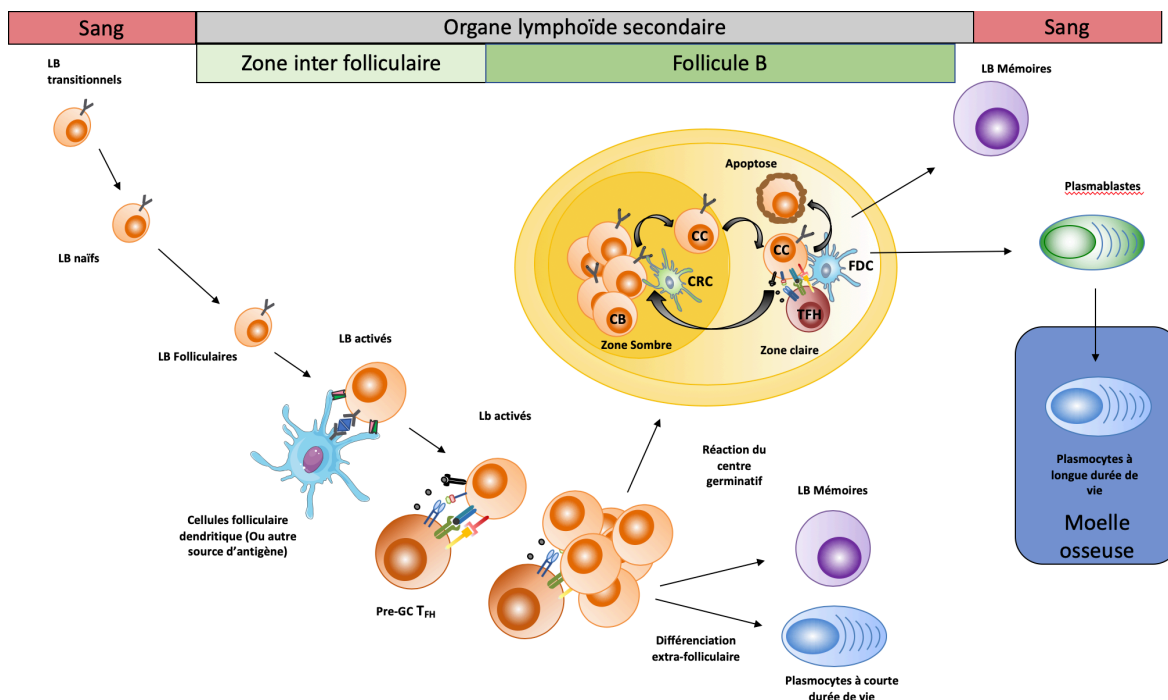
Outre la signalisation BCR, un autre couple d'acteurs important pour la maturation des LB immatures dans la rate a été décrit : BAFF/BAFF-R (B-cell Activateur Factor/ B-cell Activator Factor Receptor). BAFF est décrit comme un ligand soluble induisant la survie des cellules B. De par son taux élevé dans certaines maladies auto-immunes, le lupus érythémateux systémique<sup>21</sup> par exemple, son rôle dans la survie et la sélection des LB auto-réactifs a été investigué. Cyster et ses collaborateurs ont démontré l'importance de la signalisation BAFF/BAFF-R et l'existence d'une compétition entre les cellules B auto-réactives HEL+ et les autres pour l'accès au ligand BAFF. Ils décrivent un modèle où l'induction vers la mort par le signal BCR peut être inversée par des quantités croissantes de BAFF. Ainsi, les cellules non-auto-réactives auraient besoin d'une quantité plus faible de BAFF pour survivre<sup>22</sup>.

Les cellules sélectionnées comme non auto-réactives continuent leur maturation pour donner un pool de cellules naïves matures. Les différences phénotypiques entre les populations cellulaires murines et humaines opacifient la compréhension de mécanismes tel que celui permettant la circulation des stades transitoires de différenciation des LB. En effet, l'ensemble des stades peuvent être retrouvés circulants chez une personne ayant subi un traitement au rituximab par exemple, sans pour autant que les mécanismes de sortie/entrée dans le lieu de maturation n'aient été élucidés.

La cellule B naïve est donc circulante, quiescente, sélectionnée comme non auto-réactive. Le BCR de ces cellules est largement composé d'IgD, et spécifique à chacune des cellules. Ces cellules vont circuler entre les organes lymphoïdes et vont être capable de reconnaître directement des antigènes solubles, ou présentés par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) tel que le macrophage, la cellule dendritique (DC), ou la cellule dendritique folliculaire (FDC)<sup>23</sup>.

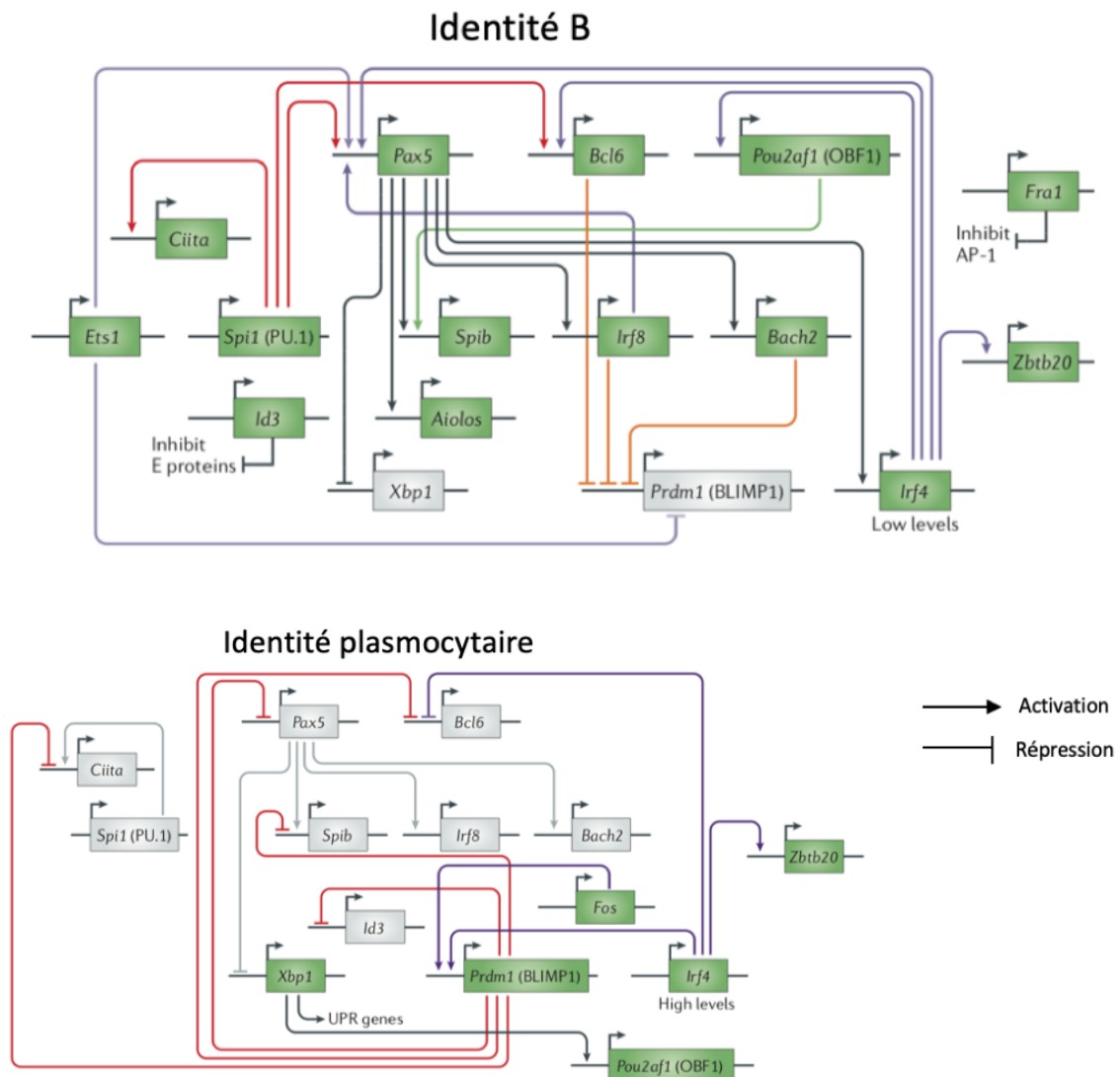
La différenciation terminale du LB naïf commence donc par cette étape de reconnaissance d'un antigène immunogène. Plusieurs voies de différenciation ont été décrites dans la littérature, aboutissant à des cellules effectrices sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, ou à une mémoire immunitaire via le LB mémoire. L'orientation dans une des voies de différenciation peut être gouvernée par de nombreux éléments (la nature de l'antigène, les

acteurs du micro-environnement présents au moment de l'engagement, les signaux intégrés par le LB, la force du signal...). Par exemple, la nature de l'antigène déterminera une réponse dépendante du LT CD4+ (réponse T dépendante) ou d'une réponse T indépendante. En lien avec cette interaction LB/LT, le LB pourra s'orienter vers la formation d'une structure anatomique appelé Centre Germinatif (Germinal Center GC) qui sera le lieu d'une multiplication importante de la cellule B sélectionnée, couplé à une augmentation de l'affinité de son immunoglobuline, générant des plasmocytes sécréteurs d'anticorps très affins ou des cellules B mémoires. D'un autre côté, le LB naïf peut effectuer une différenciation terminale sans aide du LT et générer des plasmocytes à courte durée de vie, et de faible affinité pour l'antigène. Ces plasmocytes correspondent à une réponse très rapide dans la défense contre une infection (Illustré dans la **Figure 1**). Bien que les chemins soient différents, que la nature des signaux intégrés le soit aussi, il a été décrit que la différenciation terminale des LB était coordonnée par un ensemble de gènes qui gouvernent l'identité de la cellule. Comme nous le verrons plus tard, un ensemble de facteurs de transcription (Transcription Factor TF) a été décrit comme freinant la différenciation B (BACH2, BCL-6, PAX5, SPIB, IRF8...), et de manière antagoniste un autre groupe de facteurs de transcription a été décrit comme promouvant/caractérisant l'état de différenciation plasmocytaire (PRDM1, IRF4, XBP1...). Ainsi, la nature des signaux activant la cellule B va modifier de manière spécifique l'expression de ces gènes permettant l'engagement vers la différenciation (**Figure 2**).





**Figure 1 : Différenciation terminale T dépendante d'un lymphocyte B.** Après maturation des LB transitionnels, les LB naïfs vont circuler entre les organes lymphoïdes secondaires pour permettre la veille immunologique. Lors de la rencontre avec un antigène (ici présenté par une cellule dendritique folliculaire), le LB va s'activer et processor l'antigène pour le charger sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Cela lui permettra de présenter l'antigène à un LT activé reconnaissant le peptide. La rencontre avec le LT va renforcer l'activation de ce LB et va entraîner sa prolifération. Les cellules filles pourront s'orienter vers la différenciation extrafolliculaire ou vers la réaction du centre germinatif. La différenciation extrafolliculaire est rapide et permet de générer des plasmocytes à courte durée de vie et des LB mémoires faiblement affins pour l'antigène. La réaction du centre germinatif permettra une prolifération intense des LB dans la zone sombre du centre germinatif. Les LB sont alors dénommés centroblastes et effectueront le processus d'hypermutation somatique. Par la suite, dans la zone claire, les LB seront sujet à une sélection en fonction de l'affinité de leurs Ig. Ces LB sont dénommés centrocytes et effectueront le processus de commutation de classe de leurs Ig. Cela permettra de générer des lymphocytes B mémoires affins pour l'antigène et des plasmocytes à longue durée de vie. LB : Lymphocyte, pre-GC LTFH : Lymphocyte T helper Folliculaire pré Centre Germinatif, CB : Centroblastes, CC : Centrocytes, LTFH : Lymphocyte T helper folliculaire CRC : Cxcl12-expressing reticular cells



**Figure 2 : Réseau de gènes gouvernant l'identité lymphocytaire B.** L'identité cellulaire au cours de la différenciation terminale est gouvernée par un ensemble de gènes. Sous l'influence des signaux du micro-environnement, la cellule va perdre l'identité B (partie gauche de la figure) et acquérir l'identité plasmocytaire (à droite). Les gènes identitaires sont colorés en vert dans ces schémas. Ces deux réseaux de gènes s'excluent mutuellement afin de contrôler finement la différenciation plasmocytaire (Adapté à partir de Nutt et al. 2015<sup>24</sup>)

Cette importance majeure des signaux d'activation dans le choix de la voie de différenciation terminale a été très astucieusement mise en évidence par le groupe de Mark Jenkins<sup>25</sup>. En transplantant un seul LB naïf dans une souris receveuse, via le principe de dilution limite, ils ont démontré qu'un seul LB pouvait engendrer l'ensemble des destinées possibles après activation dont la génération de LB mémoires GC-indépendant, de cellules activées du GC, de plasmocytes.

L'utilisation du modèle murin leur a permis en plus d'évaluer le devenir de cellules uniques possédant des BCR à affinités différentes pour l'antigène servant à effectuer la primo-immunisation. Ils ont dans un premier temps démontré que le nombre de cellules filles provenant de la réponse d'un LB naïf unique était hétérogène. Certains clones étant plus aptes que d'autres à donner de larges cohortes de cellules filles. Après vérification que cette proportion de cellules filles n'étant pas dû à un excès de prolifération des cellules, les auteurs se sont intéressés à la susceptibilité des cellules filles à mourir. Ils ont démontré que l'apoptose était le facteur limitant de la diversité des cellules filles, en effet en utilisant des LB naïfs possédant un défaut d'expression de la protéine pro-apoptotique Bim, ils ont été capables d'augmenter le nombre et la polyvalence des cellules filles.

De plus, le devenir des LB naïfs est grandement influencé par l'affinité du BCR pour le ligand. En faisant varier l'intensité de l'affinité du BCR chez les LB, les auteurs ont démontré que les cellules très affines pour l'antigène sont orientées la formation de cellules sécrétrices d'anticorps et quelques clones sont retrouvés dans les GC. A l'inverse, les cellules filles issues de clones à affinité moyenne pour l'antigène sont retrouvés dans le GC.

En conclusion de leur travail les auteurs discutent la grande hétérogénéité des signaux intégrés par les cellules B. En plus de la force de signal du BCR par exemple, les auteurs décrivent l'importance des signaux trophiques que les cellules filles vont intégrer. Ainsi, en fonction de l'intégration des signaux, une « ontogénie » entière de cellules filles peut s'éteindre et ainsi éliminer une des voies de différenciation.

L'ensemble de ces observations convergent vers la description de mécanismes de différenciation fortement contrôlés par de nombreux éléments, d'une part des signaux intrinsèques aux LB comme l'affinité du BCR, mais aussi des signaux extrinsèques ou trophiques apportés par le micro-environnement. Le dérèglement de ces signaux, tant en termes de qualité que de quantité altère la différenciation lymphocytaire B pouvant favoriser

l'émergence de pathologies. La littérature propose ainsi un classement de certains lymphomes en fonction du stade de blocage dans la différenciation de la cellule progénitrice (illustré par Basso et Dalla-Favera <sup>26</sup>). La notion de blocage de la cellule B en cours de différenciation est intéressante car elle renforce la nécessité d'intégration de multiples signaux par la cellule B en cours de différenciation pour maturer correctement dans ce processus. Les lymphomes sont donc des pathologies hétérogènes, en regard du stade de blocage de la cellule initiatrice, tout comme l'hétérogénéité des cellules filles découlant de ce processus.

Cela a été très bien illustré récemment par le groupe de Bertrand Nadel<sup>27</sup>. En étudiant l'expression génique à l'échelle de la cellule unique, les chercheurs ont démontré que les cellules du lymphome folliculaire sont très hétérogènes dans l'expression des facteurs gouvernant la différenciation normale. Par ailleurs, les cellules issues de ces lymphomes sont très différentes des cellules issues d'un centre germinatif classique. Ils en concluent que la classification des cellules cancéreuses est plus compliquée qu'une classification en fonction du stade de blocage de la cellule initiatrice.

## Chapitre 1 : Activation de la cellule B

### I- Localisation de l'activation des lymphocytes B

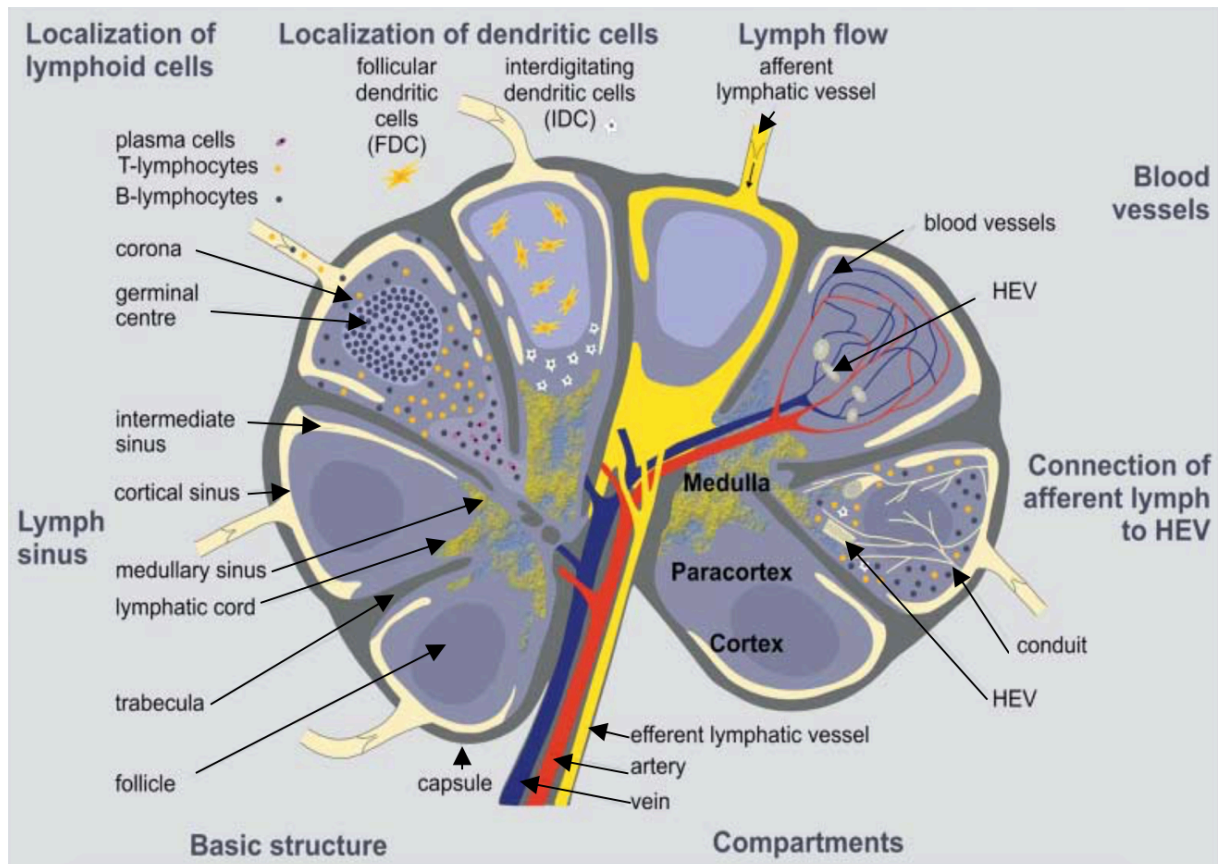
Les organes lymphoïdes secondaires (OLS) regroupent la rate, les ganglions, les amygdales, et les organes lymphoïdes associés aux muqueuses (mucosa associated lymphoid tissue (MALT)). Ces organes situés à l'interface de la circulation sanguine et de la circulation lymphatique, ont entre autres pour fonction de filtrer les antigènes présents dans la lymphe. Ainsi, des antigènes libres drainés des tissus périphériques, ou des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) chargées d'un peptide immunogène vont pouvoir accéder à ces organes via des vaisseaux lymphatiques et sanguins afférents.

Si l'antigène est présenté à une cellule B réactive, cela va entraîner l'activation de cette dernière, sinon la cellule B quiescente va continuer sa veille immunologique et circuler via un conduit lymphatique efférent vers un autre OLS.

## A- Les ganglions lymphatiques

Les ganglions sont très largement représentés dans le corps humain (plusieurs centaines). Ils sont groupés le long des vaisseaux lymphatiques et sont enchâssés dans le tissu conjonctif. Ils sont retrouvés en grand nombre dans les régions de l'aîne, le cou, l'aisselle, et dans la cavité abdominale, lieux de convergence des vaisseaux collecteurs lymphatiques. Structurellement, ces organes sont entourés d'un tissu conjonctif dense qui s'enfonce dans l'organe pour former des trabécules. L'architecture est largement coordonnée par un réseau de cellules fibroblastiques réticulaires (Follicular Reticular Cells FRC) qui via la sécrétion de chimiokines et d'une matrice extracellulaire riche organisent le nœud lymphatique. Les lymphocytes vont entrer via les veinules à endothélium épais (high endothelial venules HEVs), retrouvées dans la zone T du ganglion, aussi appelée cortex profond ou zone para-corticale<sup>28</sup>. Sous l'influence de la signalisation CXCL-13/CXCR5, les LB vont se localiser dans la zone corticale ou folliculaire, en contact étroit avec des cellules folliculaires dendritiques (Follicular Dendritic Cell FDC) et des macrophages sous-capsulaires<sup>29</sup> (Subcapsular Sinus SCS) . La lymphe drainant les antigènes solubles va entrer dans le ganglion via les vaisseaux lymphatiques afférents. Par la suite, la lymphe traversera le ganglion pour rejoindre les canaux lymphatiques efférents dans la zone médullaire du ganglion (Figure 3).

Les LB circulent constamment entre les OLS, ne restant qu'au maximum 24h dans un même ganglion, avant de retourner dans la circulation afin d'assurer leur veille immunologique<sup>2</sup>.



**Figure 3 : Représentation schématique d'un ganglion.** Le ganglion est composé de plusieurs régions anatomiques. Le cortex est composé de LB et de FDC et est organisé en follicules primaires (avant infection) et secondaires lors d'une infection. Le paracortex est lui composé de LT et de cellules dendritiques qui participeront à leur activation. La médulla représente la région la plus centrale, elle est composée de plasmocytes et de LB. Les lymphocytes vont pénétrer dans le ganglion grâce aux vaisseaux afférents ou grâce aux High Endothelial Venules (HEV). La lymphe chargée d'antigènes pénètre dans le ganglion grâce aux vaisseaux lymphatiques afférents et sera drainée du ganglion grâce aux vaisseaux efférents. (Adapté de Pabst 2004<sup>31</sup>)

## B- La rate

La rate est un organe lymphoïde secondaire volumineux, situé dans la partie gauche de la cavité abdominale. La rate va filtrer le sang, notamment grâce aux nombreux macrophages présents, elle va pouvoir être le siège de l'élimination des globules rouges et des plaquettes en fin de vie. Ces actions vont être localisées dans la pulpe rouge de la rate, qui constitue la majeure partie de cet organe. Par ailleurs, la rate est aussi le siège d'une activité immunologique importante localisée dans des îlots de pulpe blanche enchevêtrés au sein de la pulpe rouge. Outre la présence de LB dans la zone folliculaire, une population de cellule B de la zone marginale existe dans cet organe. Comme nous le verrons dans le chapitre 2, l'ontogénie de ces cellules est encore discutée, et du fait de leur proximité avec la circulation sanguine, elles ont un rôle à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.<sup>32</sup>

## C- Les organes lymphoïdes associés aux muqueuses

Les organes lymphoïdes associés aux muqueuses (mucosa-associated lymphoid tissue ; MALT) sont situés sous les muqueuses de tout l'organisme. Les plus représentés sont associés aux muqueuses du tube digestif, du larynx, des bronches... Il a été estimé que la moitié des lymphocytes du système immunitaire se trouvent dans ces organes. Ils sont le siège d'une réponse immunitaire rapide, orienté vers la production d'IgA. Ils sont divisés en site d'induction, contenant les lymphocytes B et T en expansion et les sites effecteurs distribués dans la lamina des tissus permettent la production des immunoglobulines.<sup>33</sup>

## II- Les acteurs de la présentation de l'antigène

L'activation de la cellule B se fait via la liaison d'un antigène sur son BCR. Il est couramment admis que la majeure partie des antigènes activant la cellules B *in vivo* sont présentés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes spécialisées. En fonction de la localisation et du contexte de la présentation, celles-ci peuvent être une cellule dendritique (Dendritic cell DC), un macrophage, une FDC, ou encore dans certains cas des lymphocytes B de la zone marginale dans la rate par exemple<sup>34</sup>. Une contre-partie plus faiblement représentée des antigènes peut être captée directement par le LB, ce mode d'activation a surtout été investigué *in vitro*.<sup>35,36</sup>

### A- La cellule folliculaire dendritique

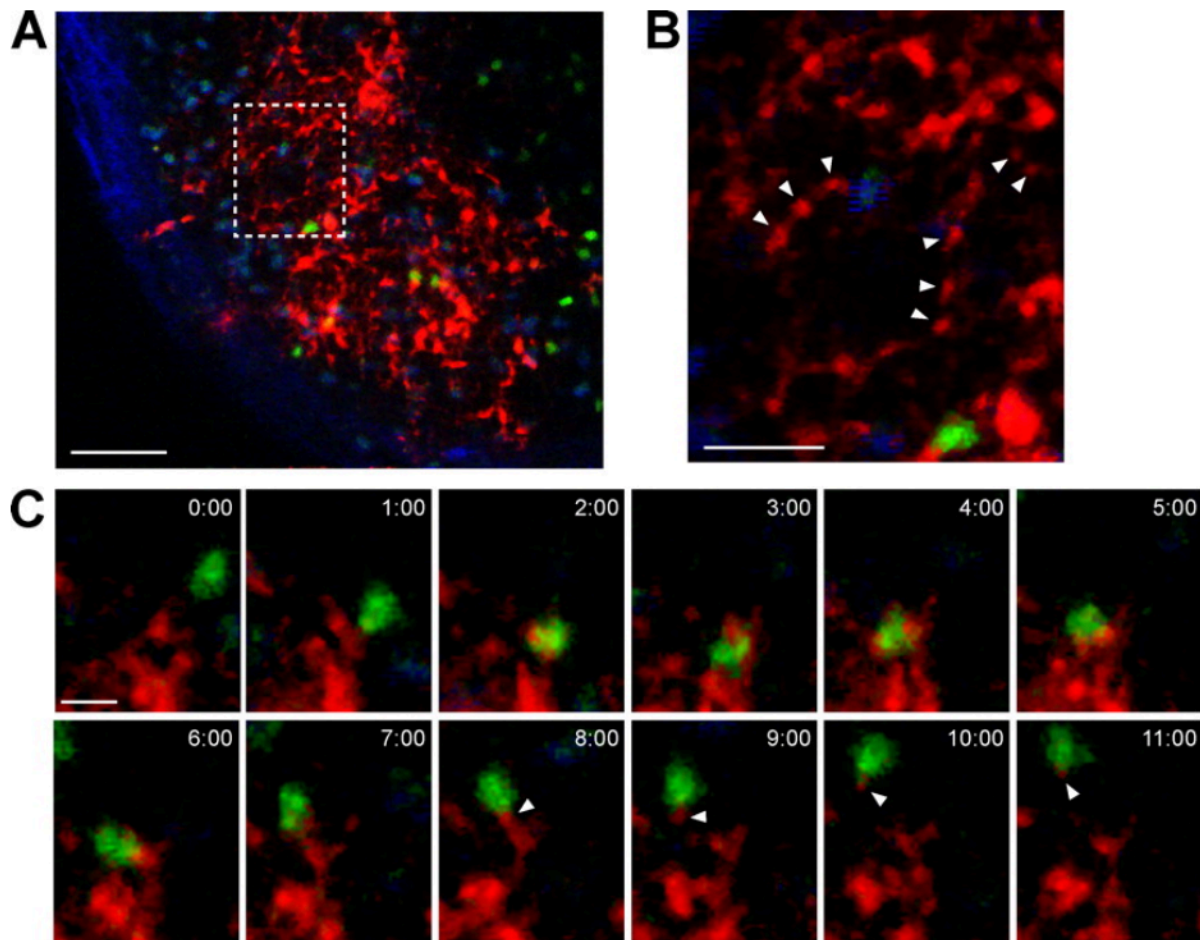
La FDC possède un rôle important dans la présentation des complexes immuns aux LB. Elle possède de grands prolongements cytoplasmiques émanant du corps cellulaire, permettant d'élargir les capacités d'interactions avec les LB. La présentation des Ag aux LB s'effectue grâce à la présence de complexes immuns présents à la surface des FDC. Elles expriment à leurs surfaces des récepteurs capables de lier la partie constante des IgG et des IgE (CD32, CD23 respectivement). Ces deux récepteurs permettront de lier les complexes immuns formés lors de la rencontre entre l'immunoglobuline et l'antigène. Par ailleurs, ces cellules expriment aussi des récepteurs aux éléments du complément que sont CR2 et CR1 (CD21 et CD35 respectivement) permettant de lier les antigènes opsonisés par les constituants du complément (C3b et C4b). Grâce à l'ensemble de ces points d'ancrages, il a été démontré que les complexes immuns peuvent être présents à la surface de la FDC pendant plusieurs années

(illustré <sup>37</sup>, article original non disponible<sup>34</sup>). *In vitro*, l'activation des LB a été démontrée comme étant plus efficace dans le cas où elle était effectuée par des FDC que par l'antigène seul<sup>10</sup>. Ainsi, la FDC va présenter les antigènes aux lymphocytes B, ce processus d'activation va être renforcé par des éléments présents à la surface de la FDC. Le dialogue entre ces deux cellules est stabilisé par l'expression par la FDC de ICAM-1 et VCAM-1 et les ligands correspondant sur la cellule B que sont LFA-1 (Lymphocyte Function- Associated Antigen 1) et VLA-4. L'importance de cette liaison a habilement été confirmée par le groupe de J.G Cyster <sup>39</sup>. Cette étude a couplé l'utilisation de LB MD4 (LB à forte affinité pour l'antigène HEL), d'un antigène multivalent HEL-phycoérythrine (PE) et d'un anticorps anti-PE. Après transfert des B MD4 dans une souris receveuse, les auteurs ont pu évaluer le devenir des lymphocytes B spécifiques de l'antigène HEL, des lymphocytes B non spécifiques de la souris receveuse, ainsi que des complexes immuns HEL-PE. Les auteurs ont confirmé la prévalence de capture de l'antigène HEL (présenté grâce aux FDC) par les LB MD4, et leur engagement dans la différenciation plasmocytaire suite à cette liaison (Figure 4).

L'utilisation de la microscopie à fluorescence et immunomarquage direct sur des ganglions a permis de visualiser en temps réel les interactions préférentielles qui existent entre les lymphocytes MB4 et les FDC. La médiane d'interaction a été déterminée à 3 minutes, avec quelques interactions longues pouvant aller jusqu'à 30 minutes. Grâce à ce modèle, les auteurs ont mis en évidence que le contact était si fort entre ces cellules que certains LB emportaient des marqueurs de FDC après cette interaction.

Malgré ces observations, une étude discute de l'utilité des complexes immuns déposés sur la FDC et leur nécessité dans l'activation et la différenciation du LB. L'équipe de M. Shlomchik a développé dans les années 2000 une souris possédant des LB caractérisés par une IgM membranaire non sécrétée. Après avoir confirmé l'absence de complexes immuns dans cette souris (et que le dépôt d'antigène via l'opsonisation du complément était indétectable), ils ont mis en évidence une réponse immunitaire GC-dépendante <sup>40</sup>. Si cette étude démontre que les complexes immuns sont dispensables pour la formation des GC, d'autres études menées sur ce sujet décrivent que la FDC participe à l'activation du LB par d'autres mécanismes comme l'exclusion de régulateurs négatifs de la signalisation BCR<sup>41</sup>, en diminuant l'apoptose ou encore en préparant les LB aux étapes suivantes de leur maturation via l'augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) <sup>38</sup> par exemple.

L'ensemble de ces études renforce l'importance du rôle des FDC qu'il soit dépendant ou non de la présence d'iccosomes à leur surface.



**Figure 4 : Acquisition d'iccosome présenté par la FDC au LB.** L'utilisation de la microscopie bi-photonique intravital a permis de réaliser ces images sur ganglions explantés. La souris a été immunisée 36h avant l'imagerie avec un complexe HEL-PE (rouge) et un anticorps anti PE, puis des LB MD4 possédant un BCR de forte affinité pour le HEL ont été transférés dans la souris (marqués au CFSE-vert). (A) Visualisation de l'accumulation de l'antigène HEL-PE dans le ganglion (en rouge), la capsule de collagène est ici en bleu. (B) Après immunisation, les FDC sont chargées d'iccosomes HEL-PE à leur surface (tête de flèche pleine). (C) Visualisation dynamique de l'acquisition de l'antigène par le LB MD4 (en vert) au cours du temps. (Suzuki et al. 2009<sup>39</sup>)

## B- Le macrophage

Le macrophage est une CPA professionnelle, c'est à dire qu'elle exprime les molécules du CMHII permettant la présentation d'antigènes exogènes. Dans le cadre de la différenciation lymphocytaire, de nombreuses études ont démontré le rôle des macrophage CD169+ du sinus sous-capsulaire dans l'activation des LB. Carrasco et Badista<sup>42</sup> ont démontré cela chez la souris grâce à l'injection d'une Avidine fluorescente connue pour induire une réponse immunitaire. L'étude cinétique de coupes de ganglion drainant le lieu d'injection a mis en évidence que



l'antigène s'accumulait dans la zone sous-capsulaire et dans la medulla du ganglion drainant. Plus tard, l'antigène a été retrouvé dans le follicule B, sans pour autant co-localiser avec les DC, les FDC, ou les FRC présentes dans le ganglion. Par ailleurs, grâce à l'utilisation de LB hautement spécifiques pour l'antigène HEL, ils ont démontré que le transfert de l'antigène des macrophages vers les LB était dépendant de l'affinité du BCR de ces cellules.

Les LB migrent vers les SCS, diminuent leurs vitesses, pour acquérir les antigènes de manière séquentielle (il semblerait que les LB entrent plusieurs fois en contact avec les macrophages du SCS pour augmenter le nombre de particules captées). Dans une autre étude où une réponse immunitaire T indépendante est induite par infection avec le virus de la stomatite vésiculaire inactivé, Junt et ses collaborateurs<sup>43</sup> ont démontré que les macrophages du SCS étaient aussi impliqués dans la présentation des particules virales aux LB et que cette présentation était indépendante des récepteurs au complément présents à la surface des macrophages et de la présence d'immunoglobulines circulantes. Ils rejoignent néanmoins la précédente étude en émettant comme hypothèse que le transfert des antigènes peut se faire grâce à des glycoprotéines présentes à la surface des macrophages comme DC-SIGN (carbohydrate-binding scavenger receptors) et que le transport vers le pôle basal s'effectue par des mouvements au sein de la membrane plus que par transcytose.

Dans la rate, les macrophages de la zone marginale ont aussi été décrits comme pouvant présenter des antigènes aux cellules B. Contrairement aux macrophages des SCS, leur localisation leur permet d'interagir avec des antigènes présents dans la circulation sanguine. L'expression de récepteurs aux lectines (DC-SIGN, MARCO...) permet le transfert des antigènes aux LB de la zone marginale pour générer une réponse rapide contre l'antigène<sup>44</sup>. Ils possèdent aussi un rôle important dans le transfert des complexes immuns vers les FDC du follicule permettant d'activer par la suite une réponse B<sup>45</sup>.

#### C- La cellule dendritique

Bien que leur rôle ait été largement décrit dans l'activation de la cellule T à l'initiation de la réponse immunitaire<sup>46,47,48</sup>, les DC possèdent aussi un rôle dans l'activation précoce des LB. Bertglod et ses collaborateurs<sup>49</sup> ont démontré que la présentation de l'antigène au LB était médiée par le FCYRIIB à la surface des DC, cette liaison induit une internalisation du complexe immun et un recyclage à la membrane sans dégradation via les lysosomes. Ainsi, la DC est capable de présenter un antigène non dégradé qui activera les LB.

Dans les ganglions, leur localisation dans la zone T ou para-cortex à proximité des HEVs favorise les contacts avec les LB pénétrant dans le ganglion par ces vaisseaux. Cela a été mis en évidence par l'équipe de Ron Germain<sup>50</sup> qui, en utilisant des DC chargées à l'antigène HEL puis transférées chez une souris receveuse, démontre la présence d'anticorps spécifiques contre cet antigène. Par ailleurs, cette reconnaissance de l'antigène par le LB entraîne une augmentation du flux calcique permettant de diminuer la vélocité des LB dans cette zone riche en cellules T et ainsi facilite le dialogue avec ces cellules.

En fonction de leurs localisations, les DC sont très hétérogènes en regard des mécanismes d'activation des LB. Dans une étude menée par le groupe de von Andrian<sup>51</sup>, ils démontrent que seules les cellules dendritiques des MALT associés à l'intestin sont capable d'orienter la différenciation terminale des LB de ces organes vers des plasmocytes à IgA qui iront spécifiquement s'adresser dans la muqueuse du tube digestif. Cette empreinte de différenciation étant due à la sécrétion par ces DC de messagers spécifiques (acide rétinoïque, IL-5, IL-6).

#### D- Le lymphocyte B

Le rôle des LB dans la présentation des antigènes aux LB peut paraître anecdotique, pourtant ces cellules possèdent les récepteurs aux compléments et aux immunoglobulines tout comme les cellules précédentes. Le groupe de Jason Cyster s'est intéressé à cette particularité<sup>52</sup>, en utilisant de la microscopie à fluorescence intravital sur organes, ils ont pu mettre en évidence que les LB folliculaires non spécifiques de l'antigène pouvaient servir de relai entre les macrophages du sinus capsulaire et les FDC pour permettre la transmission des complexes immuns permettant d'activer le LB spécifique de l'antigène.

Un scénario où les LB non spécifiques relaieraient le complexe immun présenté par la DC dans le para-cortex et iraient activer les LB du follicule ne paraîtrait pas insensé au regard des propriétés de liaison des complexes immuns à la cellule B. Cependant de telles études semblent ne pas avoir été menées dans la littérature.

#### E- La diffusion passive des antigènes

Les macrophages du SCS représentent une barrière physique empêchant les antigènes les plus volumineux de passer à travers. Il a néanmoins été démontré que des pores existaient dans

cette barrière (0,1 à 1 $\mu$ m). Pape et ses collaborateurs<sup>53</sup> ont illustré le principe de diffusion passive des antigènes à l'aide d'un modèle murin où il est possible de suivre le devenir d'un antigène soluble de faible poids moléculaire. Ils ont démontré que, très rapidement après l'injection, les LB les plus proches du plancher du SCS puis ceux plus profonds dans le follicule liaient cet antigène. Roozendaal et ses collaborateurs<sup>54</sup> ont apporté l'aspect structural de cette diffusion passive, en effet ils ont mis en évidence des conduits de collagène entourés de FRC qui permettent l'accès direct des antigènes de faible poids moléculaire (<70kDA) aux LB folliculaires.

Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes peuvent aboutir à l'activation de la cellule B naïve lors d'une réponse immunitaire. Ces mécanismes plus ou moins bien explorés ne constituent pas une liste exhaustive des méthodes d'activation. En effet, dépendant du pathogène et du contexte de la réponse, il est tout à fait concevable que ces mécanismes s'entrecroisent pour permettre une activation efficace du processus immunitaire.

### III- Natures et forces d'activation

L'activation des LB se fait par la reconnaissance d'un antigène par le récepteur de ces cellules ; le BCR.

#### A- Le récepteur des cellules B

En condition physiologique, les LB naïfs circulants possèdent un BCR qui leur est spécifique. Le nombre de récepteurs répartis à la surface de la cellule a été estimé entre 120 000 et 200 000<sup>55</sup>. L'activation du LB via la reconnaissance de l'antigène est un processus fortement régulé de par les nombreux acteurs sous-jacents à la signalisation du BCR.

##### A.1- Structure du BCR

Le BCR d'une cellule naïve est constitué d'une immunoglobuline de surface, mIgM ou mIgD. Les domaines intra-cytoplasmiques de ces deux Ig (Immunoglobulines) sont composés de 3 acides aminés (AA) Lysine-Valine-Lysine qui ne permettent pas de transduire un signal. Associées à l'Ig membranaire se trouvent les sous-unités transductrices : CD79A et CD79B (Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  respectivement). Ces protéines possèdent des domaines intra-cytoplasmiques

caractérisés par la présence de motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs ITAM). Ces motifs sont caractérisés par une organisation particulière d'AA : 2 motifs de 4 AA (une tyrosine est séparée d'une leucine ou d'une isoleucine par deux AA quelconques) séparés eux même par 7-12 AA (KXXY/L<sub>7-12</sub>KXXY/L). Ces motifs particuliers constitueront le point de départ de la signalisation BCR.

#### A.2- Mécanisme d'activation

Plusieurs mécanismes d'activation sont proposés venant de différentes observations. Le premier mécanisme serait l'existence de BCR sous forme monomérique à la membrane composé d'une Ig membranaire et d'une chaîne Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ . Cette proposition a été mise en évidence par le groupe de Pierce<sup>56,57</sup> qui en utilisant la technologie du transfert de fluorescence, FRET, a montré que l'association de deux chaînes Ig $\alpha$  n'était pas retrouvée à l'état basal. L'activation des cellules avec un antigène multimérique conduit au regroupement des BCR et donc à une augmentation de l'intensité de fluorescence (rapprochement de plusieurs chaînes Ig $\alpha$ ). De manière intéressante, ils ont observé une perte de fluorescence après activation alors que les domaines extra-cellulaires étaient encore proches, indiquant un remaniement intra-cytoplasmique des chaînes du BCR. Au cours de cette étude, ils ont aussi démontré que la partie Cmu4 de la chaîne lourde de la mIg était impliquée dans le rapprochement ou clustering des BCR. En effet, en modifiant le BCR des cellules pour que la chaîne intra-cellulaire exprime de façon constitutive et accessible ce fragment Cmu4, ils observent un rapprochement spontané des BCR et une activation de la cellule B.

A l'opposé, le mécanisme d'action proposé par le groupe de Reth repose sur la présence à l'état basal de clusters de BCR à la membrane. Ils ont mis en évidence par électrophorèse en condition non-dénaturante des complexes composés que d'un seul isotype (IgM ou IgD). Dans une seconde étude, en utilisant de la microscopie à fluorescence et un système rapporteur permettant de suivre l'association des chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ , ils ont mis en évidence des clusters de BCR à la membrane priorisant l'activation de la cellule B. Pour eux, la majorité des BCR présents à l'état basal chez le LB sont regroupés dans des îlots qui promeut l'inactivation de ces derniers par la non accessibilité des ITAMs par exemple, ou par la présence de co-régulateurs négatifs du BCR (CD22, CD45, CD72,...). Ces auteurs proposent donc un modèle

où, à l'état basal, la grande majorité des BCRs sont regroupés dans des ilots, mais certains BCR présents à l'état monomérique dans la membrane fournissent les signaux toniques (ligand indépendant) permettant d'assurer la survie du LB quiescent.

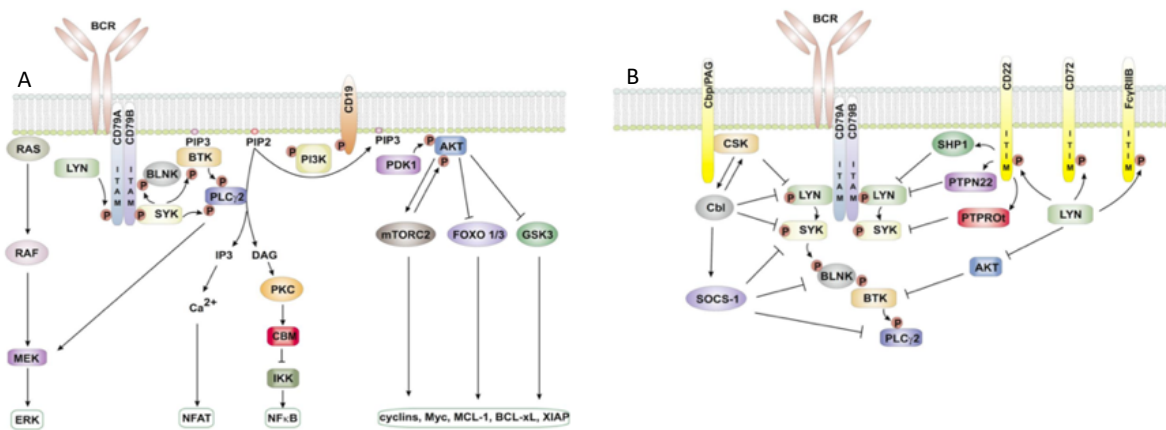
Dans les deux cas de figure proposés, la mobilité des BCR à la surface des cellules est nécessaire pour activer le LB. Le BCR étant enchâssé dans la membrane plasmique de la cellule, des équipes se sont intéressées aux rôles du cytosquelette dans ce mouvement et donc dans l'activation de la signalisation BCR. En utilisant la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (total internal reflection fluorescence microscopy TIRF), particulièrement adaptée pour évaluer les mouvements protéiques dans la membrane plasmique, les auteurs ont démontré que le cytosquelette d'actine de la cellule formait des frontières de diffusion des BCR, et qu'une simple disruption du réseau d'actine sous-jacent la membrane pouvait engendrer un regroupement des BCR et mener à une signalisation de celui-ci<sup>58</sup>.

A ce jour, même si l'état basal des BCR est toujours discuté, il est évident que l'activation de la signalisation BCR passe par une agrégation de multiples BCR en un endroit localisé de la membrane plasmique du LB. Cette agrégation est médiée par un remaniement complet du cytosquelette de la cellule, avec en plus du rôle de l'actine, les microtubules qui permettent de concentrer les BCR à la synapse avec la CPA. Cela entraîne une relocalisation des centres organisateurs des microtubules (Microtubule organizing center MTOC) permettant le rapprochement des lysosomes à proximité de ces BCRs afin de processor l'antigène en vue des étapes suivantes (parfaitement illustré par Yuseff *et al*<sup>59</sup>).

### A.3- Voie de signalisation sous-jacente

La liaison de l'antigène initie la cascade de signalisation du BCR. Dans un premier temps la protéine kinase Lyn, enchâssée dans les radeaux lipidiques, co-localisant avec les chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  du BCR, va phosphoryler les motifs ITAMs de ces chaînes intra-cytoplasmiques. La protéine Syk va ainsi pouvoir se lier aux ITAMs via ses domaines SH2 et activer la protéine majeure de la signalisation du BCR qu'est Blnk (B-cell linker protein). Blnk va à son tour se lier à CD79a et être phosphorylée par Syk. Ainsi activée, Blnk va phosphoryler les protéines Btk (Bruton's tyrosine kinase), Vav1, et la PLC $\gamma$ 2, toutes les trois contenant des domaines PH leurs permettant de se lier aux lipides membranaires. PLC $\gamma$ 2 est une enzyme ayant la possibilité de

cliver le phosphoinositide PI(4,5)P2 en IP3 (Inositol trisphosphate ) et DAG (Diacylglycerol). Ces seconds messagers étant importants pour la promotion du signal BCR (Figure 5A). Parmi les voies de signalisation activées par cette cascade moléculaire on retrouve la voie ERK (activé via le recrutement de Grb2 et Sos au signalosome), la voie NFκB (via la libération du DAG), l'augmentation du taux calcique intra-cellulaire (via IP3), la voie PI3K activée grâce aux co-récepteurs du BCR que sont 1) le CD19 (point d'ancrage de la protéine Vav), 2) le CD81 (jouant sur le réseau d'actine sous-jacent pour faciliter le regroupement des BCR), 3) le CD21 (récepteur au complément pouvant stabiliser la reconnaissance des complexes immuns par le BCR) et enfin 4) le CD225 retrouvé lié à ce complexe mais sans fonction connue pour l'instant. Ces co-récepteurs ont une grande importance dans le renforcement de la signalisation BCR. Tout comme lors de la sélection des LB auto-réactifs, les voies de signalisation sous-jacentes à la stimulation BCR peuvent induire la survie mais aussi l'apoptose, la prolifération, la migration des cellules B. Cette fine régulation de la signalisation nécessite des co-récepteurs à effet négatif comme CD22 (rôle bivalent potentialisant la signalisation BCR via GRB2 et ERK, et inhibant la signalisation dépendante du calcium<sup>60</sup>), FCYRIIB (possède un domaine SH2 permettant de lier SHP1 et SHIP pour déphosphoryler les Igα et Igβ du BCR<sup>61</sup>), CD45 (phosphatase régulant la phosphorylation la protéine Lyn<sup>62</sup>).



**Figure 5 : Mécanismes de transduction et de régulation du signal BCR.** (A) La liaison du ligand sur le BCR entraîne le regroupement des BCR à la membrane. Ce regroupement va être propice au recrutement de la kinase Syk sur les motifs ITAMs des chaînes intracytoplasmiques de CD79A et CD79B. Par la suite, grâce à des phosphorylations consécutives, la reconnaissance du ligand par le BCR aboutira à l'activation des voies de signalisation ERK, NFAT, Akt, et NFκB. (B) La signalisation BCR est finement régulée par un ensemble de modulateurs de la transduction. Cette action nécessite le recrutement de phosphatases (SHP-1, PTPN22...). L'ensemble de ces mécanismes participent à la régulation fine de la signalisation BCR. (Adapté de Bojarczuk et al. 2015 <sup>64</sup>)

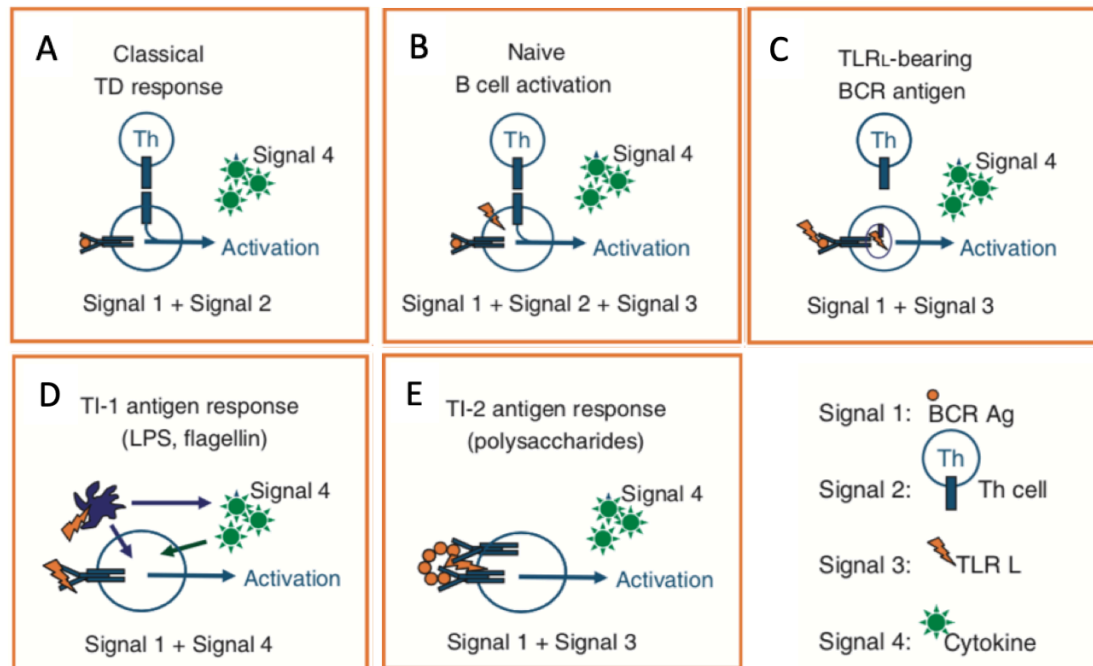
Enfin, le recrutement à la membrane de la protéine CSK (C-terminal SRC kinase) permet d'activer l'ubiquitine ligase CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) et Socs1 permettant la répression de la signalisation BCR<sup>63,64</sup> (Figure 5B).

#### B- Renforcement de l'activation B par les Toll Like Receptors

L'activation des LB peut être renforcée par la présence d'antigène reconnu par les récepteurs de type « Toll » (Toll-Like-Receptor, TLR). Ces récepteurs classifiés dans la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs (Pattern-recognition-receptors PRRs) jouent un rôle crucial dans l'immunité innée en reconnaissant des motifs particuliers présents sur des pathogènes (Pathogene associated molecules patterns PAMPs) ou des débris cellulaires (Damage associated molecules pattern DAMPs). On distingue 13 TLRs, ségrégués en deux familles en fonction de leur localisation cellulaire (membranaire ou endosomale)<sup>65,66</sup>. L'engagement de la signalisation TLR résulte dans l'activation de la protéine adaptatrice Myd88 (myeloid differentiation primary response protein 88) dans la majeure partie des cas sauf pour TLR3 dont le signal est médié par TRIF (Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ ). TLR4 utilise les deux voies de transduction, dépendante ou non de Myd88. Les efforts de recherche dans ce domaine ont été prolifiques avec l'utilisation de modèles murins, en effet la possibilité de dépléter spécifiquement les TLR dans la lignée B permet d'évaluer leur rôle dans la différenciation. Une très bonne représentation du processus a été illustré par Bekeredijan-Ding et Jengo<sup>66</sup> recensant l'implication des TLRs dans l'activation du LB murin (Figure 6).

Malgré tout, une extrapolation à l'homme est risquée car les récepteurs ne sont pas exprimés dans les mêmes proportions. L'expression de TLR4 par exemple est constitutive chez les LB murins, les rendant très sensibles à la stimulation LPS (signal largement utilisé dans la littérature pour différencier *in-vitro* les LB murins) (Lipopolysaccharide LPS). Chez l'homme, le groupe de Lanzavecchia s'est intéressé à cette question. Ils ont dans un premier temps démontré que l'expression des TLRs variait entre les compartiments B mémoire et naïf, avec une expression constitutive de TLR9 par les LB mémoires. Dans un second temps, ils ont avancé le fait que la stimulation TLR représentait le troisième signal nécessaire à la différenciation plasmocytaire chez l'homme avec l'engagement du BCR et l'aide du LT<sup>67</sup>. Il faut néanmoins nuancer cela en mettant en avant que ces résultats ont été obtenus à l'aide de

modèles de différenciation *in vitro*. Néanmoins, *in vivo*, beaucoup d'études sur le rôle des TLRs ont utilisés des modèles murins d'infections bactériennes, il est facilement imaginable que des composants issus de bactéries infectantes (ADN bactérien, LPS) puissent circuler dans le flux lymphatique ou sanguin lors d'une infection. Comme décrit par l'équipe de M.Jenkins, une diffusion des antigènes libres de faible taille étant possible, il n'est pas exclu que certains composants bactériens facilitent l'activation du LB.



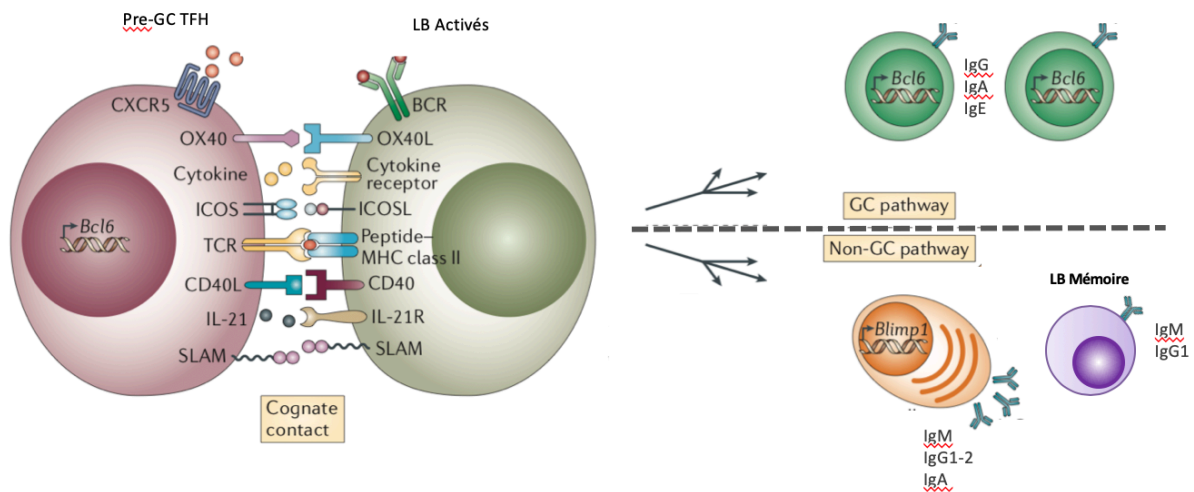
**Figure 6 : Modèles proposés du renforcement de l'activation par les TLR.** La différenciation terminale des LB peut s'effectuer avec ou sans l'aide du LT helper. Différentes cytokines peuvent être délivrées par les éléments du micro-environnement, c'est pour cela qu'elles sont représentées dans l'ensemble des situations. Lors d'une réponse T dépendante, l'association des signaux issus de la reconnaissance du BCR et l'aide apporté par le LT peuvent être suffisants pour engendrer l'activation du LB (A). Ces deux signaux peuvent être complétés par la reconnaissance d'un ligand du TLR (B). Un modèle ambivalent est proposé par le groupe de Marshak-Rothstein ou des ligands TLR associés à des motifs reconnus par le BCR entraineraient l'activation du LB (C). Cette activation pouvant être renforcée par l'apport du CD40L<sup>68</sup>. Enfin dans une différenciation T indépendante de type 1, la reconnaissance du ligand TLR par le LB et par la cellule présentatrice d'antigène induira l'activation du LB notamment par la sécrétion de cytokines par l'APC reconnaissant l'antigène (D). Dans le cadre d'une différenciation T indépendante de type 2, l'antigène de type polymérique pourra activer des sous types de lymphocytes particuliers comme les LB de la zone marginale (E). (Adapté de Bekeredjian-Ding et Jego. 2009 <sup>66</sup>).

#### IV- La synapse avec le lymphocyte T

Parallèlement à l'activation du LB, un lymphocyte T CD4+ (LTCD4+) de la zone para-cortical peut être activé par le même antigène que celui présenté au LB. Cette activation se fait via une DC<sup>69</sup>. L'orientation vers une différenciation T folliculaire helper (LTFH) se fera grâce à l'augmentation de l'expression de Ascl2 et de BCL-6 antagonisant les autres devenir des LT activés<sup>70,71</sup>. Les LTFH vont ensuite se relocaliser dans le follicule grâce à l'expression de CXCR5 pour renforcer l'activation du LB, on parle alors de différenciation T dépendante. Ce



renforcement d'activation se fait par plusieurs signaux qui peuvent être des contacts physiques, ou l'utilisation de messagers solubles (Figure 7).



**Figure 7 : Interaction entre le pre-GC LTFH et le LB activé.** Lors de cette étape clé de la différenciation terminale T-dépendante, les LB et le LT vont échanger de nombreux signaux qui vont renforcer les activations de ces deux cellules. Les signaux peuvent être de nature physique avec notamment l'engagement du TCR du LT grâce à la présentation du peptide antigénique par les molécules du CMHII par le LB. D'autres liaisons comme l'engagement des molécules CD40/CD40L, SLAM-SLAM, ICOS-ICOSLG, OXO40-OCO40L vont participer à l'activation bi-directionnelle des deux cellules. Certains messagers solubles tels que les cytokines (IL-21, IL-2, IL-4) viendront compléter le panel de molécules de co-stimulation. Suite à l'intégration des signaux par le LB, il va proliférer et les cellules filles pourront s'engager dans la voie de différenciation extrafolliculaire. Cette différenciation est caractérisée par une augmentation rapide de l'expression de *PRDM1* et permettra la production de plasmocytes à courte durée de vie ou des LB mémoires caractérisés par une faible affinité pour l'antigène. D'autre part, les cellules filles pourront s'orienter vers la voie du centre germinatif. Ces LB auront une expression forte de *BCL6* et pourront générer des plasmocytes à longue durée de vie ou des LB mémoires très affins pour l'antigène. (Adapté de McHeyzer-Williams et al. 2011<sup>72</sup>)

## A- Interactions physiques

### A.1- Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

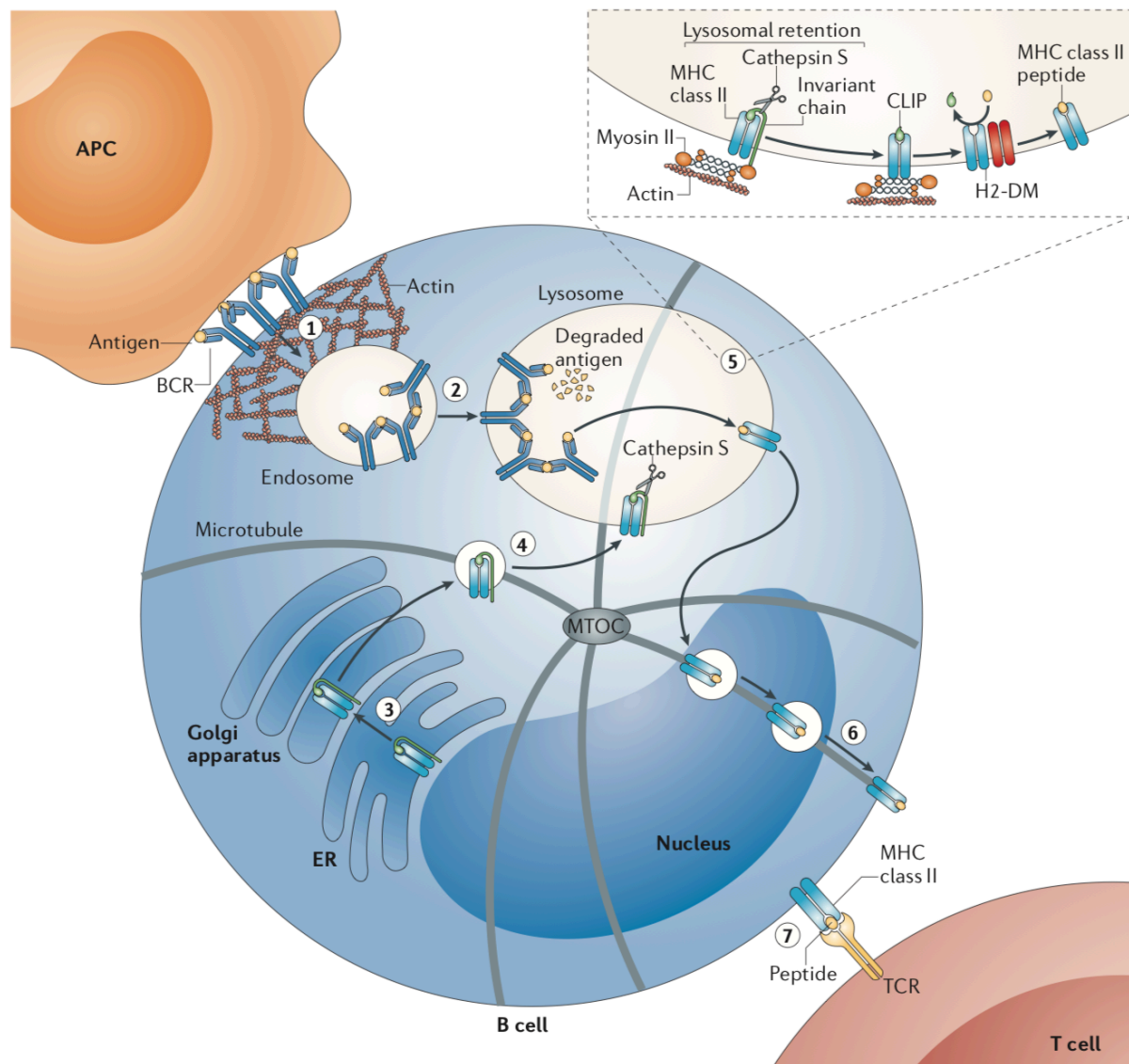
Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde  $\alpha$  et d'une chaîne légère  $\beta$ , chacune de ces chaînes étant composée de deux domaines extra-membranaires. Ce complexe protéique, exprimé sur les CPA dites professionnelles (LB, macrophages, cellules dendritiques) va servir dans ce cas présent à la présentation des antigènes par le LB au LT activé.

La présentation de l'antigène se fait grâce à l'internalisation du complexe antigène-BCR formé lors de la présentation de l'antigène par la CPA (FDC, macrophage du SCS...). La première étape de ce processus nécessite une coupure dans la liaison entre l'antigène et la CPA. Batista et ses collaborateurs ont dans un premier temps émis l'hypothèse que les LB pouvaient acquérir des portions de CPA dont l'antigène présenté. Plus tard, Natkanski et ses collaborateurs ont mis

en évidence l'existence de l'internalisation de portions de membranes de la CPA par le LB. Cette internalisation des complexes BCR-antigènes de forte affinité est médiée par la contraction du cytosquelette du LB<sup>73</sup>. Un autre mécanisme de coupure de la liaison CPA-antigène a été démontré par le groupe de Lennon-Duménil de l'institut Curie à Paris. En utilisant la microscopie TIRF, ils ont démontré que le regroupement des microtubules du LB lié à l'agrégation des BCR permettait de véhiculer et de ralentir les lysosomes du LB à proximité de la zone de synapse immunologique. En utilisant une sonde dont la fluorescence est dépendante du pH, ils ont observé une acidification de la synapse immunologique due à l'excrétion de lysosomes dans la synapse. Cette excrétion permet aussi de relarguer des protéases dans la synapse qui en association avec l'acidité de la synapse favorisent le détachement et l'internalisation du complexe antigène-BCR<sup>74</sup>. Par la suite, deux mécanismes parallèles peuvent se mettre en place, les protéases libérées dans l'espace de la synapse vont dégrader l'antigène et il sera chargé sur une molécule de CMHII membranaire sans internalisation<sup>75</sup>, ou alors le complexe antigène-BCR va être internalisé. L'internalisation est médiée par un processus clathrine-dépendante<sup>76</sup>, l'ubiquitinylation des chaînes lourdes du BCR a été décrit comme le signal initiateur de l'internalisation en 2006<sup>77</sup>, puis le même groupe a finement démontré que la phosphorylation de Syk permettait le recrutement de la protéine c-cbl qui ubiquitinylyl la chaîne lourde du BCR permettant l'internalisation du BCR, la co-localisation de celui-ci avec des lysosomes, et enfin le transfert des peptides dans le compartiment de chargement des molécules de classe II (multilaminar class II compartment MIIC) (Figure 8).

Il y a donc un lien important entre la force du signal (nombre des BCRs engagés et état de phosphorylation de Syk) et le moment où l'internalisation du BCR débute. De manière intéressante, Chaturvedi et ses collaborateurs<sup>78</sup> ont démontré que la signalisation sous-jacente au BCR ne s'arrête pas avec l'endocytose, en effet les kinases initiateuses des voies de signalisation MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et PI3K s'accumulent au niveau des récepteurs localisés dans les endosomes précoces. L'utilisation d'inhibiteurs d'endocytose entraîne une accumulation des BCR à la membrane menant à une phosphorylation imparfaite des kinases (hyperphosphorylation de p38/ERK/Jnk..., et une hyposphorylation de AKT). En analysant l'expression des gènes dans cette condition défectueuse pour l'endocytose, ils ont remarqué que de nombreux gènes sous contrôle du signal BCR étaient mal régulés. La

présentation de l'antigène via le CMHII du LB au LT va nécessiter une relocalisation de la cellule B à la frontière des follicules B et T (appelée frontière B/T).



**Figure 8 : Internalisation du BCR et présentation du peptide antigénique au LT preLTFH.** La reconnaissance de l'antigène par le BCR du LB va entraîner une contraction du réseau d'actine sous-jacent permettant l'endocytose (1). La coupure de la liaison entre l'antigène et la CPA est possible grâce aux protéases relarguées dans la synapse immunologique par le LB ainsi qu'au pH faible présent dans cette zone. Par la suite, l'endosome va fusionner avec le compartiment de chargement des molécules de classe II (MIIC) (2). Ce compartiment est approvisionné en molécules de CMHII inactives acheminées depuis le réticulum endoplasmique (3-4). Dans le MIIC, la cathepsine S va catalyser la dégradation de la chaîne invariante présente sur les molécules de CMHII. Cette chaîne invariante permet la bonne conformation du complexe CMHII, prévient l'association précoce avec des peptides endogènes, et favorise le trafic du RE jusqu'au MIIC. Après cette coupure l'enzyme H2-DM va permettre de charger le peptide antigénique sur le complexe du CMHII. Le transport vers la membrane de ce complexe sera assuré par les microtubules (6). (Yuseff et al. 2013<sup>59</sup>)

L'équipe de Jason Cyster a démontré que la stimulation BCR entraînait une augmentation de la sensibilité du LB aux chimiokines CCL21 et CCL19 (Chemokine (C-C motif) ligand 19-21) via l'augmentation de l'expression de CCR7<sup>79</sup>. Ces chimiokines sécrétées par les cellules stromales réticulaires de la zone T (T-zone Reticular Cells TRC)<sup>80</sup> permettent de relocaliser les LB activés

à la frontière B/T ou elles vont pouvoir présenter le peptides immunogène aux lymphocytes T activés dit apparentés.

#### *A.2- La liaison CD40L/CD40*

La récepteur CD40 est un TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) exprimé par les CPA professionnelles. Lors de la reconnaissance de l'antigène par le TCR des LT, cette dernière va exprimer de manière transitoire le CD40L (CD154), ligand du CD40<sup>81</sup>. Du point de vu de la cellule B, la reconnaissance du CD40L présenté par le LT va nécessiter un regroupement des CD40 à la membrane<sup>82</sup> permettant l'activation des protéines transductrices du signal CD40 que sont les TRAFs (TNFR associated factors). Cela va venir renforcer l'activation de voies de signalisations communes avec la signalisation BCR comme les voies NFKb, p38, Akt, JNK et d'autres voies comme l'activation de la voie STAT3 via le recrutement de la kinase JAK3 sur le domaine intra-cytoplasmique du CD40<sup>83</sup>. Ainsi, la transduction de ce messenger est nécessaire à la réponse T dépendante, en effet lors de l'annihilation de la liaison, par manipulation génétique ou par anticorps bloquant, la réponse T dépendante n'est plus présente, sans affecter la différenciation T-indépendante. Cela a été largement démontré dans un premier temps avec des délétions génétiques (knockout KO) totaux<sup>84,85</sup>, puis ciblées dans la lignée B<sup>86</sup>. En cohérence avec ces observations, une perte de fonction du CD40L chez l'homme est associé à un syndrome d'hyper IgM lié à l'X caractérisé par une réduction des taux d'IgG, IgA, IgE et une augmentation du taux d'IgM<sup>87</sup>. L'engagement de cette liaison va apporter un soutien anti-apoptotique et prolifératif à la cellule B sélectionnée via les nombreuses voies de signalisation activées par la liaison (illustré par Elguetta et ses collaborateurs)<sup>82</sup>. L'expression à la membrane du LT du CD154 est dépendante de la présentation de l'antigène par la CPA. Parmi les molécules impliquées on retrouve l'engagement de signaux physiques (reconnaissance de l'antigène via le CD3/CD28) mais aussi des signaux solubles renforçant cette expression comme l'IL-2 et l'IL-15<sup>88</sup>. L'expression du CD40L à la membrane de chaque clone T sera donc variable en fonction de l'intensité des signaux reçus. Cette notion est intéressante car l'équipe de Hodgkin<sup>89</sup> a démontré que plus la force du signal CD40 était importante, plus le nombre de division du LB sera important, mais aussi que l'entrée en division sera plus rapide chez les LB stimulés avec la plus grande concentration de CD40L.

#### *A.3- ICOS / ICOS ligand*

ICOS (Inducible T-cell costimulator ICOS) est une molécule de co-stimulation du TCR de la famille du CD28 exprimée transitoirement après activation du TCR chez les LT. Chez l'homme la stimulation de LT avec un anti-ICOS couplé à un anti-CD3 induit l'activation des cellules T (monitorée par la prolifération et la production d'IL-2 par les LT<sup>90</sup>). Par ailleurs la présentation de l'antigène au LT par la DC met en jeu l'interaction ICOSLG/ICOS permettant d'orienter la différenciation du LT CD4 en LTFH (via l'augmentation de l'expression de BCL6, marqueur de la différenciation LTFH<sup>91</sup>). *In vivo*, chez la souris déficiente en ICOS, Xu et ses collaborateurs<sup>92</sup> ont mis en évidence que les LT activés étaient présents à la frontière B/T mais étaient incapable de migrer dans le follicule pour monter une réponse immunitaire de type centre germinatif (GC). Ils ont habilement démontré que les LB non affins pour l'antigène mais exprimant constitutivement ICOSLG représentaient une source nécessaire d'ICOSLG pour permettre la relocalisation des T activés dans le follicule. Lors de l'interaction avec le LB apparenté, l'engagement de ICOS/ICOSLG va permettre d'augmenter la surface d'échange entre les deux cellules. Cette notion a été mise en évidence grâce au travail de Xu et ses collaborateurs<sup>93</sup> qui, en utilisant de la microscopie à fluorescence, ont démontré que les LT ICOS<sup>-/-</sup> interagissaient certes avec les LB apparentés, mais que la surface d'interaction était plus faible. Ainsi, une surface plus faible entraîne une interaction moins forte et donc une activation trop faible des LB pour monter une réponse GC dépendante. De manière intéressante ils ont remarqué que l'absence de la liaison ICOSLG/ICOS pouvait être contrebalancée pour les LB ayant une forte affinité pour l'antigène, mettant en lumière la pléiotropie des signaux pouvant activer un LB

#### A.4- Les molécules de la famille SLAM

Neufs récepteurs de la famille SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) sont recensés dans la littérature : CD48, CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9), CD244 (2B4), CD319 (CS1 or CRACC), CD352 (NTB-A or SLAMF6), CD353 (BLAME or SLAMF8) and SLAMF9 (CD84-H1). Ces glycoprotéines transmembranaires sont en grande partie leurs propres ligands et possèdent des domaines intracellulaires de type ITSM (exceptés pour CD353 et SLAMF9). Par ces domaines, elles lient des protéines traductrices du signal possédant un domaine SH2, telles que SAP (signalling lymphocyte activation molecular [SLAM] Associated Protein)), EAT-2 (Ewing's sarcoma-associated transcript 2) et ERT (EAT-2-related transducer). L'expression de

ces molécules transductrices du signal est variable selon le type cellulaire, par exemple l'expression de SAP et EAT-2 chez le LB est controversée, car des études contradictoires ont été publiées<sup>94</sup> (ERT n'étant présent que chez les lymphocytes tueurs naturels NK). Néanmoins, ces récepteurs possèdent des rôles dans l'interaction B/T. Une étude phénotypique de la lignée B réalisée par De Salort et ses collaborateurs<sup>95</sup> a démontré que les LB naïfs (IgD+ CD38-) et les cellules pré-GC (IgD+CD38+) n'exprimaient pas le CD319, faiblement le CD48 et expriment fortement les 7 autres récepteurs. Chez l'homme, la mutation du gène *SH2D1A* codant pour la protéine SAP est responsable de la maladie lymphoproliférative liée à l'X. Le mécanisme exact menant à cette pathologie reste mal compris. L'hypothèse majeure étant qu'en l'absence de SAP l'accès aux domaines SH2 intra-cytoplasmique des récepteurs SLAM est mal régulé induisant une signalisation aberrante chez les cellules lymphocytaires<sup>96</sup>.

En 2003 Crotty et ses collaborateurs<sup>97</sup> ont démontré grâce à un modèle souris que, lors d'une infection virale, les LB chez les souris déficientes pour SAP étaient capables de se différencier en plasmocytes mais que l'immunité à long temps (plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle et LB mémoires) était déficiente. En utilisant des transferts de cellules T CD4<sup>+</sup> SAP<sup>-/-</sup>, ils ont mis en évidence que l'absence de SAP spécifiquement dans les LT était responsable de cette déficience chez la souris. Le mécanisme a été par la suite confirmé et étayé par Qi et ses collaborateurs<sup>98</sup> en mettant en évidence que les LT SAP<sup>-/-</sup> s'activaient normalement au contact des DC, mais qu'ils étaient incapable de maintenir une interaction longue avec les LB apparentés. Ces LB n'acquérant pas suffisamment d'aide du LT, leur différenciation s'en retrouve altérée. Sur le versant LB de la synapse B/T, la stimulation *in vitro* des LB d'amygdale avec un anticorps anti-CD150 (SLAM) induit une forte expression de la kinase JNK (kinase faisant partie de la signalisation MAPK en association avec ERK et p38) associée à la prolifération et la survie des LB activés<sup>99,100</sup>. Pour finir, *in vitro* chez l'homme, CD48 a été démontré comme potentialisant la réponse du LB à la stimulation CD40, augmentant leur agrégation, prolifération et la sécrétion d'IgG<sup>101</sup>.

#### A.5- Les intégrines

La liaison forte et prolongée entre ces deux cellules représente donc un aspect important dans la délivrance des signaux par le LT aux LB, dans cette optique d'autres molécules vont venir renforcer l'interaction comme les intégrines. Ces protéines transmembranaires sont constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta. Elles sont principalement

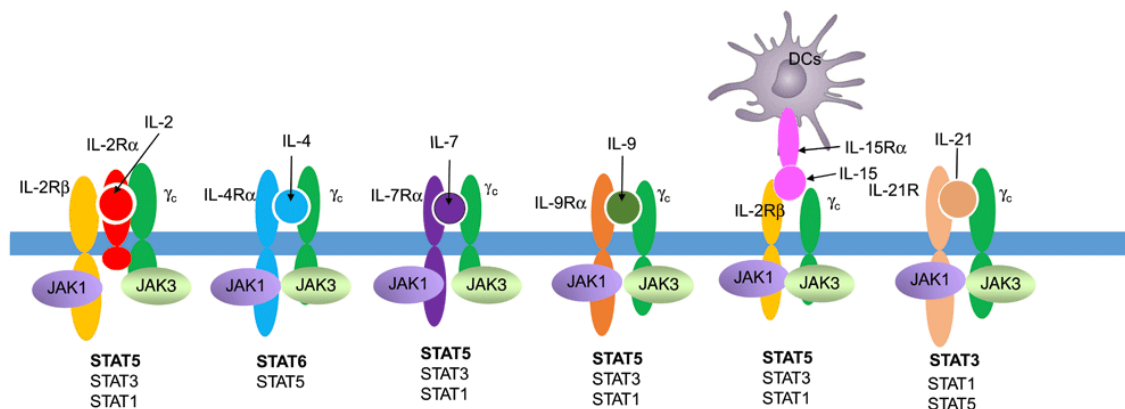
impliquées dans les interactions avec la matrice extracellulaire, mais dans certains contextes, elles peuvent médier des interactions cellule-cellule. On dénombre 24 couples alpha bêta fonctionnels, avec des spécificités de ligands dépendant des associations. Lors de la synapse entre le LB et le LT, beaucoup d'études ont été menées sur la liaison entre LFA-1 exprimé par la cellule T et ICAM (ICAM-1,2,3) exprimés sur la cellule B. L'expression de ce couple de protéine est augmentée dès l'activation de ces cellules. En utilisant le transfert adoptif de cellules B déficientes pour ICAM 1 et 2, Zaretsky et ses collaborateurs<sup>102</sup> ont démontré que l'activation du LB par la rencontre de l'antigène n'était pas dépendante de l'expression d'ICAM, mais que les LB ICAM<sup>-/-</sup> étaient moins compétitifs pour initier la réaction du centre germinatif lors de la sélection des LB par les LTFH. En utilisant la microscopie à fluorescence en direct, ils ont démontré que les interactions B/T étaient d'une durée moyenne de 29 minutes dans le cadre d'un dialogue normal, et qu'en l'absence de la protéine ICAM sur les LB, le temps de contact était diminué par 2.3. Ainsi, ils concluent que ICAM permet de stabiliser la synapse entre ces deux cellules et ainsi d'obtenir une activation efficace du LB.

Les liaisons physiques entre les deux cellules peuvent donc transmettre un signal à la cellule, mais elles ont aussi un rôle essentiel dans la formation et le maintien du dialogue étroit qui existe entre ces deux cellules. En fonction des molécules impliquées, le temps de dialogue sera plus ou moins long permettant de délivrer une force variable de signaux à la cellule B orientant sa différenciation. Ainsi, la synapse B/T va permettre d'établir un lien étroit entre les cellules ce qui permet le relargage de signaux solubles localement à de très grandes concentrations.

#### B- Les messagers solubles

Parmi les messagers solubles retrouvés dans la synapse B/T, la sécrétion d'interleukine-21 (IL-21) et d'IL-4 par les LTFH a largement été décrite dans la littérature. Cette caractéristique forte de ces cellules en est devenue, au même titre que de l'expression forte de BCL-6 et du phénotype CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>, un marqueur commun pour discriminer ces cellules LTFH<sup>103,104,105</sup>. Il est néanmoins nécessaire de rappeler que tout comme les LB en différenciation, les LTFH (Lymphocyte T Follicular Helper) sont aussi des cellules qui mûrissent au cours de la réaction immunitaire et sont donc hétérogènes en regard de leurs programmes

transcriptomiques, leurs localisations et leurs communications. Ce concept a très bien été mis en évidence par Weinstein et ses collaborateurs<sup>106</sup> qui, grâce à des rapporteurs fluorescents de l'*IL21* et l'*IL4* chez la souris, ont décrit la dynamique d'expression de ces cytokines par les LTFH au cours d'une réponse immunitaire T dépendante menant vers une différenciation par le GC. Les LTFH lors de la rencontre avec le LB activé sont IL-21<sup>+</sup>IL-4<sup>-</sup>, puis ils acquièrent l'expression de l'IL-4 avant de perdre l'expression de l'IL-21. Paradoxalement, certaines études relatent la nécessité de l'IL-4 pour promouvoir la réaction du GC comme lors d'une infection par le lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus (LCMV)<sup>107</sup>. Enfin une synergie de ces deux cytokines a été mise en évidence par le groupe de Corcoran, permettant de prévenir la dégradation du facteur de transcription BCL-6 induite par la signalisation BCR et ainsi orienter la différenciation des LB activés vers la voie du GC<sup>108</sup>. Là encore, il semble falloir tenir compte de la multitude des situations possibles, qui sont autant de combinaisons de signaux possibles menant à la différenciation d'un LB.



**Figure 9 : Activation des voies JAK/STAT par les cytokines de type I :** Les récepteurs de ces cytokines partagent l'utilisation de la chaîne Gamma C. Les récepteurs peuvent être dimériques ou trimériques (IL2-R et IL15-R). Dans le cadre de l'IL2-R, l'association des trois sous unités (CD25, CD122, CD132) formera le récepteur de haute affinité. L'IL-15 possède une redondance de signalisation avec l'IL-2 car elles partagent les sous unités CD122 et CD132 pour leurs signalisations. De manière intéressante, l'IL-15 nécessite une transprésentation par la DC qui fournira l'IL15Ra ainsi que le ligand. Les voies de signalisation JAK/STAT préférentiellement induites par ces ligands sont surlignées en gras. Chez l'homme, une mutation perte de fonction impliquant la chaîne commune Gamma-C est responsable du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (XSCID). La maladie partage le même tableau clinique que le SCID par déficit en

### B-1- L'interleukine 21

L'IL-21 est une cytokine de type I, au même titre que l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et l'IL-15, de par l'utilisation commune de la chaîne transductrice Gamma C (γC) dans leurs récepteurs (Figure 9). La liaison du ligand sur son récepteur induit une activation des voies de signalisations JAK1, JAK3, STAT3, STAT1, et dans une moindre mesure STAT5<sup>110</sup>. Une mutation génétique inactivant cette chaîne commune du récepteur entraîne un syndrome d'immunodéficience sévère lié à l'X (XSCID). La maladie partage le même tableau clinique que le SCID par déficit en



JAK3, étant donné que JAK3 est une protéine se fixant au domaine intracellulaire de la  $\gamma$ C. Chez la souris IL21<sup>-/-</sup> le développement des LB matures est normal, cependant, *in vivo*, après immunisation avec de l'ovalbumine (OVA), la production d'IgG1 est pratiquement annihilée (mécanisme dépendant de STAT3<sup>111</sup>), contrairement aux IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, ou IgA<sup>112</sup>. Il faut noter que les IgG 2a et 2b de fortes affinités pour l'OVA sont elles aussi sous-représentées.

Par ailleurs, les auteurs ont retrouvé des quantités importantes d'IgE dans ces souris, sans pour autant mesurer des quantités plus importantes d'IL-4, cytokine orientant la commutation de classe vers cette Ig<sup>113</sup>. Lors d'une infection à *Salmonella*, antigène induisant une réponse précoce exclusivement de type extra-folliculaire après contact avec la cellule T, la réponse B est similaire entre les souris IL-21 compétentes et IL21<sup>-/-</sup>. Cette observation effectuée par Linterman et ses collaborateurs met en avant un rôle important de l'IL-21 dans la génération d'une réponse T dépendante orientée vers le centre germinatif. Ils ont confirmé cette observation en monitorant l'expression de BCL-6 par les LB (marqueur d'engagement vers le GC). Les auteurs ont démontré que l'absence du récepteur IL21R était corrélée à une baisse de l'expression de BCL6 chez les LB<sup>114</sup>. Paradoxalement, et contrairement aux autres cytokines de type I citées précédemment, l'IL-21 possède un effet pro-apoptotique (dépendant de BIM) et un rôle d'activation sur les LB. Jin et ses collaborateurs<sup>115</sup> ont mis en évidence que ces effets opposés dépendent du contexte de stimulation. En effet, en récapitulant une stimulation de type T dépendante (stimulation BCR+CD40L), l'IL-21 possède un effet bénéfique sur la différenciation terminale des LB. L'hypothèse dominante derrière cette observation est que l'IL-21 permettrait d'induire l'apoptose des LB activés via le BCR par exemple mais ne recevant pas l'aide T nécessaire à parfaire son activation. Cela représenterait donc un mécanisme de contrôle de l'activation des LB. Nos observations sur notre modèle de différenciation *in vitro* des LB humains confirme ces observations avec un effet délétère important chez les cellules non différenciées (résultats non montrés).

Chez l'humain, le groupe de recherche de Tangye a beaucoup travaillé sur les capacités de différenciation terminale des LB traités à l'IL-21 (illustré dans<sup>116</sup>). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'une collaboration étroite entre les signaux CD40L et IL-21 dans la génération de PC<sup>117</sup>. Dans leurs travaux l'IL-21 possède une plus grande efficacité dans la génération des plasmocytes que l'IL-2/-4/-13 et l'IL-10 utilisés dans d'autres études comme facteurs de différenciation plasmocytaire. Malgré cela, ils relatent des rôles complémentaires

avec l'IL-2 pour promouvoir la différenciation plasmocytaire. En effet dans une étude publiée en 2013, Berglund et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'ajout d'IL-2 sur des LB stimulés avec du CD40L et de l'IL-21 augmentait la capacité de différenciation terminale des LB. Le mécanisme impliqué est STAT3 dépendant, l'intégration du signal IL-21 permet l'expression du CD25, la sous unité alpha du récepteur à l'IL-2. La sensibilisation des LB à l'IL-2 par l'expression du CD25 n'est pas uniquement liée à l'intégration du signal IL-21. En effet, l'affinité du BCR est corrélée à l'augmentation du récepteur à l'IL-2 chez les LB activés murins<sup>118</sup> (traduisant encore la pléiotropie des signaux aboutissant à un LB activé). D'un point de vue transcriptionnelle, l'IL-21 permet d'activer l'expression de *BCL6* promouvant la destinée vers le GC, mais aussi bon nombre de gènes traduisant les stades finaux de la différenciation comme *PRDM1*, *XBP1*, *AICDA* (nécessaire à la maturation des Immunoglobulines), et une réduction de *PAX5*<sup>116</sup>.

#### *B-2- L'Interleukine 4*

L'IL-4 est une cytokine dite de type Th2, elle possède une structure proche de l'IL-13. Le récepteur de cette cytokine peut être composé de la sous unité alpha de l'IL4R (IL4Ralpha) et de la sous-unité commune  $\gamma$  (Figure8), ou bien de l'IL4Ralpha et de l'IL13Ralpha1<sup>119</sup>. L'IL-4 est principalement connue chez le LB pour induire une commutation de classe (illustré par Moens et Tangye<sup>116</sup>), étape plus tardive que l'activation qui nous intéresse dans ce chapitre. Comme évoqué précédemment, la dynamique de différenciation des LTFH induit une sécrétion d'IL-21 antérieure à celle d'IL-4. Néanmoins, les rôles de l'IL-4 ou -13 ne sont pas à exclure lors de l'étape d'activation précoce des LB. Ce concept a été mis en évidence par Turquetti-Neves et ses collaborateurs<sup>120</sup>, grâce à l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-4 et l'IL-13. En induisant une réponse Th2 ou Th1 par infection des souris à l'helminthe ou aux LCMV respectivement, les auteurs ont mis en évidence que les GC formés lors d'une réponse Th2 sont significativement plus petits. Pour démontrer que les LT polarisés vers un état Th2 étaient importants pour développer une réponse GC dans ce contexte d'infection, ils ont utilisé une souris chimérique contenant des LT IL4<sup>+</sup>IL13<sup>+</sup> / CXCR5<sup>-</sup> incapables d'aller dans le follicule, et des LT IL4<sup>-</sup>/IL13<sup>-</sup> CXCR5<sup>+</sup> capables d'initier la réponse GC. Contrairement aux souris doublement déficientes pour l'IL-4 et l'IL-13, la réponse GC était normale chez ces animaux chimériques, hypothétisant un rôle à distance des sécrétions d'IL-4 /-13 par les LT Th2. Cela

renforce donc la notion que l'IL-4/-13 peut être utile dans certain type d'infection pour orienter une réponse immunitaire fonctionnelle.

En utilisant des LB déficients pour Stat6 (sous-jacent de la signalisation IL-4), ils ont aussi démontré une baisse de l'expression de *AICDA*, *BCL6*, et *XBP1* chez les LB du GC pouvant apporter des explications sur le mécanisme de cette différenciation altérée.

*In vitro*, de nombreuses études relatent l'influence de la stimulation IL-4 sur la prolifération des LB en adjonction au CD40L<sup>121</sup>, la commutation de classe vers la production d'IgE<sup>122</sup>, ou encore la résistance à la mort<sup>123</sup>.

### B.3- L'interleukine 2

Tout comme l'IL-21, l'IL-2 est une cytokine de type I. Son récepteur se compose de 3 sous unités : IL2RA (CD25), IL2RB (CD122), et IL2RG (CD132). L'IL-2 et l'IL-15 possèdent des fonctions redondantes dues au partage des sous unités IL2RB et IL2RG pour leurs signalisations. L'association des sous unités Alpha, Beta, Gamma forme le récepteur à haute affinité pour l'IL-2 et permet ainsi une transduction efficace du signal. L'IL-2 et l'IL-15 activent les voies de signalisation JAK1 ; JAK3 ; STAT5 (Figure 8), néanmoins ces cytokines possèdent des rôles spécifiques de par leur mode de présentation (sécrétion pour l'IL-2 versus trans-présentation pour l'IL-15), les cellules productrices (LT pour l'IL-2 et DC pour l'IL-15), les cellules cibles (l'IL-15 n'a aucun effet sur les LT régulateurs par exemple)<sup>124</sup>. *In vivo*, le rôle de l'IL-2 dans les phases précoces de la différenciation n'est pas encore parfaitement élucidé. Les modèles murins déficients pour les sous-unités du récepteur à l'IL-2 développent des maladies auto-immunes sévères. Pour exemple, le modèle CD25 déficient de Willeford et ses collaborateurs<sup>125</sup> ont un développement B et T normal, mais développe des anémies hémolytiques et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Le déficit en CD122 du modèle de Suzuki et ses collaborateurs<sup>126</sup> induit un défaut de cytotoxicité des LT, une splénomégalie, des taux élevés d'IgG1 et d'IgE, des anticorps anti ADN, et finalement est létale à 12 semaines de vie. Bien évidemment l'absence de la chaîne gamma commune induit de nombreux effets délétères supprimant la signalisation de plusieurs cytokines, avec notamment une absence de LT, de NK, et des B non fonctionnels<sup>127</sup> retrouvés dans le syndrome sévère combiné d'immunodéficiência (SCID). Ces observations ont été faites au début des années 2000. L'article de Ozaki et ses collaborateurs mettant en évidence le rôle majeur de l'IL-21 dans la différenciation B est paru en 2002. Beaucoup d'efforts se sont donc

consacrés à comprendre les mécanismes de l'IL-21, diminuant l'attention portée au rôle de l'IL-2 dans la différenciation terminale des LB.

Lors de la réaction immunitaire, l'activation du LT CD4<sup>+</sup> en réponse à la reconnaissance d'un antigène va induire la production d'IL-2 par cette cellule. Cela a été particulièrement bien détaillé dans un article publié par Sojka et ses collaborateurs<sup>128</sup> qui, en utilisant un anticorps bi-valent reconnaissant le CD45 d'une part et l'IL-2 d'autre part, ont mis en évidence que les lymphocytes T CD4 activés produisaient de l'IL-2, et que l'intensité de sécrétion était corrélée à la force du signal TCR acquis par le LT. Cette production peut être très rapide dans le cadre de la stimulation d'un LT mémoire, et plus ou moins longue dans le cadre de la stimulation de LT CD4 classique (12h *in vivo* vs 48h *in vitro*). De plus, le groupe de Klaus<sup>129</sup> a mis en évidence que la stimulation du LT grâce à un cocktail d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 permettait la stabilisation de l'expression du CD40L à la membrane mais aussi la sécrétion d'IL2 par ces cellules. La co-culture des LB et LT a démontré que ces deux signaux permettaient l'augmentation de l'expression de l'IL2RA chez les LB permettant ainsi une plus grande réponse à l'IL-2 et donc une prolifération et une différenciation en cellules sécrétrices d'Ig.

Par ailleurs, il a récemment été démontré que la production d'IL-2 jouait un rôle fondamental dans le devenir du LT vers la lignée LTFH ou non LTFH<sup>130</sup>. En utilisant un système de gène rapporteur GFP de l'expression de l'IL-2, ils ont démontré que, suite à l'activation de LT CD4<sup>+</sup>, deux populations de LT *IL2*<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>) et *IL2*<sup>-</sup> apparaissaient. En comparant le transcriptome de ces populations, ils ont mis en évidence que la population *IL2*<sup>+</sup> était engagée vers la différenciation LTFH grâce notamment à l'augmentation de l'expression de *Bcl6* et *Cxcr5*. A l'inverse, les cellules *IL2*<sup>-</sup> s'orientaient vers une différenciation non LTFH en augmentant l'expression de *Prdm1* et du *Cd25* contribuant à augmenter la voie STAT5. Cela met en évidence que les LT, lors de leur différenciation pour devenir des LTFH, vont produire de l'IL-2 qui est intégrée par les LT non LTFH. En couplant des observations sur l'affinité du TCR et de la modélisation de l'interaction, ils confirment les résultats précédents indiquant que la force du signal TCR est couplée avec la production d'IL-2 et donc l'orientation vers une différenciation LTFH. L'IL-2 étant un régulateur négatif de la différenciation des LTFH, cette IL-2 produit a besoin d'être titrée et consommée par les cellules du micro-environnement. C'est par exemple le cas des DC, le groupe de Jason Cyster a<sup>131</sup> démontré que les DC étaient capables de titrer l'IL-2 via la sécrétion d'un Cd25 soluble empêchant ainsi la bio-disponibilité de cette cytokine aux LT activés leur permettant de s'engager vers la différenciation LTFH.

L'IL-2 par ailleurs est nécessaire à la différenciation et au maintien d'une classe de LT régulateurs (LTreg) impliqués dans la répression de la réponse immunitaire<sup>132</sup>. Tous ces rôles de l'IL-2 dans l'homéostasie des LT ont également contribué à diminuer l'attention portée au rôle de l'IL-2 par un mécanisme intrinsèque aux LB. Devant la difficulté à dissocier la causalité des événements lorsque la signalisation IL-2 est impactée *in vivo*, ce sont essentiellement des études *in vitro* qui ont été menées pour étudier le rôle de l'IL-2 sur les LB.

Beaucoup de modèles *in vitro* ont démontré un rôle de l'IL-2 dans la promotion de la différenciation plasmocytaire<sup>133,134, 135</sup>. Les précédentes études du laboratoire ont démontré que l'activation *in vitro* des LB naïfs humains avec un cocktail de stimulation composé d'anti-BCR, de CD40L, de CpG induisait une augmentation de l'expression des sous-unités du récepteur à l'IL-2<sup>133</sup>. Dans ce modèle, l'addition d'IL-2 avant la première division des LB induit un signal de différenciation chez les cellules ayant intégré ce signal.

Mon premier objectif de thèse a été d'étudier le mécanisme moléculaire impliqué dans la capacité des LB à se différencier ultérieurement en plasmocytes dans ce modèle *in vitro* de différenciation plasmocytaire. Les résultats obtenus sont publiés dans la revue *Nature Communications* et présentés dans la section résultats de cette thèse.

\*\*\*\*\*

Dans ce chapitre, nous avons vu que l'activation précoce des LB naïfs s'effectue dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce processus complexe est fortement régulé par un ensemble de signaux menant à l'activation du LB. Ces signaux représentent un ensemble d'indications qui vont façonner le devenir de la cellule B activée.

## Chapitre 2 : Vers une cellule productrice d'anticorps

La différenciation terminale des LB est régulée par un réseau de gènes, codant des facteurs de transcriptions (Transcription Factor TF) gouvernant l'identité de la cellule (Figure2). Ce réseau de gènes s'implémentant au fur et à mesure des études menées majoritairement chez la souris, les rôles des différents facteurs sont plus ou moins bien documentés, mais semblent conservés chez l'homme. La littérature a tendance à résumer l'état de différenciation d'une cellule à un nombre restreint de gènes. Par exemple, l'identité non différenciée ou « identité B » est représentée par l'expression de *Bcl6*, *Pax5*, *Irf8*, *Bach2*, *Pu.1* ..., à l'inverse l'identité différenciée « plasmocytaire » est représentée par une expression forte de *Prdm1*, *Irf4*, et *Xbp1*. L'ensemble des signaux que le LB intègre suite à la reconnaissance de l'antigène va impacter la balance identitaire et ainsi restreindre ou promouvoir la différenciation plasmocytaire.

Bien que le réseau de gènes soit similaire, l'intégration des signaux peut aboutir à différentes voies de différenciation. Lors d'une infection T indépendante, la différenciation sera rapide, avec une production d'Ig faiblement affines pour l'antigène par la voie de la différenciation extrafolliculaire. La réponse T dépendante pourra donner lieu à une différenciation extrafolliculaire produisant là encore des Ig de faible affinité à dominante IgM, ou donner lieu à une différenciation GC dépendante permettant la génération de plasmocytes à longue durée de vie et des LB mémoires, tous deux plus affins pour l'antigène.

Outre la présence d'une aide du LT, les facteurs influençant la bifurcation entre ces voies de différenciation restent un champ de recherche très ouvert. La difficulté de distinguer facilement la voie de différenciation empruntée par la cellule effectrice est une des explications. Pour ne citer qu'une étude, Paus et ses collaborateurs<sup>136</sup> ont démontré que lors d'une réponse T dépendante, la force du signal ainsi que la densité de BCR à la surface de la cellule peuvent orienter la cellule vers la différenciation extrafolliculaire. En utilisant un antigène à affinité différente pour le BCR modifié des LB, ils démontrent qu'une grande force de signal BCR permet de produire plus de différenciation extrafolliculaire mais aussi que cette différenciation peut être effectuée par des LB à affinité plus faible pour l'antigène mais possédant une grande densité de BCR à la surface.

Dans ce chapitre sont présentés les principaux facteurs de transcriptions impliqués dans le destin du LB, puis la voie de la différenciation extrafolliculaire et enfin la voie du CG.

## I- La régulation transcriptionnelle

### A- Les acteurs de l'identité B

#### A-1- *B-Cell Lymphoma 6 protein (BCL-6)*

Le gène humain *BCL6* impliqué dans de nombreuses translocations chromosomiques dans les lymphomes non Hodgkiniens s'étend sur 24kb. Situé sur le chromosome 3q27, il code pour la protéine BCL-6 de 95kDa. Ce TF est caractérisé par 3 domaines fonctionnels ; 1) la partie terminale NH2 contient les domaines BTB/PTZ, liant la majeure partie des co-répresseurs de cette protéine, 2) un domaine PEST riche en proline, glutamate, sérine et thréonine, servant à la liaison d'autres co-répresseurs, et enfin 3) une partie COOH terminale possédant les 6 domaines Zinc Finger permettant de lier l'ADN.<sup>137</sup>

Bcl-6 est décrit comme étant un répresseur transcriptionnel, agissant avec des corépresseurs (Ncor1, Ncor2, Bcor..) ou en recrutant des histones déacétylases favorisant la compaction de l'ADN (HDAC)<sup>137</sup>. Ce TF a fait l'objet d'une attention particulière car il est fréquemment retrouvé muté dans des lymphomes de hauts grades tels que les lymphomes B diffus à grandes cellules (Diffuse-Large B Cell Lymphoma DLBCL)<sup>138</sup>.

La première étude réalisant un KO total chez la souris de ce TF a été réalisée par l'équipe de Louis M Staudt en 1997<sup>139</sup>. Ils ont mis en évidence que le KO total de *Bcl6* induisait chez une grande partie des souris un effet létal rapide (5 semaines) dû à une maladie inflammatoire sévère. Néanmoins 20% des souris *Bcl6*<sup>-/-</sup> semblaient avoir un développement normal. Chez ces souris, les auteurs ont mis en évidence des follicules B à architecture normale sans infection. Lors d'une infection T dépendante, aucun GC n'a été observé et donc aucune IgG spécifique n'a été observée. En revanche, lors d'une infection T indépendante, des IgM et des Ig ayant subi une commutation de classe ont été mises en évidence excluant la nécessité de Bcl-6 pour monter cette réponse. Après ces observations, Bcl-6 a été démontré comme étant un marqueur nécessaire à l'engagement des LT CD4 activés vers la différenciation LTFH<sup>140</sup>, et des modèles de déplétion de *Bcl6* dans la lignée B ont confirmé son importance dans l'engagement vers la voie du GC<sup>141</sup>. La dynamique d'expression de ce TF a été très bien illustrée dans une étude menée par le groupe de Okada en 2011<sup>142</sup>. En utilisant une souris rapporteuse pour l'expression de Bcl6, ils ont mis en évidence que les LB activés exprimaient *Bcl6* dès le stade folliculaire, et que son expression était nécessaire pour la formation du GC.

En croisant leurs données avec celles du groupe de Brink<sup>143</sup> et de Cyster<sup>144</sup>, ils confirment la répression qu'exerce Bcl6 sur *Ebi2* (*Gpr183*) qui participe à la destinée de la cellule en influençant sa position géographique dans le follicule.

Ainsi l'expression précoce de Bcl6 chez les LB du follicule permet la répression de *Ebi2* et ainsi une orientation vers une réponse de type GC. Les auteurs ont par ailleurs observé un rôle important de Bcl-6 dans la stabilisation de l'interaction entre le LB et le LT. Plusieurs mécanismes possibles sont évoqués comme une augmentation de la stabilité des intégrines, des liaisons entre protéines SLAM....

Bcl-6 a de plus un rôle central au sein du réseau de gènes interconnectés régulant l'identité LB ou plasmocytaire. L'expression de *Bcl6* est favorisée par l'intégration du signal IL-21 et par *Irf8*<sup>145</sup>, tous deux retrouvés lors des étapes précoces du processus de différenciation. A ce stade d'activation du LB, Bcl6 réprime la différenciation précoce des cellules activées via la répression de l'expression du gène plasmocytaire *Prdm1* codant Blimp-1<sup>146,147</sup>. Lors des stades finaux de la différenciation *Bcl6* sera réprimé par Blimp-1<sup>148</sup>, mais aussi par *Irf4*<sup>149</sup>, assurant une bonne extinction de l'identité B. Afin d'évaluer les cibles de Bcl6, le groupe de Dalla-Favera<sup>150</sup> a effectué une étude d'intégration de données couplant les données d'immunoprécipitation de la chromatine (Chromatin Immuno Precipitation, ChIP) liée par Bcl-6 et des données d'expression. Ils ont mis en évidence que Bcl-6 était capable de lier près de 5000 sites sur l'ADN, et qu'il régulait directement l'expression de gènes impliqués dans la stabilisation de l'interaction physique LB/LT, la transduction des signaux sous-jacents au BCR et au CD40, régulait l'apoptose et la réponse aux dommages à l'ADN par exemple. Cette dernière fonction cellulaire étant très importante pour la réaction du GC où les cellules vont acquérir des mutations génétiques pour augmenter l'affinité de leur Ig, Bcl6 va réguler p53 permettant de diminuer la sensibilité à la mort due aux mécanismes d'hyper-mutation somatique<sup>151</sup> et ainsi permettre l'émergence de clones plus affins pour l'antigène.

#### A-2- *Interferon-Regulatory factor 8 (IRF8)*

*IRF8* est un gène de 24kb situé sur le chromosome 16q24, il code pour la protéine IRF8 de 48kDa. Ce TF fait partie de la famille des régulateurs à interféron liant des motifs ISRE (interferon-stimulated response element ISRE) conservés sur l'ADN avec une faible affinité. Ces TF possèdent aussi des domaines d'interactions qui vont leur permettre



l'homodimérisation ou l'hétéodimérisation avec des composants de la famille des régulateurs à l'interféron. L'association avec d'autres régulateurs transcriptionnels, de la famille des facteurs de transcription E26 (E26-Transformation-Specific family ETS), ou AP-1 (Activator Protein 1), leur permet de lier des éléments composites à interféron (Interferon Composite Element ICE) avec une affinité forte.

La déficience en *Irf8* chez les LB murins (*Irf8<sup>fl/fl</sup> Cd19<sup>cre</sup>*) a démontré que *Irf8* possédait un rôle important dans la régulation de la répartition des LB au sein des compartiments folliculaires ou de la zone marginale dans la rate<sup>152</sup>. Par la suite, Pathak et ses collaborateurs<sup>153</sup> ont démontré que *Irf8* jouait un rôle dans la sélection/délétion des LB auto-réactifs pouvant expliquer l'augmentation du nombre de cellules B dans la rate si la sélection est incomplète. Bien que la délétion d'*Irf8* semble avoir des effets, ils sont minimes car les animaux démontrent une réponse immunitaire normale face à un antigène T dépendant ou T indépendant<sup>152</sup>. L'action de *Irf8* nécessitant son association avec d'autres TF, l'équipe de Stephen Nutt a généré une souris déficiente à la fois pour *Irf8* et *Spi1* qui est l'un des cofacteurs connus de *Irf8* (*CD19<sup>Cre</sup> Irf8<sup>fl/fl</sup> Spi1<sup>fl/fl</sup>*)<sup>145</sup>. Chez ces souris, en condition basale, la lignée des LB est normale. La culture des LB folliculaires *in vitro* avec une stimulation CD40L+IL-4 ou LPS+IL-4 induit une différenciation accrue sans impacter la prolifération, ni la survie des LB. Par ailleurs, la déficience de ces protéines facilite la commutation de classe. Le séquençage du transcriptome (RNA sequencing RNAseq) des LB folliculaires des souris WT (Wild Type) et double KO a démontré que les LB folliculaires de ces souris double KO étaient dans un état naïf et quiescent, mais que l'expression des "freins" de la différenciation tels que *Bcl6*, *Pax5*, ou *Mef2c* était plus faible que chez leurs cellules homologues WT. Après 2 jours d'activation, les auteurs ont observé une très forte expression de *Aicda* (expliquant la capacité accrue de commutation de classe), ainsi qu'une augmentation de *Prdm1* caractérisant la différenciation facilitée chez les doubles KO. Ils concluent leur étude sur les caractéristiques de liaison à l'ADN des protéines *Irf4* et *Irf8*. Ces deux TF, appartenant à la même famille, possèdent des sites d'interaction avec Pu.1 et des sites de liaison à l'ADN communs. Ils ont par exemple démontré que *Irf4* et *Irf8* possédaient un site de liaison dans le promoteur de *Bcl6*, et que l'accès à ce site résultait d'une compétition entre les deux protéines permettant de promouvoir son expression (liaison d'*Irf8*) ou bien de la réprimer (liaison d'*Irf4*). La balance d'expression d'*Irf8* et *Irf4* a par ailleurs été proposée comme mécanisme à l'origine du choix du LB activé à prendre la voie de la différenciation extrafolliculaire ou du GC<sup>154</sup>.

### A-3- E26 Transcription Factor family (ETS)

C'est la plus grande famille de TF chez l'homme et la souris. Elle comporte 29 membres chez l'homme répartis en 13 sous familles. Ces TF ont pour caractéristique commune de lier un motif particulier sur l'ADN appelé Ets-domaine. Cette famille regroupe des régulateurs connus dans la différenciation plasmocytaire comme *Ets-1*, *Spib*, *Pu.1* et d'autres moins investigués comme *Elk-1*.

#### A-3-1- Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1 ETS1

ETS1 est un TF de 50 kDa codé par le gène *Ets1* de 138kb situé sur le chromosome humain 11q24. Il possède un domaine d'homodimérisation et interagit avec les protéines MAF, et PAX5 par exemple. Chez le LB murins, *Ets1* est exprimé dès les stades immatures jusqu'au stade mature avec une expression forte chez les LB naïfs. Par la suite cette expression décroît dans les LB du GC et en sortie de GC est faible/nulle pour les plasmocytes et fort pour les B mémoires. Peu d'études ont investigué son rôle dans la différenciation terminale des LB. Le groupe de Garrett-Sinha a été le plus prolifique dans ce domaine. La première étude parue en 2005<sup>155</sup>, largement citée mais quelque peu sur-interprétée, a décrit l'utilisation d'un modèle murin exprimant une protéine *Ets1* dépourvue des domaines d'interaction avec ces co-régulateurs (*Ets1<sup>p/p</sup>*) et donc n'ayant pas d'activité transcriptionnelle. Chez cette souris, les auteurs démontrent une altération du lignage B avec une faible proportion de LB de la zone marginale dans la rate. Malgré la mise en évidence d'une sur-expression de marqueurs d'activation (Cd86/Cd80/CMHII) chez les LB spléniques, ce mécanisme est dépendant de la modification des compartiments cellulaires de la souris *Ets1<sup>p/p</sup>*. Néanmoins, en isolant les LB spléniques (issus d'un lignage altéré), ils observent une différenciation *in vitro* accrue spécifique à la stimulation Tlr9. Par la suite<sup>156</sup>, ils ont renforcé cette vision du rôle négatif d'*Ets1* dans la différenciation plasmocytaire grâce à des expériences d'interactions protéine-protéine (GST-pool-down). Il existe une interaction physique entre le TF *Ets1* et *Blimp-1* (TF caractérisant l'état différencié). Cette interaction physique via le domaine ETS de *Ets1* permet d'empêcher la liaison de *Blimp-1* sur le promoteur de *Pax5*, et ainsi d'empêcher la répression de *Pax5* lors de l'induction de *Prdm1*. Par ailleurs *Ets1* peut de lui-même augmenter l'expression de *Pax5*<sup>157</sup>, et son expression est régulée par la voie BCR lors de l'activation<sup>158</sup>.

### A-3-2- Transcription factor Pu.1

PU.1 est un TF de 31kDa codé par le gène *SPI1* de 40kb situé sur le chromosome humain 11p11. Parmi ses co-facteurs on retrouve SPIB, RUNX1, IRF8. Les premiers KO totaux chez la souris ont démontré un impact majeur et délétère sur la lignée B mais aussi sur la lignée myéloïde et la lignée T, cela n'a donc pas permis de conclure sur le rôle intrinsèque de Pu.1 chez le LB<sup>159</sup>. Le groupe de Stephen Nutt a éclairci cela en générant une souris KO pour *Spi1* spécifiquement dans les LB (*Spi1<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>Cre</sup>*). Ils n'ont pas mis en évidence de défaut de la lignée des LB lorsque *Spi1* est ainsi inactivé au stade pre-B, et la souris était capable de répondre à une stimulation LT dépendante en générant des Ig de forte affinité pour l'antigène. Les auteurs concluent que Pu.1 n'est pas indispensable à la différenciation plasmocytaire. Malgré tout, en connaissance de la redondance des facteurs ETS et notamment de la forte homologie des séquences reconnues par Pu.1 et Spib, les auteurs évoquent la possibilité que Spib remplisse les fonctions de la protéine déficiente Pu.1, masquant ainsi le phénotype de la souris *Spi1* cKO (conditional KnockOut). Pour tester cette hypothèse, ce même groupe a construit une souris déficiente pour *Spi1* et *Spib* (*Spi1<sup>fl/fl</sup> Spib<sup>-/-</sup> Cd23<sup>Cre</sup>* (*Spi1* est invalidé dans les LB transitionnels afin d'éviter un phénotype au stade pre-B). Lors d'une infection T dépendante ces souris ne génèrent pas d'Ig commutées spécifiques de l'antigène en lien avec l'absence de GC. La redondance de ces facteurs est bien mise en évidence par la présence de GC dans les souris invalidées uniquement pour *Spi1* ou pour *Spib*. Par la suite, les auteurs ont effectué le séquençage du transcriptome des LB folliculaires activés *in vitro* avec du CD40L+IL-4. En couplant des données de CHIP-sequencing de Pu.1 générées précédemment, ils ont pu mettre en évidence que Pu.1 liait près de 4800 gènes et qu'il possédait un rôle d'activateur de la transcription. Parmi les gènes réprimés chez les souris double KO, ils ont observé une baisse précoce de l'expression de *Bach2*, *Pax5*, et *Bcl6* et de manière concomitante une augmentation de *Prdm1*, *Irf4*, *Xbp1* et *Aicda*, renforçant la notion de répression de la différenciation menée par ces deux facteurs.

#### A-3-3- *Spi-B Transcription Factor Spib*

SPIB est un TF de 28kDa codé par le gène *SPIB* de 12kb situé sur le chromosome humain 19q13. Comme évoqué précédemment, les rôles de Spib sont redondants avec ceux de Pu.1. Néanmoins, il faut noter qu'une étude utilisant des souris *Spib*<sup>-/-</sup> a été réalisée par le groupe de Celeste-Simon en 1997<sup>160</sup>. Chez ces souris, le développement lymphocytaire, myéloïde et érythrocytaire est normal, et la production basale d'immunoglobulines a bien été observée. Lors d'une stimulation T dépendante au NP-KLH (4-Hydroxy-3-nitrophenylacetyl haptent-Keyhole Limpet Hemocyanin), les auteurs ont mis en évidence une réponse primaire classique avec néanmoins une baisse de la production d'IgG2a. Lors d'une infection secondaire de la souris, les auteurs ont noté une très forte réduction de la production des IgG1, 2a et 2b caractéristique de cette réponse en temps normal. L'étude de la dynamique des GC a démontré que les GC présents chez la souris *Spib*<sup>-/-</sup> disparaissent plus rapidement que chez la souris normale. La disparition rapide de ces structures transitoires est dû à un défaut d'induction de la survie des LB normalement soutenue par la signalisation BCR. Les auteurs émettent l'hypothèse que les LB *Spib*<sup>-/-</sup> du GC sont incapables de former des clones B mémoires à longue durée de vie permettant de répondre rapidement à la deuxième stimulation antigénique.

#### A-3-4- *ETS Like-1 protein Elk1*

ELK1 est un TF de 44kDa codé par le gène *Elk1* retrouvé sur le chromosome humain Xp11.23. Peu d'études relatent le rôle de Elk-1 dans la différenciation plasmocytaire. La première est celle de Yasuda et ses collaborateurs<sup>161</sup>, qui ont généré des souris double-déficientes pour les gènes *Mapk1* et *Mapk3* codant pour les protéines Erk1 et Erk2. Ces deux protéines font partie de la signalisation ERK et sont notamment activées par la signalisation BCR. Lors d'une réponse immunitaire T dépendante, les auteurs ont observé l'absence de production d'IgG1 chez les souris double KO. Néanmoins, ces deux protéines semblent avoir des rôles redondants, mis en évidence par la disparition de ce phénotype dans les simple KO. *In vitro*, suite à la mise en évidence que *PRDM1* était fortement augmenté chez les LB double KO, les auteurs se sont intéressés à l'implication des facteurs sous-jacents de la signalisation ERK dont fait partie ELK1. En utilisant une expression forcée d'un dominant négatif de Elk1, ils ont mis en évidence que

l'inhibition de cette protéine entraînait l'absence d'induction de *Prdm1* et donc une forte diminution des plasmocytes. N'ayant pas effectué d'expérience de ChIP, la régulation directe de *Prdm1* par Elk1 n'a pas pu être mise en évidence. Sur ce dernier point, les résultats de notre équipe apportent un élément de réponse sur l'existence d'un mécanisme impliqué dans la régulation indirecte de PRDM1 par ELK1 dans les LB humains. *In vitro*<sup>162</sup>, les LB en cours d'activation expriment fortement BACH2 (BTB and CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper transcription factor 2), qui est l'un des répresseurs majeurs de *Prdm1*<sup>163,164</sup>. H. Symington & C. Delaloy ont démontré que la régulation dynamique du gène *BACH2* était sous contrôle de l'axe IL-2/ERK/ELK1, ELK1 se liant dans une région enhancer de *BACH2*. Dans ce modèle, l'utilisation d'un siARN inhibant l'expression de ELK1 restaure l'expression de *BACH2* au troisième jour d'activation des LB impactant négativement la différenciation des cellules en plasmocytes. Le modèle proposé est celui dans lequel BACH2 est dynamiquement régulé par l'activité transcriptionnelle de ELK1 qui se fixe dans une région régulatrice de l'intron 1 du gène humain, conservée avec la souris. Plus particulièrement, le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs en fonction de l'état de phosphorylation de ELK1 permet de moduler finement l'expression de ce TF et ainsi d'orienter la destinée de la cellule vers l'apoptose ou la différenciation. Ces expériences sont présentées dans la première partie de la section résultats de ce manuscrit.

#### A-4- Paired box protein 5 Pax5

PAX5 est un TF de 42kDa codé par le gène *PAX5* de 202kb situé sur le chromosome humain 9p13. Pax5 est un régulateur transcriptionnel très actif dans la différenciation lymphocytaire B.<sup>165</sup> La souris *Pax5<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>Cre</sup>* présente une baisse d'expression de l'IgD, CD19, Blnk et de Ig $\alpha$  qui est corrélée à un déséquilibre du nombre de LB périphériques sûrement en lien avec une dérégulation des signaux de survie fournis par le BCR. Cependant l'expression de CD138, CD25 et CD93, qui chez la souris sont des marqueurs d'activation et de différenciation, est plus importante chez les LB folliculaire *Pax5<sup>-/-</sup>* sans pour autant que les cellules produisent une Ig commutée, ni qu'elles acquièrent les caractéristiques morphologiques d'un plasmocyte. Les auteurs décrivent donc que la délétion de *Pax5* n'est pas suffisante pour promouvoir totalement la différenciation terminale des LB, bien que ces cellules semblent engagées dans cette voie<sup>166</sup>. Outre son rôle dans la phase précoce de la différenciation, le groupe de

Busslinger <sup>167</sup> a démontré que Pax5 était capable de promouvoir l'expression de nombreux gènes (170 gènes validés dans le modèle) dont *BACH2*, *IRF8*, *SPIB*, et *IRF4* qui sont pour les trois premiers des régulateurs négatifs de la différenciation plasmocytaire, mais aussi de nombreuses fonctions, confirmant par exemple la régulation de la signalisation BCR évoquée précédemment, les capacités d'interaction du LB avec son environnement et la régulation du cycle cellulaire.

Récemment, la collaboration entre les groupes de Allan et Nutt a permis d'obtenir une vision très large des rôles de Pax5 dans la régulation de l'organisation du génome au cours de la différenciation lymphocytaire B. En couplant des données d'architecture du génome (Hi-C) permettant d'évaluer les interactions qui existent entre des fragments d'ADN du génome et des données de CHIP sequencing permettant de connaître les positions des sites de liaisons de Pax5 à l'ADN, les auteurs ont mis en évidence qu'en plus d'un rôle de régulation de la transcription, il possède un rôle dans l'organisation du génome de la cellule B <sup>168</sup>. En comparant les différentes régions d'interactions du génome ils ont mis en évidence que plus de 10 000 interactions du génome étaient différentes entre le stade folliculaire et le stade plasmablastique relatant une régulation à l'échelle architecturale. Concernant le rôle de Pax5 dans cette réorganisation, ils ont mis en évidence qu'il y avait une corrélation entre la perte du site de liaison de Pax5 à l'ADN et la perte d'interaction de cette région avec d'autres régions du génome. L'inverse est aussi vrai, lors de l'acquisition d'une liaison de Pax5 dans cette région, la région d'ADN établit plus d'interactions avec d'autres régions. L'organisation spatiale du génome étant un élément de régulation de l'expression génique <sup>169</sup>, cela élargit les rôles potentiels de Pax5 dans ce contrôle de la différenciation.

#### A-5- *BTB And CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper Transcription Factor 2 BACH2*

BACH2 est un TF de 92 kDa codé par le gène *BACH2* de 370kb retrouvé sur le chromosome humain 6q15. L'intérêt pour ce TF dans la différenciation terminale du LB provient d'une étude publiée dans *Nature*, en 2004, par le groupe d'Igarashi <sup>170</sup>. Au cours de cette étude, ils se sont intéressés à la différenciation terminale des LB chez une souris *Bach2*<sup>-/-</sup>. Chez ces souris, le développement des LB semble être affecté lors de la sortie des LB de la moelle avec une réduction du nombre de LB circulants et de LB matures (IgM<sup>low</sup> IgD<sup>hi</sup>) dans la rate. En condition basale, lors du dosage des Ig présentes dans le plasma, les auteurs ont retrouvé une

proportion d'IgM plus importante dans les souris *Bach2*<sup>-/-</sup> et une absence des Ig commutées. Ces observations ont été retrouvées lors d'une immunisation T dépendante ou T indépendante. Par ailleurs, après infection, l'analyse de l'affinité des Ig produites révèle une fréquence de mutation faible dans les Ig caractérisant un défaut dans la commutation de classe mais aussi dans l'hypermutation somatique nécessaire à la production d'Ig très affines pour l'antigène. Ces données s'expliquent par l'absence de GC mise en évidence chez les souris *Bach2*<sup>-/-</sup>. L'étude *in vitro* de l'expression des gènes chez des LB spléniques cultivés avec du LPS pendant deux jours révèle une augmentation forte de marqueurs de l'identité plasmocytaire comme *Prdm1*, *Irf4*, ou *Xbp1*, et aucun effet sur l'expression de *Bcl6* ou *Pax5*, mais une forte diminution de l'expression d'*Aicda* pouvant expliquer les défauts de maturation des Ig chez ces cellules *Bach2*<sup>-/-</sup>.

Un mécanisme du rôle de Bach2 dans la commutation de classe a été par la suite proposé par la même équipe<sup>171,172</sup>, démontrant qu'en association avec Bcl6, Bach2 réprime l'expression de *Prdm1*. Cette répression ouvrirait une fenêtre d'expression de *Aicda* codant AID (Activation-induced cytidine deaminase) enzyme impliquée dans les évènements de commutation de classe et d'hypermutation somatique nécessaire pour augmenter l'affinité des Ig produites. Ainsi, une répression trop précoce de *Bach2* entraîne une augmentation rapide de *Prdm1* et une répression directe de *Aicda* par Blimp-1 limite ces deux évènements. Mes travaux de thèse apportent un nouvel argument en faveur d'une régulation directe de l'expression d'*ID2* (DNA-binding protein inhibitor 2) par BACH2<sup>162</sup>. ID2 inhibe E2A impliqué dans le contrôle de l'expression d'*AICDA*<sup>173,174</sup>. Ainsi BACH2 pourrait maintenir l'expression d'AID en réprimant ID2 dans le LB activé.

Une partie de mes travaux de thèse se sont attachés à comprendre les mécanismes de régulation de ce TF et ses gènes cibles à l'aide d'un modèle de différenciation *in vitro* de LB humains. Les résultats obtenus confirment le rôle majeur de BACH2 dans le verrouillage des processus de différenciation terminale des LB matures et apportent de nouvelles informations sur les mécanismes impliqués (Résultats – [Projet 1](#)).

Par ailleurs, l'implication de BACH2 dans la lymphomagénèse est suggérée par différentes études relativement récentes qui seront détaillées dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

## B- Les acteurs de l'identité plasmocytaire

BLIMP1 est un TF de 91 kDa codé par le gène *PRDM1* de 23kb situé sur le chromosome humain 6q21. *Prdm1* est l'un des 19 membres de la famille des gènes à domaine PR/SET. Ce domaine protéique permet de recruter des méthyltransferases et ainsi de réprimer l'expression des gènes ciblés. BLIMP1 possède aussi une région centrale riche en proline, ainsi que 5 domaines de type doigts de zinc. Ces domaines d'interaction lui permettent de recruter de nombreux co-répresseurs de la transcription comme les histone-déacétylases 1 et 2 par exemple <sup>175</sup>.

Le rôle de ce TF dans la différenciation terminale des LB a été mis en évidence très tôt, puisqu'en 1994 l'équipe de Davis <sup>176</sup> rapportait l'augmentation de CD138, ainsi qu'un changement de taille et de granulosité (marqueurs d'une cellule différenciée et ayant une forte activité de production protéique) chez des lignées B possédant une surexpression forcée de *Prdm1*. En outre, l'arrêt du cycle cellulaire rencontré dans les cellules différenciées a été expliqué par une répression de *Myc* par Blimp-1<sup>177</sup>. En 2000, le groupe de Calame a mis en évidence *in vivo* l'expression de Blimp-1 chez des cellules CD138<sup>+</sup> issues de différenciation T dépendante et T indépendante. Ils mettent en évidence que certaines cellules du GC commencent à exprimer Blimp-1, ces cellules n'exprimant plus *Bcl6*, mais exprimant *Irf4* et *SDC1* (codant pour le CD138). Ils concluent que ces cellules seraient sur le point de quitter le GC en acquérant un phénotype de différenciation. En sortie du GC l'expression de Blimp-1 est restreinte aux cellules plasmocytaires et est absente des LB mémoires produits. Afin de mieux évaluer la temporalité de l'expression de Blimp-1 ainsi que son rôle dans la différenciation terminale le groupe de Stephen Nutt a généré une souris Blimp1-GFP permettant de suivre les cellules exprimant cette protéine, et les cellules déficientes pour Blimp-1 mais fluorescentes *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> <sup>178</sup>. L'observation d'une faible quantité d'immunoglobulines dans les souris déficientes pour Blimp-1 les a poussés à évaluer les capacités de différenciation de ces cellules Blimp-1 négatives. Ils ont mis en évidence que le développement d'un stade pré-plasmablastique était possible en l'absence de Blimp-1 ce qui suggère un modèle où la répression de *Pax5* va précéder l'expression de *Prdm1* permettant d'engager la cellule vers la voie de différenciation. L'expression progressive de Blimp-1 permet l'extinction complète de *Pax5* générant ainsi des cellules complètement différenciées. Ainsi, Blimp-1 est un marqueur de cellules très avancées dans la différenciation et caractérise le stade terminal de ce processus. Il n'est donc pas étonnant que l'équipe de Louis Staudt<sup>179</sup> lui ait trouvé un rôle de



répresseur sur bon nombre de gènes caractérisant l'identité de cellules B ou B activées comme *Ciita*, *Spib*, *Id3*, *Pax5*. D'autres études ont confirmé ce rôle répresseur pour *Pax5*<sup>180</sup>, ainsi que des rôles de maintien de survie, de régulation de la production des Ig mis en évidence par l'équipe de Nutt en 2016<sup>181</sup>.

#### B-2- -Interferon regulatory factor 4 IRF4

Tout comme *Irf8*, *Irf4* fait partie des TF recrutés sur les domaines de reconnaissance à l'interféron. C'est une protéine de 52 kDa codée par le gène *IRF4* retrouvé sur le chromosome humain 6p25.3. Au sein du réseau « commun » de gènes régulant la différenciation, c'est celui qui possède le profil d'expression le plus atypique, à la fois nécessaire à la formation du GC sans pour autant y être exprimé, puis nécessaire à la transition vers une cellule productrice d'anticorps. Le premier KO de ce TF a été réalisé en 1997 par l'équipe de Mak<sup>182</sup>. Bien que le développement médullaire soit normal, la maturation des LB périphériques ainsi que la génération de GC et de plasmocytes n'ont pas été retrouvées. Ces données ont été confirmées par Willis et ses collaborateurs<sup>183</sup>. L'utilisation d'une souris *irf4<sup>fl/fl</sup> Cd23<sup>Cre</sup>* leur a permis de déléter spécifiquement *Irf4* dans des LB matures et cette délétion a pu être suivie grâce à l'activation d'un gène rapporteur eGFP chez les cellules déplétées en *Irf4*. Chez ces souris, la formation de GC suite à une infection T dépendante n'est pas présente, et en évaluant la proportion de cellules fondatrices du GC, ils ont mis en évidence que les LB ne présentaient pas de marqueurs d'engagement vers la réaction du GC et que donc *Irf4* était un facteur nécessaire à cette étape, bien que son niveau d'expression soit faible. Afin d'évaluer les rôles de ce TF dans la phase terminale du GC, Klein et ses collaborateurs ont utilisé un système similaire de délétion d'*irf4*, mais cette fois-ci couplé à l'utilisation d'une Cre sous contrôle du promoteur de région constante de l'immunoglobuline de type  $\gamma 1$ . Chez cette souris, la Cre recombinase s'exprime donc chez les LB exprimant une IgG1 et une petite fraction de cellules exprimant d'autres Ig (expliqué par le fait qu'un LB peut transcrire plusieurs chaînes lourdes avant d'effectuer la commutation de classe<sup>184</sup>). Chez cette souris, après immunisation aux globules rouges de mouton (Sheep Red Blood Cells SRBC), la souris déficiente pour *Irf4* ne présente pas de plasmocytes circulants ou nichés dans la moelle. *In vitro*, en utilisant des LB *Irf4<sup>-/-</sup>* stimulés aux CD40L+IL-4, les auteurs ont monitoré l'apparition des transcrits « germline » et « post-commutés » pour évaluer le moment où la défaillance d'*Irf4* empêchait

la commutation de classe. En l'absence d'Irf4, les auteurs ont retrouvé une expression normale du transcript germline  $\gamma 1$  mais une absence du transcrit post-commutation. En monitorant l'expression d'*Aicda* nécessaire à la commutation de classe, les auteurs ont mis en évidence un défaut d'expression de ce gène suite à la stimulation pouvant expliquer le défaut de CSR (Class Switch Recombinaison) observé. Ce rôle de Irf4 dans la CSR et la fin de différenciation a été confirmé par Sciammas et ses collaborateurs <sup>185</sup>, mettant en évidence que l'expression forcée de *Aicda* ou *Prdm1* dans des LB *Irf4*<sup>-/-</sup> restaure la capacité de commutation de classe et de sécrétion respectivement. De manière intéressante, ils démontrent qu'une induction faible de Irf4 entraîne la transcription de *Aicda* et la commutation de classe en découlant, et qu'une induction forte de l'expression d'Irf4 corrèle avec la présence du marquage CD138 à la surface des cellules. Les données de séquençage et d'immuno-précipitation de la chromatine mettent en évidence le rôle important de la régulation transcriptionnelle sous-jacente à l'expression de *Irf4*, et aussi sa liaison dans le promoteur de *Prdm1* activant sa transcription.

### B-3- X-Box Binding Protein 1 XBP1

Le gène *XBP1* est localisé sur le chromosome 22q12 humain, il code pour une protéine de 40kDa, faisant partie de la famille des TF CREB/ATF basic leucine zipper. Xbp1 joue un rôle particulièrement important dans l'homéostasie cellulaire du LB différencié lors du stress du réticulum endoplasmique (RE) induit par la production massive d'Ig. Devant cette production massive, la cellule va accumuler des protéines avec une mauvaise conformation dans son RE activant les voies de l'UPR (Unfolding protein response UPR) et limitant cette accumulation. Parmi les trois voies régulant la réponse au stress du RE (IRE1 $\alpha$ , PERK, ATF6), il a été démontré que la voie ATF6 permettait la transcription de *Xbp1*, et que l'activation de la voie IRE1 $\alpha$  entraînait l'épissage alternatif de cet ARNm pour augmenter son activité transcriptionnelle. Cette forme courte (*Xbp1s*) va ainsi pouvoir promouvoir l'augmentation de l'activité du RE pour maîtriser l'emballement (augmentation du trafic des protéines, production de plus de protéines chaperonnes, augmentation de la taille du RE et de la taille de la cellule)<sup>186,187,188</sup>. Ainsi, Xbp1 semble être un facteur de la différenciation plasmocytaire agissant dans les stades finaux de la différenciation. Cette notion a été confirmée par la mise en évidence de la régulation positive de son expression par Irf4 et Blimp-1, surtout exprimés

lors de ces derniers stades<sup>188,189</sup>, avec notamment une augmentation de l'expression de *Atf6* et de *Ern1* (composant de IRE1alpha) grâce à l'induction de Blimp-1 permettant la production et l'épissage de *Xbp1*<sup>181</sup>. Todd et ses collaborateurs<sup>190</sup> ont confirmé cela en utilisant une souris *Xbp1<sup>fl/fl</sup>CD19<sup>Cre</sup>* où les LB spléniques semblent normaux. Néanmoins les taux d'Ig circulants sont nuls en condition normale, en stimulation T dépendante et T indépendante. *In vitro*, la stimulation des B spléniques avec du LPS pendant 3 jours démontre classiquement une répression de l'identité B (*Bcl6*, *Pax5*...) et une expression progressive des marqueurs de différenciation (*Prdm1*, *Irf4*). Ils démontrent aussi l'apparition *in vivo* d'une population CD138+ suite à une immunisation T dépendante mais sans sécrétion d'Ig chez les *Xbp1* KO. Beaucoup d'études ont donc étudié *Xbp1* comme un important facteur dans la régulation de la production des Ig. Parallèlement Shaffer et ses collaborateurs<sup>188</sup> ont mis en évidence 48 gènes différemment régulés lors de l'absence de *Xbp1* (ces gènes étant largement aussi régulés par Blimp-1, le KO de *Xbp1* n'entraîne pas forcément de phénotype). Seulement 2 gènes ont été identifiés comme régulés par *Xbp1* et non redondants avec une régulation de Blimp-1 (*Slc305* et *Arhq* faisant partie de la réponse du RE). Néanmoins il faut nuancer cela car ces données ont été générées avec des puces d'expression ne couvrant pas l'intégralité du transcriptome. Il existe donc potentiellement d'autres cibles non visibles ici. Shen et Hendershot<sup>191</sup> ont par exemple confirmé la régulation positive de la liaison de *Xbp1* sur le promoteur de *Pou2af1* (gène de l'identité différenciée) favorisant son expression.

#### B-4- OCT-Binding Factor 1 (OBF1)

Le gène *POU2AF1* est un gène de 103kb situé sur le chromosome 11.q23.1 humain. Il code pour OBF1, cofacteur des TF OCT1 (codé par *SLC22A1*) et OCT2 (codé par *POU2F2*). Deux isoformes ont été décrites p34 et p35<sup>192</sup>. OBF1 a dans un premier temps été mis en évidence pour sa liaison avec OCT1 ou OCT2 sur des octamères présents dans les promoteurs des Ig (ATGCAAAT). Bien qu'il soit dispensable pour la transcription de celle-ci<sup>192</sup>, OBF1 possède des rôles dans la formation des cellules productrices d'anticorps. Chez la souris *Obf1<sup>-/-</sup>* une réduction importante des LB matures périphériques a été observée<sup>193,194</sup>. Malgré cela, des cellules B matures sont présentes chez ces souris<sup>192</sup>. De manière intéressante, les souris *Obf1<sup>-/-</sup>* sont incapables de former une réponse du GC lors d'une infection. Les premières explications de ce phénomène ont été rapporté par Corcoran et ses collaborateurs<sup>195</sup>. En

utilisant un modèle de culture *in vitro* des LB spléniques issus de souris *Obf1*<sup>-/-</sup> et de souris WT, ils ont mis en évidence que l'absence d'*Obf1* faisait perdre la capacité des LB de proliférer en réponse au CD40L+IL-4 et de se différencier en PC CD138<sup>+</sup>. En revanche, les auteurs ont mis en évidence l'accumulation *in vivo* d'une population ayant proliféré, CD138 intermédiaire (CD138<sup>int</sup>). L'analyse des capacités de commutation de classe des cellules CD138<sup>int</sup> a démontré qu'elles étaient capables d'effectuer la CSR mais qu'elles étaient incapables de sécréter les immunoglobulines transcrites. Enfin l'analyse de l'expression génique des cellules CD138<sup>int</sup> a démontré qu'elles gardaient une identité LB forte avec le maintien de l'expression de *Bcl6* et *Pax5* et qu'elles n'augmentaient pas l'expression de *Prdm1* et de *Irf4*. Ainsi l'absence de *Obf1* semble bloquer la transition d'un LB proliférant vers une cellule différenciée.

Par la suite Bartholdy et ses collaborateurs <sup>196</sup> ont décrit que la liaison d'Obf1 dans le promoteur alternatif P2 de *Spib* entraînait sa transcription. Bien que la souris *Spib*<sup>-/-</sup> présente des GC, il n'est pas à exclure que Obf1 participe à la régulation de plusieurs acteurs de la réaction du centre germinatif et que la dérégulation de ces acteurs entraîne l'absence des GC. Ainsi, Obf1 semble avoir un rôle de promotion de la réaction du GC, mais aussi de promotion de la différenciation des cellules. Parallèlement, dans un modèle de culture *in vitro* de LB spléniques de souris *Obf1*<sup>-/-</sup>, Siegel et ses collaborateurs ont démontré la déstabilisation de la protéine Syk en absence d'Obf1. Par la suite, ils ont démontré une liaison directe entre les deux isoformes de Obf1 et Syk. Plus particulièrement, ils démontrent que la présence d'Obf1 limite l'accumulation de phosphorylation sur la sérine 317 de Syk. Cette phosphorylation permet la dégradation de Syk par Cbl. Il serait intéressant d'utiliser des KO conditionnels de ce gène sous contrôle de l'enzyme Cre-recombinase exprimée au temps précoce de la différenciation telles que CD23-Cre (stade transitionnel) et CGamma1-Cre ou AID-Cre (stade GC) pour dissocier les effets précoces des effets tardifs.

## II- La différenciation extrafolliculaire

### A- Différenciation T indépendante

#### A-1- Les LB de la zone marginale

La différenciation extrafolliculaire T indépendante ne requiert pas l'aide d'un LT pour aboutir à la formation d'une cellule sécrétrice d'anticorps. La réponse aux antigènes bactériens encapsulés peut être initiée par les lymphocytes B1 chez la souris (mais dont l'existence chez

l'homme fait encore débat, certaines études relatant leur lien avec les pré-plasmablastes<sup>197</sup> et d'autres non<sup>198</sup>) et par des cellules B particulières que sont les LB de la zone marginale (Marginal zone MZ). Ils sont retrouvés dans de nombreux organes lymphoïdes (GALT, amygdales) mais principalement dans la rate qui leur fournit une position idéale pour effectuer leur veille immunologique. L'ontogénie des LB de la MZ a longtemps suscité l'intérêt des groupes de recherche avec pour difficultés la complexité de la MZ qui est le lieu d'un trafic dense de cellules B (LB de la zone marginale, LB mémoire quittant le GC...), et l'existence de différences entre les études menées chez la souris et chez l'homme. Chez l'homme comme chez la souris, les LB de MZ ont un phénotype commun IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>CD27<sup>+</sup>. Outre leur présence dans la rate, chez l'homme une contrepartie circulante a été retrouvée (environ 50% des LB circulants CD27<sup>+</sup><sup>199</sup>). Contrairement à la souris, les LB humains de la MZ possèdent des mutations dans les chaînes IGHV de leurs BCR.

La présence du CD27 couplée aux mutations somatiques présentes dans les Ig de ces cellules a dans un premier temps orienté l'idée que ces cellules seraient des LB mémoires IgM sortis du GC où ils auraient acquis ces mutations<sup>199</sup>. Cette vision de la différenciation a été controversée par une étude démontrant la présence de cellules circulantes IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>low</sup>CD27<sup>+</sup> chez des patients souffrant d'une perte de fonction du CD40 ou CD40L inhibant la formation des GC<sup>200</sup>. Par ailleurs, l'analyse du répertoire des cellules B démontre une restriction de répertoire des LB mémoires (dû à une expansion clonale) et à l'inverse un répertoire très diverse chez les naïfs et les cellules de la MZ<sup>201</sup>, et l'absence de relation clonale entre les LB de la MZ et les LB mémoires commutés<sup>202</sup>. Chez la souris, il a été mis en évidence que les lymphocytes transitionnels pouvaient générer des LB folliculaires ou des LB de la MZ, cette bifurcation étant orchestrée par la signalisation NOTCH2 et la force du signal BCR orientant la différenciation vers le devenir LB de la MZ<sup>203,204</sup>. En s'inspirant de cette idée, Descatoire et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de précurseurs des LB de la zone marginale dans la rate. Ces précurseurs expriment une forme particulière du CD45 (O-glycosylation) détectée par l'anticorps MEM55. Au sein de la population MEM55<sup>+</sup>, une population exprime la P-glycoprotéine transmembranaire ABCB1 (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1), de la famille des ATP binding cassette transporteurs, et l'autre non. Grâce à des études *in vitro* de co-cultures de ces populations avec une lignée exprimant le ligand de NOTCH2, DLL1, les auteurs ont mis en évidence que ces cellules pouvaient générer des cellules CD27<sup>+</sup> possédant

des similarités transcriptionnelles avec les LB de la zone MZ. L'expression du transporteur ABCB1 marquant un stade de différenciation plus avancé de ces précurseurs des MZ.

En 2018, Zhao et ses collaborateurs<sup>205</sup> ont apporté de nouvelles données faisant le lien entre les études précédentes. Ils ont dans un premier temps utilisé la cytométrie de masse et 35 marqueurs pour visualiser les populations B de trois organes : les amygdales, les GALT, ainsi que la rate. L'utilisation de l'algorithme SPADE a permis de regrouper les cellules ayant des profils d'expression similaires. De manière intéressante, dans les trois tissus, les cellules naïves, les cellules IgM+IgD+CD27+ CD45+ et IgM+IgD+CD27+ sont toujours retrouvées proches, mettant en avant un lien fort entre ces trois populations, relation non retrouvée avec les autres populations (dont les mémoires commutés). L'absence de parenté entre les cellules mémoires commutés et les LB de la MZ a été renforcée lors de l'utilisation de l'Hyperion (imagerie de spectrométrie de masse permettant de visualiser la localisation de multiples marqueurs sur une coupe), où les localisations des deux populations étaient très distinctes dans l'organe lymphoïde. Enfin, concernant l'acquisition des mutations dans les segments IGHV, en séquençant les Ig des différentes sous populations, ils ont mis en évidence que les LB de la MZ partageaient des clones avec des LB IgM+ de GC retrouvés dans différents organes, traduisant la grande mobilité des clones B. Ils décrivent donc un modèle où les LB de la MZ diversifient leurs BCR en acquérant des mutations grâce au GC.

L'absence d'expression d'AID dans les LB de la MZ chez l'adulte est cohérent avec les données de S.Weller et ses collaborateurs<sup>206</sup>, mais diverge des données retrouvées chez l'enfant de moins de deux ans et des données de différenciation *in vitro* où son expression est détectée. Cela met en évidence qu'il existe probablement une hétérogénéité des mécanismes de maturation de ces cellules.

#### *A-2- Mécanismes d'activation et de différenciation des lymphocytes B de la zone marginale*

Deux types d'agents immunogènes sont connus pour induire une réponse T indépendante extrafolliculaire : les antigènes de type 1 et 2 (antigène T Indépendant TI-1, TI-2). Les TI-1 sont des agents mitotiques permettant la production d'Ig polyclonales par les LB. C'est par exemple le cas du lipopolysaccharide bactérien (LPS) qui active le LB de la zone marginale grâce à sa liaison sur TLR4. La réponse TI-2 est quant à elle générée par des motifs répétés retrouvés sur

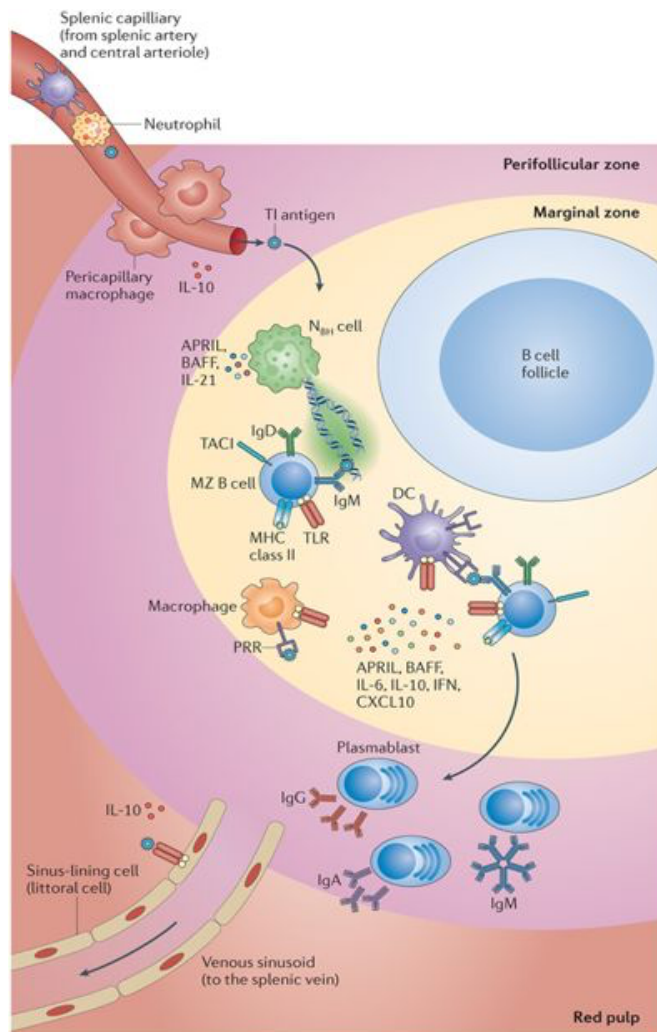
des particules virales ou à la surface des bactéries permettant d'agréger plusieurs BCR à la surface de la cellule B et ainsi d'induire un signal BCR très fort. Outre l'expression du BCR et TLRs par ces cellules, les LB de la MZ expriment aussi de forts taux de CD21/CD35 permettant de reconnaître les antigènes opsonisés par les éléments du complément ainsi que de potentialiser la signalisation BCR<sup>207,208,209</sup>.

Chez l'homme la délimitation de la zone marginale étant difficile (absence du sinus marginal), cela n'a pas permis de mettre en évidence des macrophages CD169<sup>+</sup> de la zone marginale qui chez la souris participent à la présentation des antigènes. Ces différences avec la souris ont conduit à des interrogations concernant l'accès aux antigènes pour les LB de la MZ. De par la structure de la rate, les LB de la MZ peuvent avoir un accès direct aux antigènes circulants. Par ailleurs, les neutrophiles présents dans l'environnement splénique jouent un rôle important dans l'activation du LB de la MZ (Figure 9). En effet, lors d'une infection menant à une réponse T-indépendante, les neutrophiles spléniques peuvent interagir avec les LB de la MZ grâce à de grandes projections d'ADN constituant le NET (Neutrophil Extracellular Traps), un système permettant de piéger les bactéries. Par ailleurs, ces neutrophiles spléniques ont la capacité d'activer les cellules B grâce à des liaisons physiques avec l'engagement de BAFF et d'APRIL, induisant la survie des cellules, mais aussi des signaux solubles avec la production d'IL-21. Lors de l'analyse du répertoire B des cellules adjacentes aux neutrophiles, il a été mis en évidence qu'une commutation de classe pouvait s'effectuer vers la production d'IgG ou d'IgA. Le mécanisme produisant la commutation de classe est dû à l'association entre TACI et les protéines transductrices de la signalisation TLR (MyD88-IRAK-1-IRAK-4-TRAF6-TAK1-IKK). Il a été démontré que cette association active la voie NFκB permettant la production du transcrite « germline » C<sub>H</sub> ainsi que d'*Aicda* nécessaire à la commutation de classe sans l'intervention d'un signal T dépendant.<sup>210</sup> Les cellules dendritiques peuvent aussi participer à l'activation de ce LB, en effet des DC DEC<sup>+</sup> sont localisées à la frontière de la pulpe blanche et rouge et pourraient capturer des antigènes circulants afin de les présenter aux LB<sup>211</sup>.

Ainsi, après la rencontre avec l'antigène, la réponse T-indépendante génère très rapidement des plasmablastes. *In vitro*, chez la souris, une stimulation des LB de la MZ au LPS permet de générer en 48h des cellules exprimant le marqueur plasmocytaire CD138 à leur surface, cette capacité de différenciation n'est pas retrouvée chez les LB folliculaires<sup>212</sup> (Figure 10). Chez la souris, la différenciation terminale des LB de la MZ est favorisée par une activation continue de CXCR4. En effet, Alouche et ses collaborateurs<sup>213</sup> ont démontré cela dans un modèle murin

ou la mutation CXCR4<sup>+1013</sup> empêche la désensibilisation du récepteur et donc entraîne une stimulation continue en présence de CXCL12. Dans ce modèle, la différenciation terminale en plasmablastes est facilitée chez les LB de la MZ mutés pour CXCR4. Chez ces cellules, la répression de Bach2 et l'augmentation de Prdm1 est plus rapide que chez les cellules WT.

**Figure 10 : Réponse T indépendante par les LB de la zone marginale.** Les antigènes T indépendants pénètrent dans la zone marginale via la zone perifolliculaire. Dans la zone marginale, les antigènes libres peuvent être captés dans un réseau d'ADN excrété par les neutrophiles helper (B-cell helper neutrophiles N<sub>BH</sub>). L'antigène peut aussi être capté par des macrophages ou des DC résidents. Les cellules captant l'antigène vont pouvoir le présenter aux LB de la zone marginale. Cette présentation sera renforcée par la présence de signaux de renforcement de l'activation (BAFF, APRIL, IL-21). Sous l'influence de ces signaux les LB de la zone marginale pourront se différencier en plasmocytes à courte durée de vie sécrétant des IgM, IgG, IgA (Cerutti et al. 2013<sup>208</sup>).



Nature Reviews | Immunology

Contrairement à la réaction du GC, la production de plasmablastes est très rapide. Après infection à *S.pneumonia*, ils apparaissent au bout du 3<sup>ème</sup> jours alors que dans le cas d'une réaction GC dépendante, l'architecture de ce dernier n'est pas encore visible dans le follicule B<sup>214</sup>. Cette capacité de se différencier rapidement peut être expliquée par différents mécanismes intrinsèques au

LB de la MZ. Dans un premier temps, l'expression basale de Blimp-1 est plus importante chez ces cellules que chez leurs contreparties folliculaires. Une étude publiée en 2017 par le groupe de Cerutti<sup>215</sup> a apporté des données sur les transcriptomes des populations de LB, de la MZ et folliculaire, chez la souris. Comme décrit précédemment, les LB de la MZ ont une expression forte des récepteurs TACI et des TLR. Les auteurs ont mis en évidence que TACI pouvait interagir et activer la voie mTOR (mammalian Target Of Rapalycin mTOR) et que cela allait participer à l'induction de la différenciation, mais aussi à la CSR. Là encore cette étude démontre le lien fort qui existe entre



les signalisations TACI et TLR dans les LB de la zone MZ promouvant la différenciation terminale. L'activation de la voie mTOR va faciliter l'état de pré-activation de ces LB, en réprimant notamment l'expression de BACH2, FOXO1 et en augmentant l'expression de MYC, PRDM1, BHLHE41 qui sont autant de facteurs promouvant la différenciation des cellules B en plasmocytes.

Par la suite, les plasmocytes générés vont rester dans la rate et produire des quantités importantes d'Ig. Leur durée de vie limitée (< 6 jours) ne semble pas être liée à un mécanisme caspase dépendant. En effet Auner et ses collaborateurs<sup>216</sup> ont mis en évidence l'absence d'activité des caspases 3 et 9 chez des cellules différenciées à courte durée de vie. Ils évoquent un modèle où cette déficience en caspase effectrice permettrait une production accrue des Ig, en « acceptant » un taux de protéines mal repliées plus important. Dans la fin de la vie du plasmocyte, l'apoptose serait médiée par une voie dépendante du stress du RE, mais le mécanisme entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et donc la mort cellulaire n'est pas encore connue.

#### B- La différenciation T dépendante

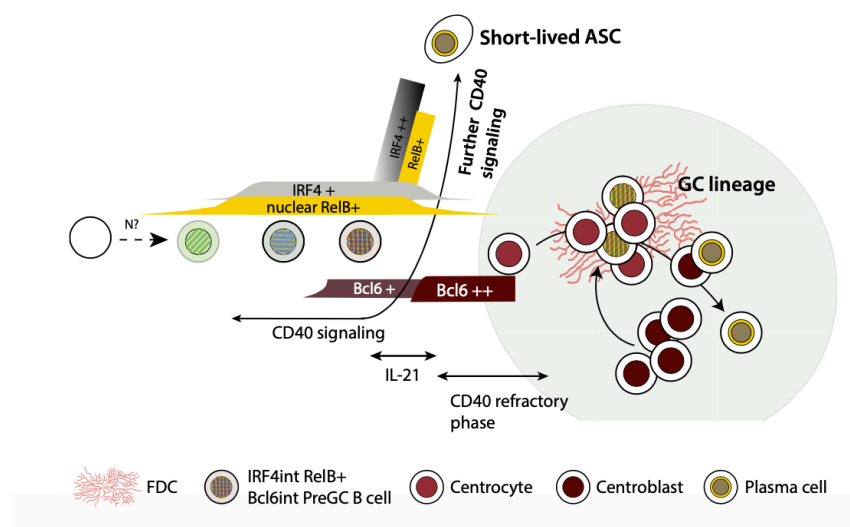
La différenciation extra folliculaire T dépendante démarre donc avec un LB naïf ayant rencontré un antigène. Cette rencontre va permettre l'activation du récepteur EB12 qui, grâce à un gradient d'expression de son ligand (l'oxysterol), va orienter la cellule vers l'extérieur du follicule. Le rôle de ce mouvement cellulaire n'est pas très bien défini, il serait possible que le LB y rencontre d'autres activateurs, mais cela reste hypothétique. Après cela, l'augmentation de l'expression du CXCR7 à la membrane de ce LB lui permet de se localiser à la frontière B/T sous l'influence des chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les cellules stromales présentes dans la zone T. Comme évoqué précédemment, ce dialogue va permettre de délivrer à la cellule B de nombreux signaux orientant son devenir. La rencontre avec le CD40L va augmenter l'expression de EB12 replaçant le LB activé vers la face externe du follicule. C'est dans cette zone que les premières divisions du LB se produiront<sup>217</sup>. Comme mis en évidence dans l'étude de Taylor et ses collaborateurs<sup>25</sup>, un LB activé peut engendrer des cellules filles retrouvées dans le centre germinatif, des cellules sécrétrices d'anticorps, des précurseurs du GC activés, ou des cellules mémoires. Confirmant les données de Paus et ses collaborateurs<sup>136</sup>

, le devenir de la cellule est lié à l'affinité de son BCR pour l'antigène avec une prévalence de différenciation extrafolliculaire pour les cellules B avec la plus forte affinité.

Bien que les connaissances concernant la bifurcation précoce des cellules activées vers une réaction extrafolliculaire ou GC dépendante ne soient pas très grandes, une récente étude de Zhang et ses collaborateurs<sup>218</sup> apporte de nouvelles données sur le rôle du CD40 dans cette bifurcation. Dans cette étude, les auteurs ont démontré la présence après 3 jours d'immunisation d'un précurseur activé caractérisé par l'expression de  $Bcl6^{int}$ ,  $Irf4^{int}$ , et  $RelB^+$ . La voie de signalisation CD40 via l'activation de la voie non canonique promeut l'expression de RelB, ce dernier est donc un bon marqueur de la rencontre avec le CD40L. Très rapidement, ces précurseurs vont entrer en division, et générer les cellules fondatrices du GC ( $Bcl6^{hi}$ ,  $RelB^-$ ,  $Irf4^-$ ) au centre du follicule, et des cellules s'orientant vers la production de plasmablastes ( $Bcl6^{low}$ ,  $RelB^+$ ,  $Irf4^{++}$ )(Figure 11). Cette dichotomie est corrélée au nombre de divisions effectuées par la cellule fille avec un nombre inférieur à 6 divisions pour les cellules fondatrices du GC. De manière intéressante, en modulant l'activation des LB précurseurs (via l'ajout d'un agoniste CD40 *in vivo* ou *in vitro* mimant une augmentation de l'interaction avec la cellule T), ils ont observé une différenciation préférentielle des précurseurs en plasmablastes et, inversement, l'ajout d'antagoniste du CD40 promeut la différenciation vers les cellules fondatrices du GC. Ainsi, une signalisation CD40 forte, relatant d'un dialogue très fort avec les cellules CD40L, engendrera une diminution de l'expression de *Bcl6* et une augmentation de *Irf4* promouvant la différenciation en plasmablastes. Devant l'hétérogénéité des signaux « disponibles » pour le LB, d'autres mécanismes orientant la bifurcation à cette étape ne sont pas à écarter. Par exemple Kim<sup>219</sup> et ses collaborateurs ont décrit que la cellule dendritique  $FC\gamma^-$  en sécrétant de l'IL-12 orientait la différenciation terminale des LB activés vers la destinée extrafolliculaire.

Parallèlement à cette production de plasmablastes, la différenciation extrafolliculaire peut générer des LB mémoires IgM. Les premières données à ce sujet ont été mises en évidence en 2002 où Toyama et ses collaborateurs<sup>220</sup> ont démontré, lors d'une réponse immunitaire secondaire, que les souris  $Bcl6^{-/-}$  (incapables de former des GC) présentaient un taux d'IgG circulant similaire à la réponse secondaire chez la souris sauvage en terme de quantité et de délai de réponse. Ils ont néanmoins relevé que l'affinité de ces IgG était plus faible que les IgG produites par des LB mémoire ayant effectués la réaction du GC. Ces données ont par la suite été confirmées par le groupe de Jenkins<sup>221</sup> qui en utilisant des transferts adoptifs a pu suivre

le devenir de cellules B activées ( $GL7^+ CD38^+$ ) donnant à la fois des cellules mémoires ( $GL7^- CD38^+ CD73^-$ ) ayant un faible taux de mutation somatique et, plus tard dans la réaction, des LB mémoires issus du centre germinatif ( $GL7^- CD38^+ CD73^+$ ). Grâce à des expériences de « pulse chase » BrdU, l'équipe de M.Schlomchik a disséqué la production de LB mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie. En effet, bien que remettant en question l'utilisation du marqueur CD73 pour discriminer les LB mémoires issus du centre germinatif, il démontre que la réponse immunitaire est composée d'une génération rapide et massive de LB mémoire IgM ou IgG de faible affinité pour l'antigène, suivi de la production de LB mémoire de forte affinité générés par le GC et enfin de la production de plasmocytes à longue durée de vie <sup>222</sup>.



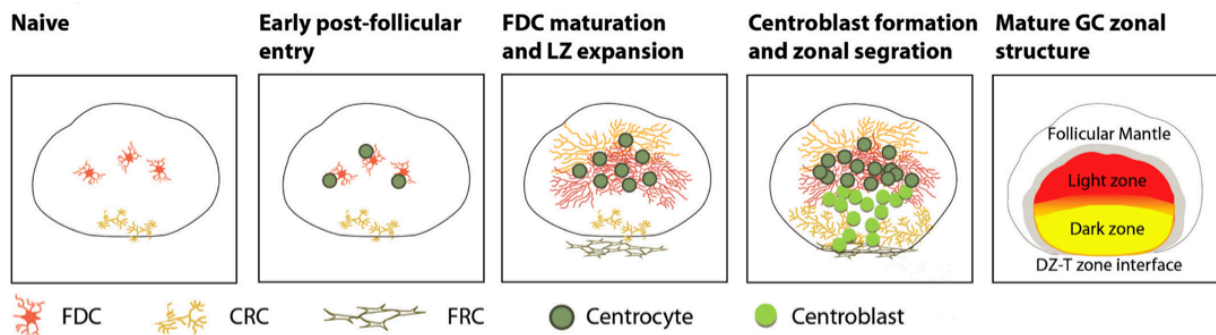
**Figure 11 : Orientation de la différenciation T dépendante.** Dans ce modèle de différenciation proposé par Zhang et ses collaborateurs, les cellules s'orientent vers la différenciation extrafolliculaire et de type GC différencient dans leur capacité de réponse au CD40L. Une réponse forte et continue du LB au CD40L permettra un maintien de l'expression de IRF4 et d'une fraction nucléaire de RELB orientant la cellule vers la différenciation extrafolliculaire. La réponse à l'IL-21 par le LB suivit d'une désensibilisation à la stimulation CD40L orientera la différenciation vers le GC. (Haberman et al. 2019 <sup>104</sup>)

### III- La réponse du centre germinatif

Le centre germinatif est une micro-structure anatomique caractérisée au microscope électronique par 2 zones définies en fonction de la densité des noyaux ; une zone sombre (Dark zone DZ) caractérisée par des LB en prolifération, appelés centroblastes (CB), et une zone claire (Light Zone LZ) ou les LB sont appelés centrocytes (CC). Cette structure est l'un des sièges de la maturation terminale des LB où grâce à des mécanismes d'hypermutation somatique (Somatic Hypermutation SHM), et de commutation de classe (Class-Switch Recombinaison CSR) l'affinité et l'efficacité des Ig produites vont être augmentées. Les cellules produites pourront être des LB mémoires ou des plasmocytes à longue durée de vie.

## A- Mise en place du centre germinatif

Les modèles murins ont apporté beaucoup de données sur la dynamique de mise en place du centre germinatif. Ainsi, 4 jours après l'immunisation, les LB précurseurs du GC ( $BCL6^{hi}$ ) ont réprimé l'expression de  $EBI2$  et de  $CCR7$  et ont augmenté l'expression de  $CXCR5$  pour répondre à  $CXCL13$  et venir au contact des FDC à l'intérieur du follicule. Au contact de ces FDC, les LB activés vont proliférer et augmenter l'expression du  $CXCR4$  les rendant sensibles au  $CXCL12$  sécrété par les CRC ( $CXCL12$ -producing Reticular Cells CRC) présentes à proximité de la zone d'interaction entre le LB et le LT. Ainsi, au septième jours, le GC est formé et polarisé<sup>104,214</sup> (Figure 12).



**Figure 12 : Mise en place du centre germinatif :** A la suite du contact entre le LB et le LT, le LB orienté vers la différenciation du centre germinatif va migrer vers les FDC présentes dans le follicule (mécanisme dépendant de  $CXCR5/CXCL13$ ). L'activation et la prolifération des LB au contact des FDC va permettre de repousser les LB résidents du follicule vers la zone du manteau. Par la suite, les LB augmenteront l'expression de  $CXCR4$ , ce qui aura pour effet de les rendre répondeurs au gradient de  $CXCL12$  sécrétée par les CRC. Au bout du 7<sup>ème</sup> jours, le GC sera polarisé<sup>214</sup>. (Haberman et al. 2019<sup>104</sup>).

## B- La zone sombre

### B-1- Les constituant de la zone sombre

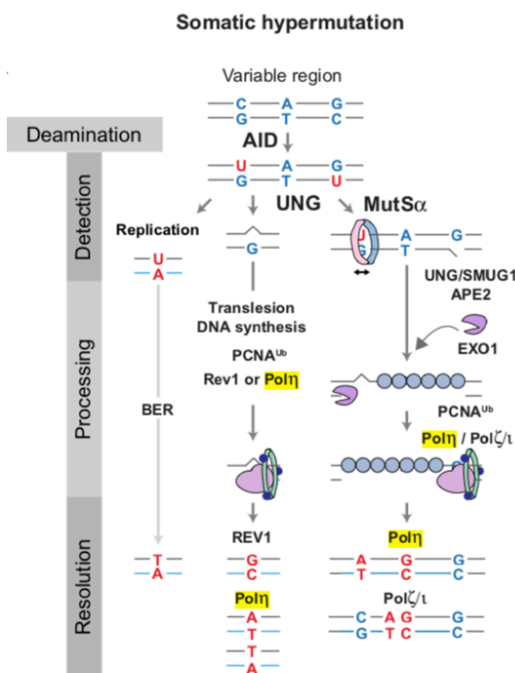
Chez la souris, le groupe de Jason Cyster a mis en évidence une population de cellules stromales produisant du  $CXCL12$  ; les CRCS ( $Cxcl12$  Reticular producing Cells), (Figure12). Ces cellules sont phénotypiquement différentes des FDC de la LZ (Light Zone), en effet elles n'expriment pas leurs marqueurs classiques ( $Vcam-1$ ,  $CD35$ ,  $CD21...$ ). Ces molécules étant décrites pour promouvoir la présentation des antigènes et l'interaction des LB et des FDC, elles ne semblent pas avoir de rôle dans la présentation des antigènes aux LB. Malgré ces différences, Rodda et ses collaborateurs ont démontré qu'elles possédaient un lignage

commun avec les FDC et les FRC, et proviendraient donc de la différenciation de cellules marginales réticulaires<sup>223</sup>. Bien que les centroblastes soient en contact avec ces cellules, leurs rôles restent mal connus, outre la sécrétion de CXCL12. Sur le versant lymphocytaire B, les centroblastes sont surtout caractérisés par l'expression de CXCR4, leur état prolifératif (*Ki67/Ccnd1/Ccnd2*), et l'expression de facteurs identitaires B (*Bcl6, Pax5, Bach2*)<sup>224,225</sup>. De plus, leurs chaînes variables des immunoglobulines vont pouvoir acquérir des mutations afin d'augmenter l'affinité de ces dernières via le mécanisme de l'hypermutation somatique. L'augmentation de Bcl6 chez ces cellules va leur permettre « d'accepter » le stress provoqué par la prolifération intense et le processus de SHM. En effet, en conditions normales, le gardien du génome p53 (Tumor protein 53, TP53 ou p53) régule l'arrêt du cycle et la mise en place des réparations de l'ADN orientant la cellule vers l'apoptose si l'accumulation des mutations est trop importante. Dans une étude publiée dans *Nature* par Phan et Dalla-Favera, il est démontré que Bcl6 régule directement l'expression de p53 afin de maintenir son niveau bas et qu'ainsi prolifération et dommage à l'ADN puissent coexister au sein du centroblaste. Malgré cela, *in vitro*, ces cellules entrent très rapidement en apoptose si elles ne sont pas mises en contact avec un signal CD40L traduisant une sensibilité à la mort accrue et leur dépendance au microenvironnement<sup>226,227</sup>.

### B-2- L'hypermutation somatique

L'hypermutation somatique est un mécanisme permettant d'induire des mutations dans les parties variables des Ig, avec un taux d'incorporation de  $10^{-3}$  mutations par paire de bases par cycle cellulaire. C'est un mécanisme très efficace pour générer la diversité des anticorps, il a par exemple été démontré que suite à l'infection au VIH, certains individus développaient des anticorps neutralisants possédant de 40 à 100 mutations dans les parties variables des chaînes constantes des Ig produites<sup>228</sup>. Ce mécanisme est dépendant de la transcription des chaînes d'Ig, afin de permettre l'accès à l'ADN pour l'AID (Activation Induced cytidine Deaminase AID). Cette enzyme catalyse la désamination de cytosine en uracile sur l'ADN démarrant le processus de SHM au niveau de « points chauds » caractérisés par une séquence nucléotidique particulière. La désamination des cytosines est un phénomène couramment observé dans le génome humain et est facilement détecté et réparé sans erreur par la machinerie de protection du génome<sup>229</sup>. Dans le cadre de la SHM, la réparation de l'ADN se

fera dans un contexte où les erreurs sont présentes. Ainsi, si la mutation n'est pas détectée avant la phase S, la base uracile générée par AID servira de matrice pendant la réplication et induira une mutation de type C : G > T : A. L'intervention du mécanisme de réparation UNG (Uracyl-DNA glycosylase) qui, couplé au système BER (Base Exision Repair BER), va pouvoir dégrader la base uracile laissant un site abasique. La réparation de ce site abasique se fera sans erreur si la polymérase Rev-1 est recrutée et dans un contexte plus sujet à des mutations lors de l'utilisation de la polymérase η (très propice à convertir la mutation en une paire de base A : T). De la même manière, le système MutSα va reconnaître la présence d'une uracile grâce à MHS2/MHS6 et va permettre l'intégration de mutations grâce à l'utilisation de polymérase induisant des erreurs comme les polymérases η et Polk, Polζ, and Polι<sup>230</sup> (Figure 13).



**Figure 13: Mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN suite à l'action d'AID.** Au cours de l'hypermutation somatique, AID va catalyser la désamination d'une cytosine en uracile. Cette étape ayant lieu lors de la réplication de l'ADN, si l'erreur n'est pas détectée par la machinerie de réparation de l'ADN alors le brin désaminé servira de matrice pour la réplication générant une mutation C :G > T :A sur le brin répliqué. Si la désamination est détectée avant la phase S elle pourra être reconnue et prise en charge par le système UNG ou le système MutSα. Dans ces deux cas, la réparation de l'ADN pourra faire intervenir des polymérases à fort taux d'erreur. Ainsi la réparation induira des mutations dans les segments variables des gènes des immunoglobulines. (Methot et Di Noia<sup>230</sup>)

De manière évidente, le contrôle de ce processus doit être très fin, en effet les mutations doivent être restreintes aux seules parties variables des gènes des Ig au risque de détruire l'intégrité d'un gène et d'engendrer un désordre cellulaire. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées

à la régulation d'*Aicda* et de la protéine Aid. Comme évoqué précédemment le niveau de transcription de *Aicda* va être favorisé par l'expression des gènes de l'identité B (*Bcl6*, *Bach2*...). Au niveau protéique, l'accès de Aid au noyau va être limité. Récemment Le et Maizels<sup>231</sup> ont démontré que des pulses d'Aid pouvaient être observés dans le noyau des cellules. Brar et ses collaborateurs ont confirmé cela en mettant en évidence la présence d'une séquence d'export du noyau situé dans la partie C-terminale expliquant sa localisation cytoplasmique<sup>232</sup>. L'adressage d'Aid, grâce à la présence d'éléments régulateurs sur les gènes des Ig, a été étudié. Ainsi, Dunnick et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'en déplaçant

une région enhancer de 28kb présente en 3' des gènes des chaînes lourdes des Ig, les phénomènes de recombinaison de classe et de SHM étaient diminués. Rouaud et ses collaborateurs ont confirmé ces observations<sup>233</sup> en effectuant une délétion de 30kb sur la région 3'RR des IgH (Immunoglobulin Heavy Chain). Dans ces expérimentations, ils ont démontré l'absence de SHM sur les segments variables des IgH sans impacter l'expression d'Aid, ni les capacités d'hypermutation somatique sur les chaînes légères. Enfin, la diminution de recrutement d'Aid sur le segment J de l'Ig a été confirmée par ChIP-QPCR dans la condition où la région 3'RR était délétée. Enfin, une étude menée sur la lignée DT40 a mis en évidence un enhancer nommé DIVAC (DIVERsificator ACTivtaor) dans la région 3' de l'IgL lambda, mais présent aussi dans les segments IgH et IgL kappa promouvant fortement l'activité d'Aid sur les gènes des Ig. Il semble donc que le locus des Ig en lui-même participe à l'adressage d'Aid. Malgré les mécanismes de régulation, il a été rapporté qu'Aid pouvait entraîner des mutations sur d'autres gènes. Cela a été mis en évidence grâce à des souris déficientes pour les systèmes de réparation de l'ADN (*Msh2*<sup>-/-</sup> *Ung*<sup>-/-</sup>), où l'action d'AID a été observée sur des gènes comme *Bcl6*, *Myc*, *Pax5*... Par la suite, ces empreintes de mutations dues à AID ont été retrouvées notamment sur *Bcl6* dans le DLBCL<sup>234</sup>.

### C- Passage dans la zone claire

Afin de comprendre les mécanismes régissant la sortie de la DZ des centroblastes, Bannard et ses collaborateurs<sup>235</sup> ont généré des souris chimères possédant des LB normaux et des LB déficients pour *Cxcr4*. Dans ces chimères, après infection, les LB *Cxcr4*<sup>-/-</sup> n'étaient pas présents dans la DZ. Malgré cela, le phénotype des LB *Cxcr4*<sup>-/-</sup> de la LZ présentait une proportion normale de cellules CD86<sup>hi</sup>CD83<sup>hi</sup> et CD86<sup>low</sup>CD83<sup>low</sup>, correspondant respectivement à des CC et CB dans un GC normal. Par ailleurs, deux gènes caractérisant l'identité des CC, *myc* et *nfkbia*, ont été retrouvés exprimés de la même manière chez les B du GC de ces deux souris. La DZ étant un lieu de prolifération intense, les auteurs se sont intéressés aux capacités de prolifération des cellules *Cxcr4*<sup>-/-</sup> et ils n'ont pas observé de différences dépendantes du génotype chez les LB du GC. Ils ont néanmoins noté que les cellules *Cxcr4*<sup>-/-</sup> possédaient moins de mutations somatiques que les cellules normales et que contrairement aux plasmocytes, la proportion de cellules mémoires générées était plus faible chez les KO.

Devant ces résultats, les auteurs décrivent un modèle où le programme des CB serait instruit, dépendant d'un « timer », c'est à dire qu'une grande partie des signaux trophiques intégrés dans la LZ régularaient la destinée des CB dans la DZ. Quelques données viennent renforcer cette hypothèse concernant le déterminisme de la prolifération chez les B activés. En effet, seule une partie des CC de la LZ exprime Myc et vont retourner dans la DZ pour augmenter leur affinité pour l'antigène<sup>236</sup>. Le phénomène de SHM étant dépendant du cycle, l'augmentation du nombre de cycles augmente la probabilité de mutations et donc d'apparition d'un clone très affin. Heinzeil et ses collaborateurs<sup>87</sup> décrivent de fait que l'accumulation de protéines Myc va réguler le nombre de divisions de la cellule B. Ainsi la prolifération du centroblaste serait orientée par les signaux intégrés par le CC de la LZ.

#### D- La zone claire

##### *D-1- Les constituants de la zone claire*

Les FDC de la LZ ont un phénotype quelque peu différent des FDC présentes dans le follicule primaire lors de l'initiation de la différenciation terminale du LB. Ces cellules expriment de manière plus importante les récepteurs au complément CD21/CD35, relatant leur rôle dans la présentation des antigènes opsonisés aux CC. Comme évoqué précédemment, les LB vont capturer le complexe immun, le processer, puis le charger sur le CMHII pour entamer le dialogue avec la cellule LTFH. Les FDC augmentent aussi l'expression du CD23 (FC $\epsilon$ RII), du CD32 (FC $\gamma$ RIIb) ainsi que de l'Icam-1, Vcam-1 et Madcam-1 stabilisant l'interaction. Elles fourniront des signaux de survie aux CC sélectionnés grâce à la production de Baff et leur sécrétion de CXCL13 participent au confinement des CC dans la LZ. Elles produisent aussi de l'IL-6 et de l'IL-15, favorisant la commutation de classe et la prolifération des LB<sup>238,239</sup>. Enfin elles participent à l'élimination des CC apoptotiques via la sécrétion de Mfge8 (ou FDC-M1) pour l'adressage vers les macrophages.

Le compartiment centrocytaire comprend moins de cellules en cycle que le compartiment centroblastique<sup>240</sup>. De nombreux signaux ont été décrits comme régissant la localisation du CC dans la LZ, comme l'expression de CXCR5 et la répression de CXCR4<sup>241</sup> ou bien encore la répression de Foxo1<sup>236,242</sup>. L'affinité de son BCR va lui permettre d'entrer en compétition avec les autres CC pour pouvoir capter l'antigène présenté par la FDC. (Figure 13) Ainsi, la

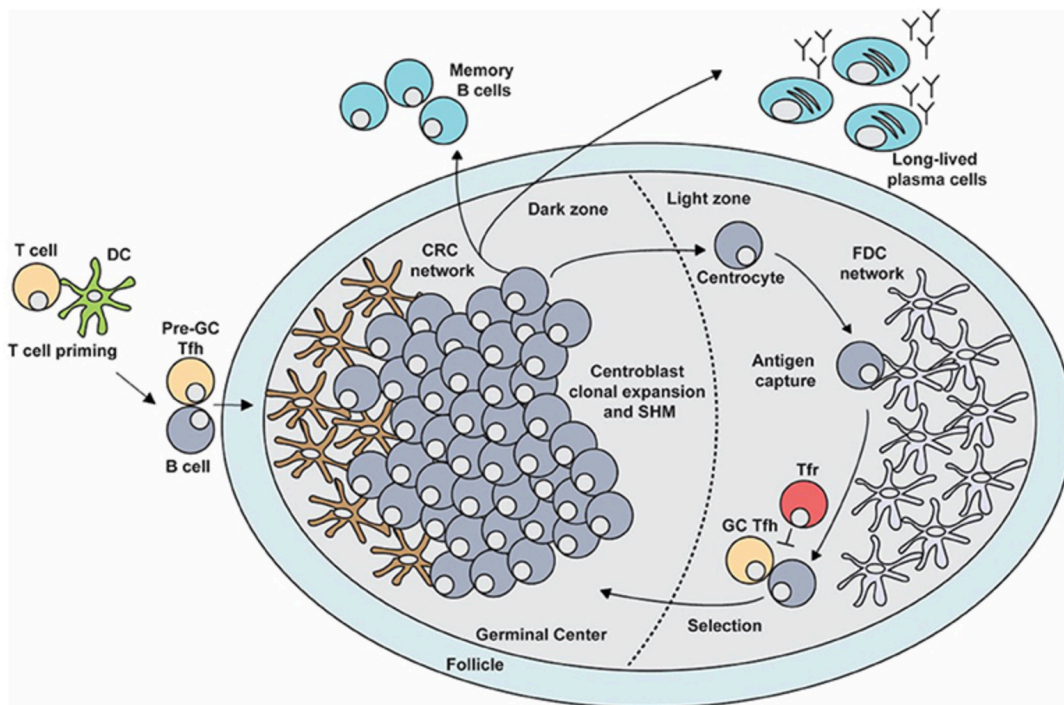


séquestration des antigènes par les clones les plus affins va permettre d'éliminer les clones les moins affins ne rentrant pas en contact avec les acteurs pouvant assurer sa survie. A cette sélection, vient s'ajouter la compétition pour interagir et acquérir les signaux de différenciation provenant du LTFH, il est d'ailleurs admis que ce contact avec le LTFH constituera le mécanisme de sélection le plus intense pour sélectionner les clones avec la plus forte affinité. Cette compétition a très bien été mise en évidence par Victora et ses collaborateurs<sup>243</sup> en utilisant des souris chimères composées de LB hautement réactifs pour l'antigène et de LB polyclonaux. Après avoir induit une réaction immunitaire, ils ont déplété une grande partie des LB hautement spécifiques pour l'antigène. Les auteurs ont alors observé une croissance très forte des LB polyréactifs. Ils concluent que l'ablation des clones les plus affins a permis de diminuer la compétition qui existe pour l'accès aux signaux de survie, de prolifération et de différenciation. En utilisant un système permettant de forcer le chargement de l'antigène sur le CMHII sans passer par la reconnaissance via le BCR, les auteurs ont démontré que l'aide du LTFH était le signal nécessaire pour que les CC retournent dans la DZ et augmentent l'affinité de leur Ig (Figure14).

De nombreux éléments présents dans la synapse d'activation du LB activé et du LT activé sont retrouvés dans l'interaction entre le CC et le LTFH. Afin d'éviter les redondances, un bref aperçu de ces signaux sera développé dans cette partie.

#### *D-2- Les signaux physiques*

La sélection des CC les plus affins pour l'antigène est directement corrélée à leur capacité à présenter un grand nombre de molécules du CMHII chargées du peptide antigénique<sup>245</sup>. En effet, le groupe de Nussensweig a démontré que les LTFH monitoraient les molécules du CMHII présentées par le CC et que la rencontre avec un CC possédant de nombreuses molécules du CMHII chargées avec un peptide réactionnel entraînait un contact prolongé avec le LTFH et une sécrétion accrue d'IL-21 et d'IL-4 par ce dernier<sup>246</sup>. La synapse sera stabilisée par les molécules d'adhésion Icam-1/Icam-2 et Lfa-1 ainsi que par les molécules de la famille SLAM. Cette liaison physique forte assure une synapse étroite et augmente fortement la concentration des messagers délivrés.



**Figure 14 : Dynamique au sein du centre germinatif.** Le centre germinatif est une micro-structure anatomique formée dans les follicules B des OLS suite à une infection. C'est la structure dans laquelle les LB les plus affines pour l'antigène sont générés. La structure est divisée en deux parties compte-tenu de la densité des noyaux. Dans la zone claire, le centrocyte est en contact avec les LTFH et les FDC permettant la commutation de classe et la sélection des LB les plus affines. On retrouve aussi la présence de LTfr qui ont un rôle modulateur permettant le maintien de l'homéostasie de la réponse immunitaire. Les LB sélectionnés vont être attirés dans la zone sombre grâce à la sécrétion de CXCL12 par les CRC. Dans cette zone, les LB sont appelés centroblastes et sont caractérisés par leur prolifération et leur capacité à acquérir des mutations somatiques dans les parties variables des Ig. La fin de la réaction est caractérisée par la production de plasmocytes et de LB mémoires possédants des Ig fortement affines pour l'antigène. (Stebegg et al. 2018<sup>244</sup>)

Parmi les signaux physiques renforçant la sélection du CC on retrouve la liaison CD40L/CD40 qui est nécessaire dans la survie des CC (via l'augmentation de BCL-XL/BCL2<sup>247</sup> et l'inhibition du signal FAS<sup>248</sup>), et nécessaire pour retourner dans la DZ pour effectuer d'autres proliférations. L'interaction sera d'autant plus renforcée par la boucle de régulation positive qui existe entre l'intégration du signal CD40 et l'augmentation de l'expression de ICOSL. Comme décrit précédemment dans les travaux de Liu et ses collaborateurs<sup>93</sup>, cela favorisera « l'étranglement » du CC par le LTFH renforçant ainsi la synapse.

### D-3- Les signaux solubles

Concernant les cytokines produites par ces LTFH, elles partagent une grande redondance avec les cytokines du LT activé (IL-21/IL-4/IL-10/IL-2). Le rôle de l'IL-21 dans les GC établis a très bien été mis en évidence par l'équipe de Tarlinton<sup>249</sup>, ou bien encore par Linterman et ses collaborateurs<sup>114</sup>. L'intégration de cette cytokine participera à la répression finale de *Bcl6* chez

les cellules destinées à devenir des plasmocytes. De plus, cette cytokine possède un rôle dans la prolifération et donc dans l'acquisition des mutations somatiques. Le rôle de l'IL-10 dans la promotion de la différenciation terminale des LB a été très bien documenté *in vitro* et est décrit comme redondant à l'IL-21 dans la promotion de la prolifération et la différenciation des cellules du GC (via un mécanisme STAT3 dépendant)<sup>250 251</sup>. Plus récemment une étude *in vivo* a confirmé le rôle de l'IL-10 dans la promotion de la différenciation terminale des LB du GC. Dans cette étude, Laidlaw et ses collaborateurs<sup>252</sup> démontrent, grâce à un système rapporteur de la production d'IL-10 que bien qu'une proportion de LTFH produise de l'IL-10, ils ne constituent pas la source majeure d'IL-10 disponible pour les CC du GC. Les principaux LT produisant l'IL-10 dans la réaction du GC sont les LT régulateurs folliculaires (LTfr, Cxcr5<sup>+</sup>Bcl6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Ctla4<sup>+</sup>). Bien que l'ontogénie de ces cellules soit encore discutée, ils ont pour principal rôle de contrôler l'homéostasie du GC régulant à la fois les compartiments cellulaires et l'émergence des LB différenciés (illustré par Sage et Sharpe<sup>253</sup>). Ainsi, l'utilisation d'une souris *Il10ra<sup>fl/fl</sup> CD19<sup>cre</sup>* a démontré une baisse des LB activés, des LB du GC et des plasmocytes générés après infection lorsque le récepteur à l'IL-10 est déplété chez les LB. Afin de déterminer le rôle de l'IL-10 produite par les LTfr, les auteurs ont généré une souris *Il10<sup>fl/fl</sup> Foxp3<sup>Cre</sup>* permettant de déléter la production d'IL-10 dans les LT régulateurs. L'analyse transcriptionnelle des LB du GC chez ces souris KO a démontré la perte de la signature associée au phénotype de LB de la DZ due à une baisse de l'expression de Foxo1 (caractérisé comme un TF nécessaire à l'identité CB<sup>236</sup>). Ainsi, le LTfr participe finement à l'homéostasie du GC en régulant positivement et négativement les acteurs de la réaction. Concernant l'IL-4, la maturation des LTFH au cours de la différenciation les rendra plus propices à sécréter de l'IL-4. Cette cytokine possède un rôle majeur dans la maturation et la commutation de classe des Ig chez les CC sélectionnés permettant par exemple l'induction d'Aid en collaboration avec la signalisation CD40<sup>254</sup>. Concernant l'IL-2, un ensemble d'études *in vitro* démontre son rôle favorisant la prolifération, la sécrétion d'Ig et la différenciation plasmocytaire (voir chapitre 1). Par ailleurs, sur les LB du GC l'IL-2 confère un signal de survie plus efficace que l'IL-4<sup>255</sup>. Néanmoins l'absence de souris rapporteuses pour l'IL-2 ne facilite pas l'étude *in vivo* de sa présence, de sa production, et de sa concentration lors de la réaction du centre germinatif. L'IL-2 est produit par les populations de LT CD4<sup>+</sup> activés y compris les populations différenciées LTFH isolées à partir d'amygdales humaines<sup>134</sup>. De plus une population de LTFH CD25<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>Bcl6<sup>low</sup> représentant 5 à 10% des LTFH d'amygdale humaine ont été

identifiés comme étant les LT préférentiellement au contact des LB du GC, leur sensibilité à l'IL-2 leur permettant d'exprimer plus d'ICOS, OX40 et de cytokines dont l'IL-2<sup>256</sup>. Enfin l'existence de coopération entre les signaux cytokiniques tels que l'IL-2 et IL-10<sup>250,257</sup>, ou l'IL-2 et l'IL-21<sup>134</sup> dans la différenciation terminale des LB du GC a été démontrée.

Plus récemment, un rôle plus inattendu des neurotransmetteurs a été mis en évidence dans cette synapse immunologique<sup>258</sup>. La présence du récepteur DRD1 à la surface des CC leur permet de recevoir la dopamine sécrétée par les LTFH murins. Dans leurs étude, Papa et ses collaborateurs décrivent que l'intégration de ce signal va augmenter l'expression d'ICOSL à la surface du CC, renforçant la liaison avec le LTFH, mais va aussi favoriser l'expression du CD40L et donc des signaux de sélection délivrés aux CC. A noter que ce mécanisme n'existe pas chez l'homme.

#### *D-4- La commutation de classe*

Afin d'augmenter la diversité de la réponse immunitaire et donc d'adapter les réponses en fonction des pathogènes, les Ig peuvent subir la commutation de classe et générer ainsi des anticorps possédant des domaines constants différents. Ces régions constantes sont codées par des groupements d'exons qui sont organisés selon un ordre particulier (C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ , C $\epsilon$  et C $\alpha$ ) dans le locus des chaînes lourdes (Constant Heavy chain CH) des Ig. La CSR résulte du remplacement des groupes d'exon C $\mu$ , et C $\delta$  qui sont utilisés par les LB naïfs par les exons d'un autre cluster (C $\gamma$  ou C $\epsilon$  ou C $\alpha$ ) (Figure 15). Tout comme le processus de SHM, la CSR requiert l'accumulation de désamination de cytosines dans des régions particulières appelées région S (Switch Region) grâce à l'action d'Aid. La CSR requiert l'introduction de mutations dans la région S donneuse (S $\mu$ ) et dans la région S dites acceptrice qui est variable selon les signaux trophiques intégrés par le LB. Tout comme dans le processus de SHM, l'accès d'Aid à l'ADN va être conditionné par l'état de transcription du locus IgH. Cela va être rendu possible par la formation d'une boucle-R, c'est à dire par l'association prolongée d'un hybride ADN-ARN laissant le brin d'ADN non transcrit accessible à Aid<sup>259</sup>. L'accumulation de mutations dans les régions S va entraîner l'apparition de cassures simples brins sur l'ADN, menant à des cassures doubles brins si des sites abasiques sont générés sur le brin complémentaire. L'accumulation de ces cassures doubles brins dans les régions S va aboutir à l'excision de la partie

intermédiaire contenue entre les deux régions S permettant l'utilisation du promoteur présent en amont du CH retenu et ainsi la transcription d'un nouvel isotype sans changer la partie variable de l'Ig.<sup>260</sup>.

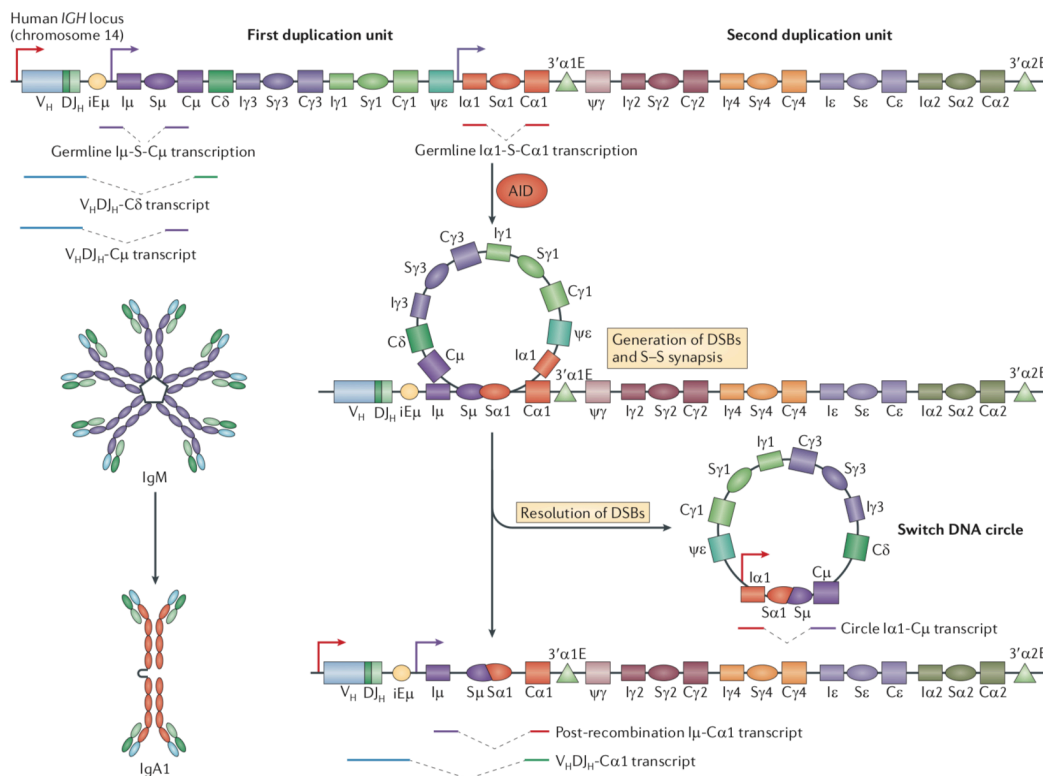
Le choix de la région S acceptrice est régi par un ensemble de signaux trophiques dépendant de l'antigène et de l'état d'activation des éléments du micro-environnement. In vitro chez l'humain, la stimulation de LB avec du CD40L et de l'IL-21 induit la commutation de classe vers les IgG1 et les IgG3<sup>261,262</sup>. Par ailleurs, l'IL-4 induit une production importante d'IgG1 et très peu d'IgG2 et d'IgG3<sup>263</sup>. D'autres études relatent la production d'IgG4 et d'IgE sous cette même stimulation<sup>264</sup>. L'apport de ces études in vitro a permis de mieux comprendre la dynamique de la commutation isotypique, mais parfois elles deviennent difficiles à extrapoler à des environnements complexes comme la réaction du GC. Pour ne prendre l'exemple que de la différenciation du LTFH au cours de la réaction du GC, nous avons vu précédemment que ces cellules évoluent durant la réaction et produisent dans un premier temps de l'IL-21 puis acquièrent un phénotype de cellules productrices d'IL-4. Il existe donc une hétérogénéité des cellules régulant la différenciation plasmocytaire induisant, de fait, une somme de signaux intégrés par le LB différent d'une cellule à l'autre. L'ensemble de ces signaux vont pouvoir finement réguler la CSR et ainsi fournir les anticorps les plus adaptés à une réponse immunitaire efficace.

#### *D-6- Mécanismes de sélection des clones les plus affins*

Ainsi, le CC ayant une affinité supérieure à celle des CC voisins va acquérir une aide du LTFH qui sera plus importante. A partir de ce moment, la cellule peut s'orienter vers la sortie du GC ou retourner dans la DZ pour effectuer un autre cycle de prolifération et ainsi incrémenter ses chaînes d'Ig avec d'autres mutations pour pouvoir acquérir une réactivité supérieure à l'antigène.

Bien que le mécanisme de recyclage des CC vers la DZ était connu, et que Victora et ses collaborateurs l'avaient mis en évidence avec leur modèle de LB photoinductibles<sup>243</sup> (Figure16), le contrôle moléculaire de ce mécanisme restait flou. En 2012, l'association des groupes de Nussensweig et de Dalla-Favera a mis en évidence que ce retour dans la LZ était dû à l'expression de c-Myc chez les CC sélectionnés pour augmenter l'affinité de leurs Ig. En utilisant une souris cMyc-GFP, ils ont pu mettre en évidence que, lors d'une infection, 8% (en

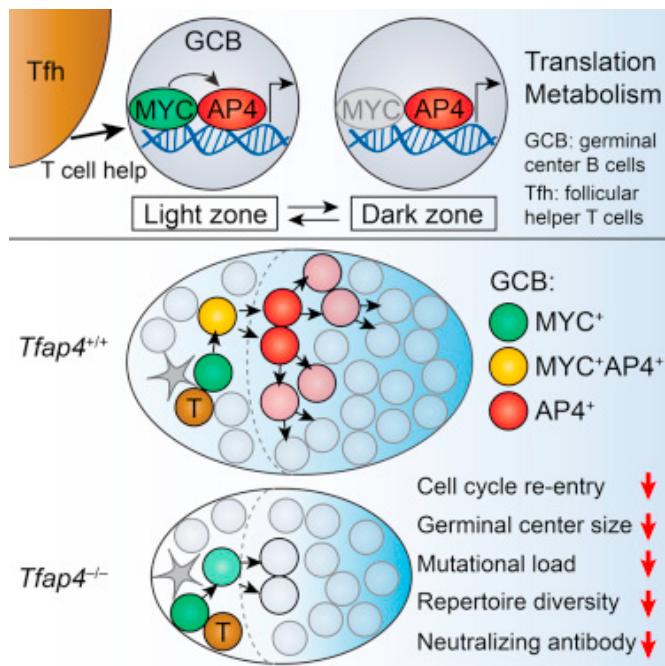
moyenne) des CC exprimaient cette protéine. Cette faible proportion de cellules, couplée à la répression de *cMyc* par *Bcl6* dans la DZ a masqué l'expression de ce gène lors des précédentes études sur populations triées. Afin de mettre en évidence que les cellules *cMyc* positives étaient des cellules qui retournaient dans la LZ, ils ont analysé le transcriptome de ces cellules ainsi que leur affinité pour l'antigène. Ils ont mis en évidence que les cellules GFP+ de la LZ étaient des cellules entrant en cycle (*Ccnd2*), avait intégré des signaux du BCR et CD40L, et l'affinité de leur Ig était plus importante que celle des GFP-. Ces cellules ont donc été sélectionnées positivement par les LTFH.



**Figure 15 : Exemple de mécanisme de commutation de classe d'une IgM vers une IgA.** Le locus des immunoglobulines contient de nombreux groupes d'exons permettant de coder pour la chaîne lourde des Ig. La commutation de classe est le mécanisme par lequel la cellule va utiliser le promoteur d'une autre chaîne constante des Ig. Cette représentation met en évidence la CSR entre une IgM et une IgA. AID va induire l'accumulation de mutations dans les régions génomiques « Switch » bordant les groupes d'exons caractérisant une classe d'Ig. L'accumulation de mutations doubles brins dans la région Switch dites donneuse et la région Switch dite accepteuse va induire l'excision de la partie génomique présente entre ces deux régions et ainsi l'utilisation d'un autre groupe d'exon pour transcrire la chaîne lourde. La partie excisée sera libérée sous forme circulaire. L'orientation isotypique de la commutation de classe est dictée par les signaux trophiques du micro-environnement. (Xu et al. 2012 <sup>260</sup>)

Enfin, la déplétion de *c-Myc* sur des GC établis entraîne une diminution drastique de la taille de ces derniers imputant un rôle de *c-Myc* dans la maintenance de l'état prolifératif des GC à

long terme. Plus récemment, Chou et ses collaborateurs ont mis à jour le mécanisme moléculaire gouvernant la prolifération des CB après l'activation de Myc. Ils ont mis en évidence que l'expression de Myc chez les CC sélectionnés était suivie de la production de Ap4 dans ces CC. L'ablation de Ap4 (*Tfap4*<sup>-/-</sup>) entraîne une baisse de l'état prolifératif des CB chez la souris. L'analyse transcriptionnelle des cellules Myc<sup>+</sup>Ap4<sup>+</sup>, Myc<sup>-</sup>Ap4<sup>+</sup> de la LZ et Ap4<sup>+</sup>, Ap4<sup>-</sup> de la DZ couplée à l'analyse des sites de liaison de MYC et AP4 révèlent qu'AP4 et MYC partagent de nombreux gènes cibles et qu'AP4 constitue le relai de l'expression de MYC chez les CB. Par ailleurs, avant de quitter la LZ, l'expression d'AP4 est renforcée par la sécrétion LTFH d'IL-21. La dilution progressive de la protéine AP4 renforce encore la notion selon laquelle le CB possède un programme transcriptomique fortement contrôlé par les expériences qu'il a vécu au stade CC et qu'un « timer » va contrôler son retour dans la LZ (Figure 16).

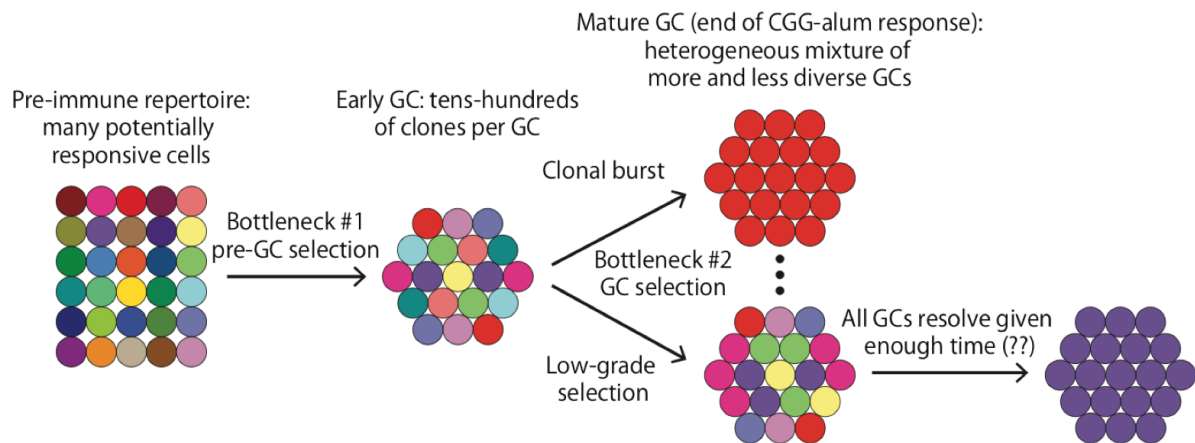


**Figure 16: Contrôle du cycle cellulaire des centroblastes par les signaux trophiques du dialogue LB/LT.** Dans ce modèle proposé par Chou et ses collaborateurs, la synapse de communication entre le LB et le LT dans la zone claire du GC permet de contrôler la prolifération des centroblastes. L'augmentation de la protéine Myc dans les centrocytes sélectionnés sera suivie d'une augmentation de la protéine AP4. La dilution progressive de la protéine AP4 chez les centroblastes issus des centrocytes sélectionnés permettra de réguler le nombre de cycles cellulaires effectué. Les nombreux gènes régulés conjointement par ces deux TF permettront le relai de fonction de Myc par AP4 dans les centroblastes. (Chou et al. 2017<sup>265</sup>)

Devant ces mécanismes de sélection importants se mettant en place au cours

de la réaction du GC, il semble cohérent de voir apparaître une expansion clonale au cours de cette réaction. Cela a été bien illustré par l'équipe de Victora grâce à l'utilisation d'un système permettant de « colorer » la cellule et l'ensemble de sa descendance de la même couleur (il s'agit du système allélique BrainBow mis en place par le groupe de Lichtman en 2007<sup>266</sup>). A l'état basal, les follicules sont composés de cellules naïves polyclonales (follicules de couleurs multiples). Lors de l'induction d'une réponse immunitaire, les auteurs ont observé après 15 jours l'apparition de GC composés d'une seule couleur (15% des GC) laissant supposer la clonalité du GC concerné et une grande majorité de GC composés de plusieurs clones. L'étude

dynamique des réarrangements des VDJ a démontré que les GC précoces étaient polyclonaux (entre 50 et 200 clones différents). Par la suite, l'analyse des relations clonales existant chez les GC possédant une seule couleur démontre que ces GC sont issus de l'expansion très rapide d'un seul clone, et qu'en cohérence avec le modèle de sélection de l'affinité des clones prolifératifs, ces clones présentent une affinité très forte pour l'antigène (Figure 17).



**Figure 17: Évolution clonale des centres germinatifs.** L'utilisation d'un système permettant de marquer les LB avec une couleur spécifique en fonction de leur clonotype a permis de suivre l'évolution clonale d'un GC. Lors de la réaction immunitaire, les GC précoces sont composés de nombreux clonotypes différents possédant des affinités différentes. Au fur et à mesure, la sélection des LB les plus affins pour l'antigène entraîne la dominance de prolifération d'un clone. Les cellules issues de ces clones constitueront la majeure partie sinon l'ensemble des cellules B de ce GC. Quelques questions subsistent concernant l'évolution clonale de tous les GC. Ce modèle ne permet pas de savoir si tous les GC atteindront ce stade avant la fin de la réponse immunitaire et la régression des GC. (Messin et al. 2016 <sup>267</sup>)

#### E- Sortie du centre germinatif

Lors de la sortie du GC, le LB peut devenir un LB mémoire ou un plasmocyte à longue durée de vie. Là encore, ce point de bifurcation n'est pas parfaitement élucidé.

La génération d'un LB mémoire va dans un premier temps être liée à « l'âge » du GC. En effet, comme démontré par Weisel et ses collaborateurs<sup>222</sup>, les LB mémoires sont les premières cellules différenciées à émerger de la réaction du GC, ce qui est consistant avec le taux plus faible de mutation retrouvé dans leur chaîne d'Ig en comparaison aux plasmocytes à longue durée de vie<sup>268</sup>. Certaines études caractérisent l'engagement vers la différenciation de type mémoire par une expression génique particulière. L'équipe de Kurosaki <sup>269</sup> démontre que les précurseurs de la LZ allant donner des mémoires (clones IgG1 précoces dans la LZ avec peu de mutation) réprimaient l'expression des gènes d'entrée en prolifération, et possédaient une expression plus forte de *Bach2* et de *Pax5* par comparaison aux autres CC de la LZ. Ils ont par



la suite mis en évidence que l'expression de *Bach2* dans les CC était inversement corrélée à l'affinité du BCR et à l'aide du LTFH reçu par le CC. Enfin, l'ablation contrôlée de l'expression de *Bach2* diminue la proportion de LB mémoires générés. Certaines études *in vitro* relatent que la résistance à la mort serait l'un des éléments favorisant la génération de LB mémoires<sup>270,271</sup>. Néanmoins, la résistance à la mort étant aussi une des caractéristiques des cellules plasmablastiques quittant le GC cela ne semble pas être un facteur générateur de cette bifurcation. Les LB mémoires circulants sont quiescents, expriment pour une grande partie le CD27<sup>272</sup>, et maintiennent transcriptionnellement une identité B avec l'expression de Pax5 et Bach2 notamment<sup>273</sup>. Cependant la faible expression de Bach2 dans les LB mémoires comparativement aux LB naifs a été impliquée dans leur capacité accrue de différenciation plasmocytaire<sup>273</sup>.

Concernant le devenir plasmocytaire, l'étude de la dynamique d'émergence des cellules du GC a démontré qu'elles apparaissent plus tardivement que les mémoires mais avec une affinité pour l'antigène plus grande. Au sein du GC, une étude démontre la présence de cellules du GC positives Blimp-1, Irf4, Cd138 avec pour certaines d'entre elles un marquage Ki67<sup>274</sup>. *In vivo* chez la souris, deux études ont démontré que ces cellules Irf4<sup>hi</sup> étaient les précurseurs des plasmablastes. Dans un premier temps l'équipe de Kurosaki a mis en évidence que ces cellules étaient issues d'une interaction forte avec le LTFH (signal CD40 fort ainsi qu'une interaction stabilisée)<sup>275</sup>. Par la suite, l'équipe de Toellner<sup>276</sup> a mis en évidence une population Irf4<sup>high</sup> de LB présent à la bordure de la zone sombre du GC et de la zone T (GC-T zone interface (GTI)). Ces cellules caractérisées comme précurseurs des plasmablastes générés, sont attirées dans cette zone par des cellules stromales particulières sécrétant du CXCL12 ainsi que APRIL et l'IL-6 permettant de renforcer la maturation des cellules quittant le GC.

L'équipe de Klein a publié une étude mettant en évidence la présence d'une population pré-plasmablastique chez l'homme dans différents organes lymphoïdes et ont un phénotype proche de celui retrouvé dans leurs modèles de différenciation *in vitro* CD19<sup>+</sup> CD20<sup>low</sup> CD38<sup>-</sup> CD138<sup>-</sup> et IL-6R<sup>+</sup>. *In vitro*, ils ont caractérisé ces cellules comme engagées dans la voie de différenciation vers la formation de plasmablastes grâce à l'expression des marqueurs communs de différenciation (*PRDM1*, *XBP1*, *IRF4*) réprimant les gènes de l'identité B. Plus récemment, le groupe de Moreaux<sup>277</sup> a mis en évidence qu'un contrôle épigénétique via Ezh2 était responsable de la transition entre les pré-plasmablastes et les plasmablastes puis les

plasmocytes humains. Ezh2 régule dans un premier temps l'entrée en cycle des plasmablastes et réprime l'expression des gènes permettant la maturation des cellules en plasmocytes. Sa répression au cours de la fin de la différenciation facilitera la différenciation. Les plasmocytes à longue durée de vie exprimeront le CD138, CD38, CD27, BLIMP1, IRF4, XBP1 et produiront de grandes quantités d'Ig.

La compréhension des mécanismes épigénétiques contrôlant la différenciation terminale des LB a été étayée grâce au groupe de Boss, en monitorant l'ouverture de la chromatine en fonction des divisions effectuées par le LB activé. Ils démontrent que cette transition finale est gouvernée par le contrôle temporel de l'accessibilité des promoteurs des gènes gouvernant la différenciation. Plus précisément, Ezh2 en apposant des marques de méthylation sur les histones H3 permet de réguler finement l'accessibilité des promoteurs des gènes gouvernant la transition finale vers le stade plasmocytaire (dont *prdm1*). Dans une seconde étude publiée par le même groupe, la méthylation de l'ADN en lui-même, catalysée par les enzymes Dnmt3a/b a été caractérisé comme un évènement renforçant le contrôle de la différenciation. Ils ont notamment démontré que l'apposition de méthylations sur l'ADN était un processus différemment représenté en fonction des sous-populations étudiées (LB naïfs, du GC et des plasmocytes). La présence des enzymes Dnmt3a/b semble être particulièrement importante pour la mise en place correcte du profil d'expression génique des plasmocytes. En effet, les plasmocytes déficients pour ces enzymes possèdent des dérégulations d'expression de gènes impliqués dans l'organisation du génome, du métabolisme, de l'activation... L'utilisation de données d'ouverture de la chromatine chez les plasmocytes démontre que l'apposition de méthylation sur les régions régulatrices des gènes ayant une chromatine ouverte, permet de réguler l'expression de gènes qui ne doivent pas être exprimés chez le plasmocyte (*pou2f2, ebf1, cd86, il10ra...*). Ainsi, la méthylation de l'ADN participe au contrôle fin de la différenciation terminale des LB. De nombreuses études dans la littérature et dans notre laboratoire se sont intéressées à ce versant, complétant les approches d'études de l'expression génique.

#### IV- La niche médullaire des PC

Le plasmablaste généré va dans un premier temps sortir de l'OLS grâce au gradient de S1P qui existe entre ce dernier et la circulation sanguine<sup>278</sup>. L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur

S1P1, par le groupe de Cyster, a révélé une diminution de la sortie des OLS et de la localisation médullaire des PCs générés<sup>279</sup>. L'expression de CXCR4 à la surface des plasmablastes va aussi permettre le tropisme vers la niche médullaire<sup>280</sup>.

Au sein de la niche médullaire de nombreux éléments vont participer à la survie des PCs. Dans une étude publiée en 2003 par le groupe de Manz,<sup>281</sup> les auteurs se sont attachés à évaluer les rôles de différents messagers solubles sur la survie des PCs extraits de la moelle osseuse. Pour cela, les PCs isolés sont mis en culture avec différents messagers et la survie des cellules est évaluée *in vitro*. Les auteurs ont démontré que le surnageant provenant d'une ponction de moelle permet une survie importante des cellules après 3 jours de cultures (50% de survie avec le surnageant contre 4% de survie en milieu sans surnageant). L'ajout d'IL-6, d'IL-5, de CXCL12, de d'anti-CD44, et la combinaison de ces facteurs ajoutés dans le milieu de culture, permet aussi d'augmenter la capacité de survie des cellules par un mécanisme indépendant à la prolifération cellulaire. Les auteurs concluent sur la nécessité de combiner ces signaux pour la survie optimale des cellules plasmocytaires.

D'autres études se sont intéressées aux acteurs cellulaires participant à la survie des PCs dans la moelle osseuse. Parmi ces acteurs, les cellules stromales sécrétrices de CXCL12 permettent d'attirer les PCs et de les maintenir localement grâce à l'engagement de contacts physiques médiés par les intégrines telles que VLA-4 et LFA-1 exprimées à la membrane des PCs. L'utilisation d'anticorps bloquants contre ces deux intégrines permet de retarder l'accumulation de PCs dans la moelle<sup>282</sup>. Bien que participant à l'adressage des PCs vers la moelle, le blocage chimique (Plerixafor) de l'axe de communication CXCL12/CXCR4 *in vivo* ne réduit pas le nombre de PCs déjà présents dans la moelle osseuse des souris<sup>283</sup>. Ces résultats sont cohérents avec les données générées par le groupe de Manz<sup>284</sup> décrivant une perte de la réponse au CXCL12 par les PCs présents dans la moelle 12 jours après une immunisation avec de l'ovalbumine de poulet, chez la souris.

Parmi les acteurs cellulaires, les mégacaryocytes ont été décrits comme sécrétant de l'IL-6 et de l'APRIL permettant de soutenir la survie des cellules plasmocytaires. Dans une étude publiée par Winter et ses collaborateurs<sup>285</sup>, les auteurs démontrent un contact direct existant entre les PCs et les mégacaryocytes dans la moelle. L'utilisation d'une souris *c-mbl<sup>-/-</sup>* au sein de laquelle le développement des mégacaryocytes est affecté, a révélé la contribution des mégacaryocytes à l'accumulation précoce de PCs dans la moelle. Dans ce modèle murin, l'absence de mégacaryocytes retarde la colonisation de la moelle par les PCs sans pour autant

l'enrayer. De plus, la stimulation de la formation de mégacaryocytes par injection de thrombopoïétine augmente le nombre de PCs dans la moelle.

Le rôle du basophile a aussi été investigué par des études *in vitro*. Le groupe de Mack<sup>286</sup> a notamment démontré que les basophiles activés permettent la survie des PCs *in vitro* grâce notamment à la sécrétion d'IL-4 et d'IL-6. Pour autant, la déplétion *in vivo* des basophiles entraîne une diminution du nombre de PCs à courte durée de vie dans la rate, mais pas dans la moelle osseuse. Ainsi, il semble que les basophiles ne soient pas nécessaires à la survie des PCs de longue durée de vie *in vivo*, mais il est concevable de penser que leur présence permette de renforcer la production d'IL-4 et IL-6 soutenant la survie des cellules différenciées.

Les cellules dendritiques médullaires soutiennent aussi la survie des PC à longue durée de vie. Cela a été démontré par le groupe de Lee<sup>287</sup>, les DC grâce à l'engagement de leurs molécules de surface CD80/CD86, permettant de lier le CD28 exprimé à la surface des PC, augmente leur survie. L'engagement de cette liaison engendre un effet bi-directionnel sur la survie des B avec un effet direct de la stimulation du CD28, mais aussi grâce à la production d'IL-6 par la DC en réponse à l'engagement des molécules de surface CD80/CD86.

Plus récemment un rôle des T régulateurs a été proposé pour maintenir l'homéostasie de la niche hématopoïétique. Dans une étude publiée dans Cell Report en 2017 par le groupe de Hunter<sup>288</sup>, les auteurs ont démontré grâce à l'imagerie intra-vitale la présence de Treg (Foxp3-GFP+) co-localisant avec les PC et les DC de la moelle. La déplétion des Treg entraîne une augmentation importante du nombre de PC dans la moelle des souris après infection. Les auteurs avancent l'hypothèse que le Treg pourrait réguler la quantité de PC présent dans la moelle pour assurer une réponse fonctionnelle. Par ailleurs, CTLA4 est exprimé de manière importante chez ces Treg et pourrait donc induire chez la DC la stimulation de l'axe CD80/CD86 et donc la production d'IL-6 renforçant la survie.

La littérature décrit aussi un rôle des ostéoclastes promouvant la survie des PC *in vitro* grâce à des contacts physiques<sup>289</sup>, un rôle des précurseurs des cellules myéloïdes qui grâce à la sécrétion d'IL-6 et d'APRIL renforcent leur concentration dans la niche médullaire<sup>290</sup>.

Enfin, pour conclure sur cette liste non-exhaustive des acteurs cellulaires soutenant la survie des PC à longue durée de vie, le cas des éosinophiles reste très discuté. Il a dans un premier temps été démontré que ces cellules étaient nécessaires à la survie des PC à longue durée de vie grâce à leur sécrétion d'IL-6 et d'APRIL<sup>291</sup>. L'utilisation de souris dépourvues d'éosinophile

mature abolit, dans leur étude, le maintien en vie de ces PC. Très récemment, deux études<sup>292,293</sup> viennent nuancer l'importance de ces acteurs dans la survie de ces cellules différenciées. En effet, en l'absence d'éosinophile, dans ces deux études, la proportion de PC est normale. Les différences observées entre ces études peuvent être dues à de nombreux facteurs mis en avant dans la discussion des deux dernières études. Les auteurs évoquent par exemple le type d'infection permettant de générer la réponse humorale, ou encore les contrôles utilisés dans la première étude. En effet, lors de cette première étude, les souris contrôles utilisées dans la première étude n'étaient pas issues de la même portée et étaient isolées dans des conditions d'hébergement potentiellement différentes. La proportion de PC de longue durée de vie dans la moelle pouvant être impactée par le microbiote de la souris, l'effet observé sur la nécessité des éosinophiles pour le maintien des PC n'était peut-être qu'un artefact expérimental.

L'intégration de ces signaux de survie chez le LB va permettre l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotique. C'est par exemple le cas de l'expression de mcl-1 qui est augmenté lors de la liaison de APRIL ou de BAFF (exprimé par les DC, les LT, les monocytes, les macrophages) sur BCMA retrouvé à la surface du PC. De plus, le PC va modifier ces capacités métaboliques, sa résistance au stress de production des Ig, son autophagie pour pouvoir survivre et accepter la sécrétion massive d'Ig (illustré par Lightman et ses collaborateurs<sup>294</sup>).

Ces facteurs environnementaux ne représentent qu'une petite partie de l'ensemble des mécanismes permettant la survie et le fonctionnement des PC dans la moelle osseuse. En miroir à cette pléiotropie de signaux, le compartiment plasmocytaire de la moelle est lui aussi très hétérogène. En effet, en fonction des stimulus de différenciation (T-dépendant, T-indépendant, les cytokines, les acteurs cellulaires présents), mais aussi la nature de la cellule d'origine (LB naïfs, mémoire...)<sup>295</sup>. Pour ne citer qu'une étude explorant cette hétérogénéité, Halliley et ses collaborateurs<sup>296</sup> ont mis en évidence la présence de 4 sous-populations de PC présents dans la moelle (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> ; CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup> ; CD19<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> ; CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>). Ces différentes sous populations sécrètent des taux variables d'IgG par exemple, ont des morphologies différentes, et possèdent des signatures transcriptomiques différentes. En évaluant la réactivité des anticorps produit par ces différentes sous-population, les auteurs identifient la sous-population CD19<sup>-</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>+</sup> comme une

population de PC à très longue durée de vie responsable de la production d'anticorps près de 40 ans après l'exposition à l'antigène.

\*\*\*\*\*

Dans ce chapitre, nous avons vu que l'identité cellulaire des LB au cours de la différenciation est contrôlée par un réseau de gène influençant l'avancée de la différenciation. Le LB est capable d'intégrer une multitude signaux pour se différencier permettant de générer une réponse immunitaire adaptée en fonction de la situation.

## Chapitre 3 : La pathologie de Waldenström

Comme évoqué dans les deux précédents chapitres, la différenciation des lymphocytes B matures en cellules effectrices reflète l'intégration d'un ensemble de signaux cellulaires apportés par le microenvironnement, partenaires cellulaires et molécules diffusibles. Cependant leur perturbation est à l'origine de nombreuses pathologies.

Notre laboratoire s'intéresse aux lymphomes non Hodgkiniens, maladies malignes hétérogènes développées à partir des lymphocytes B matures, dont l'incidence est en constante augmentation et qui restent pour certaines proliférations, et notamment les formes indolentes type lymphome folliculaire, incurables en dépit de nouvelles thérapeutiques. De façon importante, une dérégulation des facteurs de transcriptions contrôlant la différenciation terminale B est fréquemment associée à ces néoplasies.

Ce chapitre présente l'état actuel des connaissances d'une de ces néoplasies B, la maladie de Waldenström. De nombreuses questions restent en suspens concernant la pathogenèse et l'évolution tumorale de cette maladie. Or, la compréhension des mécanismes par lesquels les signaux de différenciation externes et les mutations clonales contrôlent le destin cellulaire de ces lymphocytes B à une importance pour la compréhension de la pathogenèse et le développement de nouvelles thérapeutiques.

J'ai entrepris au cours de ma thèse l'étude de la différenciation *in vitro* des cellules primaires tumorales de patients et de l'hétérogénéité cellulaire caractéristique à cette maladie. Ce projet est présenté dans la section Résultats ([Projet 3](#)).

### I- Caractéristiques générales de la maladie

La maladie de Waldenström (WM) doit son nom au médecin l'ayant mis en évidence en 1944, le docteur Jan Gösta Waldenström<sup>297</sup>. C'est un lymphome B non Hodgkinien rare (2% des cancers hématologiques). L'âge médian du diagnostic en France est de 68 ans, et les hommes sont deux fois plus touchés que les femmes. Cette pathologie est considérée à ce jour comme incurable et la médiane de survie au diagnostic est estimée à environ 8 ans. La maladie de WM est caractérisée par un infiltrat médullaire de petites cellules B, de lymphocytes plasmacytoïdes (lymphocytes B activés possédant un cytoplasme basophile avec une chromatine condensée) et des plasmocytes, supérieur à 10%. Cet envahissement médullaire

est à l'origine de désordres dans la production de la lignée hématopoïétique induisant par exemple une anémie ou une thrombocytopenie. De plus, on retrouve dans cette pathologie un taux élevé d'IgM circulants. La concentration importante de l'IgM pentamérique (950kDa) circulante est associée à un syndrome d'hyperviscosité (induisant des troubles ophtalmiques, des saignements, un syndrome neurologique central et/ou périphérique...). Une cryoglobulinémie est détectée chez 7 à 20% des patients, mais elle est symptomatique dans moins de 5% des cas. La présence d'auto-anticorps anti-MAG (Myelin Associated Glycoprotein) a été mise en évidence dans 15 à 30% des WM. Sur le plan phénotypique, ces cellules sont caractérisées comme étant CD5<sup>-</sup> CD10<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD22<sup>low</sup> CD23<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> CD27<sup>het</sup> CD38<sup>het</sup> CD79<sup>+</sup> CD81<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> CD200<sup>het</sup> CD305<sup>-</sup> mIgM avec une restriction clonotypique  $\kappa$  ou  $\lambda$ . L'analyse des séquences des chaînes variables de ces Ig démontre l'utilisation préférentielle des segments VH3 et plus particulièrement le segment VH3-23.<sup>298</sup> D'un point de vue génétique, une délétion du bras 6q est observée chez de nombreux patients, et des mutations gain de fonction pour MYD88 (MYD88<sup>L265P</sup>) et CXCR4 (CXCR4<sup>Whim</sup>) ont été rapportées (données illustrées par Leblond et ses collaborateurs<sup>299</sup>).

#### A- Origines de la maladie

Malgré les nombreuses études réalisées, l'origine cellulaire de la maladie de WM reste mal définie. Il a été décrit que la cellule d'origine serait issue de la sélection d'un LB IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> ayant effectué le processus d'hypermutation somatique des Ig avec une préférence d'utilisation des segments VH3-JH4, mais n'ayant pas effectué la recombinaison de classe<sup>300,301,302</sup>. Il est admis que cette pathologie résulte de la progression d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) à IgM. La progression de ce MGUS à IgM vers un WM symptomatique (S-WM) passera par une étape asymptomatique de la maladie (A-WM). Ces étapes sont définies selon des critères d'envahissement médullaire, d'augmentation de la concentration d'IgM circulantes, et l'apparition de symptômes<sup>303</sup>.



### *A-1- Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) à IgM*

Les MGUS à IgM (IgM-MGUS) sont caractérisés par une augmentation de la concentration d'IgM sérique (<3g/dL), sans infiltration lymphoplasmocytaire de la moelle, et sans symptôme associé à cet infiltrat (anémie, syndrome d'hyperviscosité...) <sup>304</sup>. D'un point de vue cytogénétique, Schop et ses collaborateurs <sup>305</sup> ont investigué la délétion 6q chez 12 IgM-MGUS et 38 WM. Bien qu'ils confirment la délétion 6q chez 55% des patients atteints de la maladie de WM, ils n'observent aucune délétion 6q chez les patients atteints d'IgM-MGUS. Concernant les mutations somatiques, des équipes se sont intéressées à la présence de la mutation MYD88<sup>L265P</sup> chez les patients présentant un IgM-MGUS. En utilisant une technique de détection allèle-spécifique, la mutation a été mise en évidence chez 87% des patients IgM-MGUS analysés par Jiménez et ses collaborateurs <sup>298</sup>, et chez 54% des patients IgM-MGUS analysés par le groupe de Treon <sup>306</sup>. Cette mutation n'est donc pas acquise lors de la transformation d'une IgM-MGUS vers un WM. L'évolution de la maladie a été rapportée par de nombreuses études, avec un risque de progression vers un désordre lymphoprolifératif important en fonction des cohortes (24% à 15 ans <sup>303</sup>, 27% à 20ans <sup>307</sup>, 29% à 10ans <sup>96</sup>, 25% à 15ans <sup>308</sup>). Parmi ces progressions un nombre important de progressions vers une maladie de WM a pu être mis en évidence (13/14 progressions par exemple dans l'étude de Morra et ses collaborateurs <sup>96</sup>). En s'appuyant sur ces études rétrospectives, le seul critère prédictif semble être le taux d'IgM sérique au diagnostic. Néanmoins, il faut noter que la majeure partie des patients atteints d'une IgM-MGUS ne développera pas de désordre lymphoprolifératif.

### *A-2- Le stade asymptomatique*

Le stade asymptomatique, appelé aussi « smoldering Waldenström macroglobulinemia » est caractérisé par un taux d'IgM circulantes > 3g/dL ou/avec un infiltrat médullaire > à 10% mais sans symptôme apparent. Dans une étude menée par Ocio et ses collaborateurs <sup>309</sup>, la délétion 6q a été retrouvée chez 10 des 28 patients analysés. Par ailleurs, la mutation MYD88<sup>L265P</sup> a été retrouvée chez 80% des patients sWM analysés (n=30) par Correa et ses collaborateurs <sup>310</sup>. Dans une étude de suivi à long terme de l'évolution de la maladie, Kyle et ses collaborateurs <sup>303</sup> ont mis en évidence que les patients atteints de cette forme asymptomatique progressaient vers un stade symptomatique dans 71% des cas. De manière intéressante, certains patients possèdent une mutation CXCR4 à un stade asymptomatique, cette

particularité impacte négativement la survie globale, et nécessite une prise en charge thérapeutique plus importante que les patients non mutés<sup>311</sup>.

### A-3- Le stade symptomatique

Le stade symptomatique est caractérisé par une IgM circulante important >3g/dL, un infiltrat médullaire supérieur à 10% et l'apparition de symptômes dus à ces deux particularités. Comme évoqué précédemment, des anomalies cytogénétiques peuvent être présentes tout comme des mutations somatiques. Afin de mieux comprendre les différences induites par les mutations somatiques, l'équipe de Tréon a effectué des séquençages du transcriptome de différents génotypes retrouvés fréquemment chez les malades. Ainsi, les populations CD19<sup>+</sup> médullaires de patients *MYD88<sup>L265P</sup> CXCR4<sup>Whim</sup>*, *MYD88<sup>L265P</sup> CXCR4<sup>WT</sup>*, *MYD88<sup>wt</sup> CXCR4<sup>wt</sup>* ont été analysées. La cellule originale étant supposée être un LB mémoire non commuté, les auteurs ont utilisé comme contrôle des cellules CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> non mémoires et des CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> mémoires. Ils ont mis en évidence que l'ensemble des échantillons provenant de patients malades possèdent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme de recombinaison des segments VDJ, sans pour autant augmenter l'expression d'*AICDA*. Par ailleurs, la balance apoptose/survie des cellules semble être dirigée vers la survie avec une augmentation de l'expression de *BCL2* et *BCL2L1* et une baisse de l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX. L'axe de communication CXCL12/CXCR4 est augmenté dans l'ensemble des échantillons de patients pouvant traduire les facilités de localisation et de rétention des cellules dans la moelle. L'expression de CXCL13 qui est une cible de la signalisation CXCL12/CXCR4 a été retrouvée comme étant corrélée à l'infiltration médullaire et à l'anémie qui en découle. Enfin, la signalisation BCR chez les cellules issues de patients WM semble être plus importante, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de CD79a et CD79b (confirmée fonctionnellement par le groupe de Palomba<sup>312</sup>). Par la suite, les auteurs ont concentré leurs analyses sur la comparaison des différents groupes de WM. En comparant les génotypes *MYD88<sup>L265P</sup> CXCR4<sup>Whim</sup>* et *MYD88<sup>L265P</sup> CXCR4<sup>WT</sup>*, ils ont mis en évidence que l'acquisition de la mutation CXCR4 diminuait l'activité de la signalisation TLR4, augmentait l'expression de *IRAK3* (régulateur négatif de IRAK1/4) et augmentait l'activation de la voie PI3K par un mécanisme différent de l'activation de cette même voie par *MYD88<sup>L265P</sup>*. De plus, de nombreux régulateurs négatifs de la voie MAPK sont réprimés dans les cellules *CXCR4<sup>Whim</sup>*,

mettant en évidence l'hétérogénéité des voies de signalisation dans ces cellules lors de l'acquisition de cette mutation supplémentaire. Le stade *MYD88<sup>wt</sup> CXCR4<sup>wt</sup>* est caractérisé par une voie NFKb moins active, contrastant avec la voie PI3K qui est très activée (avec l'augmentation de *CXCR3 AKT2...*). Ainsi, les mutations acquises au cours du développement de la maladie renforcent l'hétérogénéité des cellules B de ces patients.

#### B- Prédipositions génétiques – Cas Familiaux

La présence de cas de plusieurs personnes atteintes de cette pathologie au sein d'une même famille a été rapportée dans quelques études. Une grande partie de ces études ayant été effectuées dans les années 1990, certaines données qui pourraient permettre une meilleure compréhension des cas familiaux sont absentes (les mutations somatiques, l'infiltration médullaire en cytométrie...). Néanmoins, certaines observations laissent penser qu'une prédisposition génétique existe. Quelques études se sont intéressées à la caractérisation de l'IgM chez des familles où des cas de WM ou de IGM-MGUS ont été retrouvés (illustrées par McMaster<sup>313</sup>). Au sein d'une même famille présentant des cas de maladie de WM, l'IgM retrouvée peut-être discordante au niveau de sa chaîne légère (incluant une famille avec des jumeaux homozygotes malades), ou présenter des propriétés intrinsèques différentes (idiotype, allotype). Ainsi, la maladie de WM dans ces familles ne semble pas être due à une expansion clonale en réponse à un antigène commun. Concernant les risques familiaux, les études démontrent une proportion plus forte de développer un désordre lympho-prolifératif ou une maladie de WM (avec une prévalence de 18,7%) dans l'entourage du premier degré d'un patient atteint de la pathologie de WM. La présence d'une hémopathie maligne chez un patient augmente le risque pour son entourage du premier degré de développer une maladie de WM ou un désordre lymphoprolifératif (augmentation du risque global de 64%). De manière intéressante, certaines familles possèdent un nombre important de membres présentant une gammopathie à IgM. L'étude à long terme de ces cas, menée par McMaster et ses collaborateurs, démontre une progression de ces gammopathies vers un stade symptomatique de WM<sup>314</sup>. Enfin, certaines études démontrent une augmentation du risque des parents au premier degré de développer des tumeurs solides<sup>313,299</sup>.

Bien qu'aucun facteur prédictif n'ait été identifié, une étude de McMaster et ses collaborateurs met en évidence deux variants alléliques (dus à des SNP) corrélés à la présence

de cette pathologie. Ces deux loci sont retrouvés en position 6p25.3 et 14q32.13. Le variant retrouvé en position 6p25.3 a été incriminé comme locus de susceptibilité pour le DLBCL<sup>315</sup>. C'est un locus retrouvé proche des gènes *EXOC2*, *IRF4*, et *DUSP22*. Ils sont tous les trois susceptibles de jouer des rôles dans l'apparition de la maladie (augmentation de la prolifération pour *EXOC2*, régulation de la différenciation plasmocytaire pour *IRF4* et contrôle des voies de signalisation dont l'axe IL6/STAT3 pour *DUSP22*). Le deuxième variant allélique se trouve à proximité d'un long ARN non codant, *Linc02318*, ainsi que de trois gènes de la famille TCL (T-Cell Leukemia TCL) que sont *TCL1A*, *TCLB*, et *TCL6*. *TCL1* a été retrouvé surexprimé dans 78% des cas de WM analysés par Lemal et ses collaborateurs<sup>316</sup>. En étudiant les fonctions cellulaires sous-jacentes à une expression forte de *TCL1A*, ils démontrent que ce facteur est impliqué dans la prolifération cellulaire, la survie, et dans la progression tumorale des cellules B.

L'accès de plus en plus aisé aux technologies de séquençage à haut débit va permettre dans les années futures de mieux comprendre les mécanismes de prédispositions génétiques et les évolutions de cette maladie.

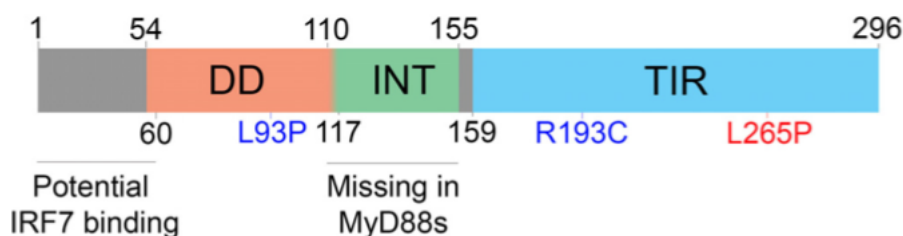
## II- Les facteurs génétiques associés à cette pathologie

D'un point de vue cytogénétique, aucune anomalie spécifique de la maladie de WM n'a été mise en évidence. On notera en revanche la délétion du bras long du chromosome 6 (6q) présente chez 50% des malades<sup>317</sup> (quelques autres anomalies moins représentées ont été mises en évidence comme la trisomie 18, les délétions 13q, 17p (Tp53) et 11q (ATM)<sup>318</sup>). Concernant les mutations somatiques, les technologies de séquençage du génome complet ont beaucoup aidé à la compréhension des altérations génétiques présentes dans la maladie de Waldenström. Treon et ses collaborateurs<sup>319</sup> ont été les premiers à générer ces données. Pour cela, ils ont séquençé 30 échantillons médullaires de patients malades avec pour 10 cas la contrepartie d'ADN constitutionnelle. Cela a permis de mettre en évidence la mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> qui est maintenant utilisée en routine pour confirmer le diagnostic de cette pathologie.

## A- Myeloid differentiation primary response 88

MYD88 est une protéine de 33kDa codée par le gène *MYD88* situé sur le chromosome 3p22.2. La structure de cette protéine est composée d'un domaine DD (Death Domain DD), un domaine intermédiaire INT et un domaine N-terminal de type TIR (Toll II1-R TIR)(Figure16). Le domaine TIR est un domaine d'interaction avec d'autres protéines contenant ce même domaine (qui peuvent être des récepteurs ou des cofacteurs). Le domaine DD permet l'association avec les protéines de la famille IRAK (IL-1R-associated kinase IRAK). La surexpression du domaine DD permet l'activation des voies de signalisation NFκB et JUN. A l'inverse, l'expression massive du domaine TIR a un effet de dominant négatif sur la fonction de la protéine. Le domaine intermédiaire INT quant à lui est sujet à un évènement d'épissage alternatif, il n'est pas décrit comme participant aux interactions protéiques mais il va être nécessaire pour l'activation de IRAK4 par exemple. MYD88 permet l'activation spécifique de la voie JUN et par la suite la phosphorylation d'AP-1<sup>320</sup>.

MYD88 est une protéine transductrice du signal des récepteurs TLR et de l'IL-1R. Elle est capable de se lier aux domaines TIR de ces récepteurs directement, excepté pour TLR4 où l'association avec la protéine transmembranaire TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein TIRAP) peut être nécessaire<sup>321</sup>.



**Figure 18 : Organisation des domaines de *MYD88*.** MYD88 est une protéine organisée en plusieurs domaines permettant d'interagir avec de nombreux co-facteurs. Le domaine TIR lui permet la liaison aux TLR ou au récepteur de l'IL-1 permettant la transduction du signal. La mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> est retrouvée dans ce domaine permettant l'activation constitutive de MYD88. Le domaine intermédiaire est le domaine sujet à l'épissage alternatif. Bien qu'il ne soit pas décrit comme domaine d'interaction avec des co-facteurs il participe à l'activation de cofacteurs. Le domaine DD permettra l'interaction avec les protéines de la famille IRAK (Deguine et Barton <sup>321</sup>)

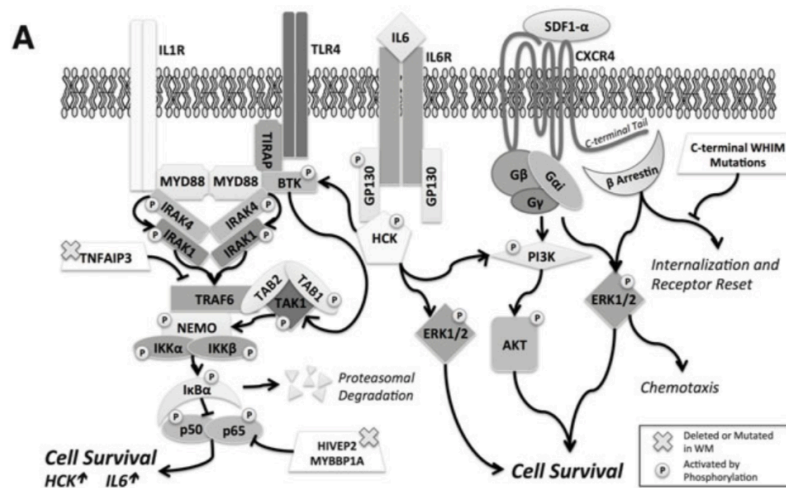
La liaison du ligand sur son récepteur (TLR ou IL1-R) permet l'association de MYD88 sur les domaines TIR intra-cytoplasmiques. Cette liaison va induire un changement conformationnel de MYD88 qui va pouvoir lier les protéines IRAK1 ou IRAK4 grâce à son domaine DD. Cette structure est appelée le myddosome et est composée de 6 MYD88 associées à 4 *IRAK4* et 4 *IRAK1*. Par la suite, le recrutement de TRAF6 (the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-

associated factor TRAF) au myddosome va être possible grâce à IRAK1. Cela va entraîner la dissociation du complexe de transduction du signal et son association avec la kinase TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1 TAK1), et ses protéines associées TAB1, et TAB2. Par la suite, IRAK1 se détachera de ce complexe, recrutant ainsi les E2 ligases UBC14 et UEV1A permettant d'activer TAK1. Cette kinase a pour fonction d'activer le complexe de régulation IKK qui va catalyser la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  induisant sa dégradation et ainsi permettre l'activation et la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau. TAK1 médie aussi l'activation de la voie JNK<sup>321,322</sup> (Figure 18).

Dans le cadre de la maladie de WM, Treon et ses collaborateurs ont donc mis en évidence la mutation L265P. Cette mutation induit un changement d'une leucine en proline en position 265. Elle a été retrouvée dans 90% des cas présentés dans cette étude<sup>319</sup> et cette proportion a été confirmée par d'autres investigations<sup>323</sup>. D'un point de vue fonctionnel, cela confère à MYD88 la capacité de s'homodimériser et de s'activer sans liaison au récepteur. Comme évoqué dans le cas d'une signalisation classique, l'activation de MYD88 entraîne un recrutement de IRAK1 et IRAK4 permettant la cascade de signalisation et donc une activation constitutive de NF $\kappa$ B dans ces cellules. Cette activation va renforcer les capacités de survie de la cellule tumorale et cela s'effectue par plusieurs mécanismes. Dans un premier temps, l'activation de la voie NF $\kappa$ B permet l'expression de gènes anti-apoptotiques (*BCLXL*, *c-FLIP*, et des gènes de la famille des protéines IAP) et de gènes de prolifération (*c-MYC*, *CCND1*)<sup>324</sup>. Ainsi, l'inhibition de cette voie de signalisation grâce à des inhibiteurs du protéasome permettant la stabilisation de I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>325,326</sup>, des inhibiteurs de la voie de signalisation AKT qui en temps normal inactivent I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>325,327</sup>, ou bien encore des inhibiteurs des protéines IRAK, entraîne une plus grande apoptose des cellules<sup>328</sup>.

Par ailleurs, l'équipe de Tréon<sup>329</sup> a démontré que MYD88<sup>L265P</sup> peut lier et activer BTK, ce qui va induire une augmentation de la voie de signalisation NF $\kappa$ B IRAK-indépendante. *In vitro*, l'ajout d'Ibrutinib permettant de bloquer l'activité enzymatique de BTK induit une baisse de la voie de signalisation NF $\kappa$ B, et une augmentation de l'apoptose. Enfin, l'ajout d'un inhibiteur de IRAK1/4 a une action synergique avec l'Ibrutinib pour inhiber NF $\kappa$ B et provoquer l'apoptose. MYD88<sup>L265P</sup> étant aussi retrouvée dans des lymphomes de haut grade, une étude de l'équipe de L.M Staudt a démontré que cette mutation entraînait la production d'IL-6 et d'IL-10 par les cellules tumorales de DLBCL<sup>330</sup>. Ces deux cytokines entraînant la survie et la

prolifération des cellules tumorales, des équipes de recherche se sont intéressées à leurs rôles dans la maladie de WM. En 2016, Ansell et ses collaborateurs<sup>331</sup> ont mis en évidence que chez les cellules de WM, la mutation *MYD88*<sup>L265P</sup>, via *IRAK1/4*, entraînait aussi la production d'IL-6 et IL-10. La même année, Yang et ses collaborateurs<sup>332</sup> ont mis en évidence la forte expression de la kinase HCK chez les cellules tumorales de WM mutées pour *MYD88*. Ainsi, les cellules tumorales sont sujettes à une boucle autocrine d'activation à l'IL-6. La production d'IL-6 permet la liaison de cette cytokine à son récepteur (GP130), provoquant la phosphorylation et l'activation de HCK, ainsi que l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3<sup>333</sup> (Figure 19). Yang et ses collaborateurs ont mis en évidence que la phosphorylation de HCK induisait l'activation des voies BTK, MAPK et PI3K/AKT. Ces trois voies promeuvent la survie de la cellule tumorale. De manière intéressante, le traitement *in vitro* des cellules avec de l'ibrutinib entraîne l'inhibition directe de HCK grâce à des liaisons non-covalentes, et une réduction de la survie des cellules *MYD88*<sup>L265P</sup>. Par ailleurs, l'activation de la voie de signalisation NFκB chez ces cellules est renforcée par des mutations touchant des régulateurs négatifs de la voie de signalisation, c'est par exemple le cas de *TNFAIP3* codant pour la protéine A20 ou bien le gène *TRAF3* qui régule la voie non-canonique de NFκB<sup>334,311</sup>.



**Figure 19: Voies de signalisations sous-jacentes à MYD88 et CXCR4 dans la pathologie de Waldenström :** Les cellules tumorales de WM possèdent des mutations gain de fonction pour *MYD88* (*MYD88*<sup>L265P</sup>) dans 90% des cas et des mutations gain de fonction *CXCR4* retrouvées dans 20-30% des cas. Ces mutations induisent l'activation constitutive des voies de signalisation NFκb, PI3K, er ERK soutenant la survie de la cellule. Par ailleurs, cette signalisation induit une boucle autocrine de production et d'intégration de l'IL-6 participant au renforcement de l'activation de ces voies de signalisation. (Leblond et al. 2017<sup>299</sup>).

## B- C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR-4)

CXCR4 est une protéine de 40kDa codée par le gène *CXCR4* situé sur le chromosome 22q22.1. C'est un récepteur membranaire couplé à une protéine G qui possède 7 domaines transmembranaires connectés par 6 boucles extramembranaires. La liaison de son ligand CXCL12/SDF1 induit l'activation des voies de signalisation PLC-B, PI3K/AKT, MAPK, JAK2 et JAK3(Figure17). La régulation de la signalisation de ce récepteur est médiée par un phénomène de désensibilisation. Ce processus est initié par la phosphorylation de la chaîne intracytoplasmique en C-terminal lors d'une réponse répétée à CXCL12. Cela permet le recrutement des  $\beta$ -arrestins (arrestins2/3) permettant de découpler le récepteur de son ligand et ainsi d'abolir la signalisation. Par la suite, le récepteur libre sera recyclé à la membrane ou bien dégradé par la voie du protéasome<sup>335</sup>.

Les altérations de l'expression de ce récepteur sont retrouvées dans de nombreux cancers<sup>336</sup> et, de manière similaire à la pathologie de WM, des défauts du processus de désensibilisation ont été observés dans le syndrome WHIM (Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, Myelokathexis)<sup>337</sup>. Dans cette pathologie, les patients sont porteurs de mutations non-sens, ou induisant des décalages du cadre de lecture du gène. Ces mutations aboutissent à la perte des 10-19 acides aminés en position C-terminale contenant les sérines essentielles au processus de désensibilisation du récepteur. Fonctionnellement, cela a été mis en évidence par Balabanian et ses collaborateurs. En analysant les séquences des gènes *CXCR4* retrouvés chez des patients atteints du syndrome de WHIM, ils ont observé une délétion du gène dans sa partie en C-terminale. Cette délétion induit un défaut de désensibilisation des cellules à la stimulation CXCL12 et donc une réponse continue lors de la stimulation. Cette étude démontre une signalisation CXCR4 continue dans les cellules T menant à des défauts de contrôle de l'infection au papillomavirus humain. Par la suite, Biajoux et ses collaborateurs<sup>338</sup> ont évalué les rôles intrinsèques aux LB murins de la mutation *CXCR4*<sup>+1013</sup> (modèle murin portant une mutation récapitulant le syndrome WHIM). De manière intéressante, dans une réponse T dépendante, l'activation continue de la signalisation CXCR4 promeut l'activation des cellules B et la différenciation de celles-ci dues à l'activation des voies de signalisation ERK et AKT. Les auteurs ont néanmoins observé que l'immunité à long terme chez ces souris était déficiente. L'analyse de la moelle démontre une accumulation de plasmocytes non matures induisant probablement un défaut de localisation des plasmocytes matures générant cette



immunité à long terme. Dans cette étude, la stimulation *in vitro* des LB avec du CXCL12 induit une forte production d'IgM, ainsi qu'une expression plus importante des gènes codant les FT tels que *PRDM1*, *IRF4* et *XBP1* en comparaison à une stimulation seule du BCR. De ces observations, on peut émettre l'hypothèse que les mécanismes de différenciation de ces cellules seraient altérés avec une différenciation qui semble plus rapide. Dans la pathologie de WM, *CXCR4* est le second gène retrouvé le plus muté (entre 25% et 30% des patients analysés<sup>339</sup>). Tout comme dans le syndrome de WHIM, la perte de la partie intracytoplasmique en C-terminale induit des défauts de phosphorylation des sérines et donc une perte de la capacité d'endocytose du récepteur. Cela représente donc une mutation gain de fonction. Cao et ses collaborateurs<sup>340</sup> ont mis en évidence que la mutation *CXCR4*<sup>S338X</sup>, notamment retrouvée dans les pathologies de WHIM et de WM, induisait l'activation des voies de signalisation ERK et AKT lors d'une stimulation CXCL12 continue. En évaluant la viabilité cellulaire des cellules exprimant ce récepteur muté, ils ont mis en évidence que l'activation soutenue de ERK et AKT entraînait la survie des cellules mais aussi une résistance au traitement à l'Ibrutinib. Cette réponse forte et constitutive des cellules tumorales va permettre un « homing » des cellules dans la moelle.

#### C- AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)

ARID1A est une protéine de 242kDa codée par le gène *ARID1A* situé sur le chromosome 1p36.1. Cette protéine fait partie du complexe SWI/SNF qui a pour rôle de remodeler la chromatine et de permettre la transcription des gènes. Ce complexe de 12-15 constituants est composé d'un système « core » composé d'une ATPase (SMARCA2 ou SMARCA4) et de SMARB1, SMARCC1, SMARCC2 capables *in vitro* de mobiliser les nucléosomes. L'association avec les composants restant dont ARID1A est à l'origine de la spécificité d'assignement du complexe. Ce gène a été retrouvé muté dans 20% des cas de WM<sup>341</sup> entraînant une perte de fonction. L'étude transcriptionnelle réalisée par l'équipe de Tréon<sup>341</sup> démontre que les cellules de patients porteurs d'une mutation pour *ARID1A* sont caractérisées par une signature de 16 gènes différemment régulés par rapport aux patients non mutés. Parmi les 16 gènes retrouvés, *CXCL13* est surexprimé chez les patients possédant une mutation *ARID1A*. Dans une étude sur les lymphomes T, l'augmentation de *CXCL13* a été décrite comme attirant les mastocytes dans la moelle<sup>342</sup>. Comme nous le verrons plus tard, ces cellules sont très

représentées dans la moelle de ces patients et elles favorisent la croissance et la survie des cellules tumorales<sup>343</sup>. On peut donc émettre comme hypothèse que les patients présentant une mutation *ARID1A* ont un fort taux de mastocytes dans la moelle contribuant à la croissance/survie des cellules tumorales. Pour tester cela, un dosage de CXCL13 médullaire chez ces patients et une analyse en cytométrie de flux permettrait de corréler la présence des mastocytes et les taux de CXCL13. Par ailleurs, d'autres mutations somatiques moins fréquentes ont été observées comme CD79a/CD79b, TP53, MLL2<sup>317</sup> et tout récemment une nouvelle mutation récurrente dans le gène *SPI1* présente dans 5% des patients<sup>344</sup>. L'équipe d'Olivier Bernard confirme, par une étude de séquençage whole exome et ciblée de 85 patients, les mutations les plus fréquentes ainsi que cette nouvelle mutation Q226E dans le domaine ETS de liaison à l'ADN de PU1, modifiant son affinité et spécificité pour ses gènes cibles, et associée à une augmentation de la prolifération et un blocage de la différenciation PC.

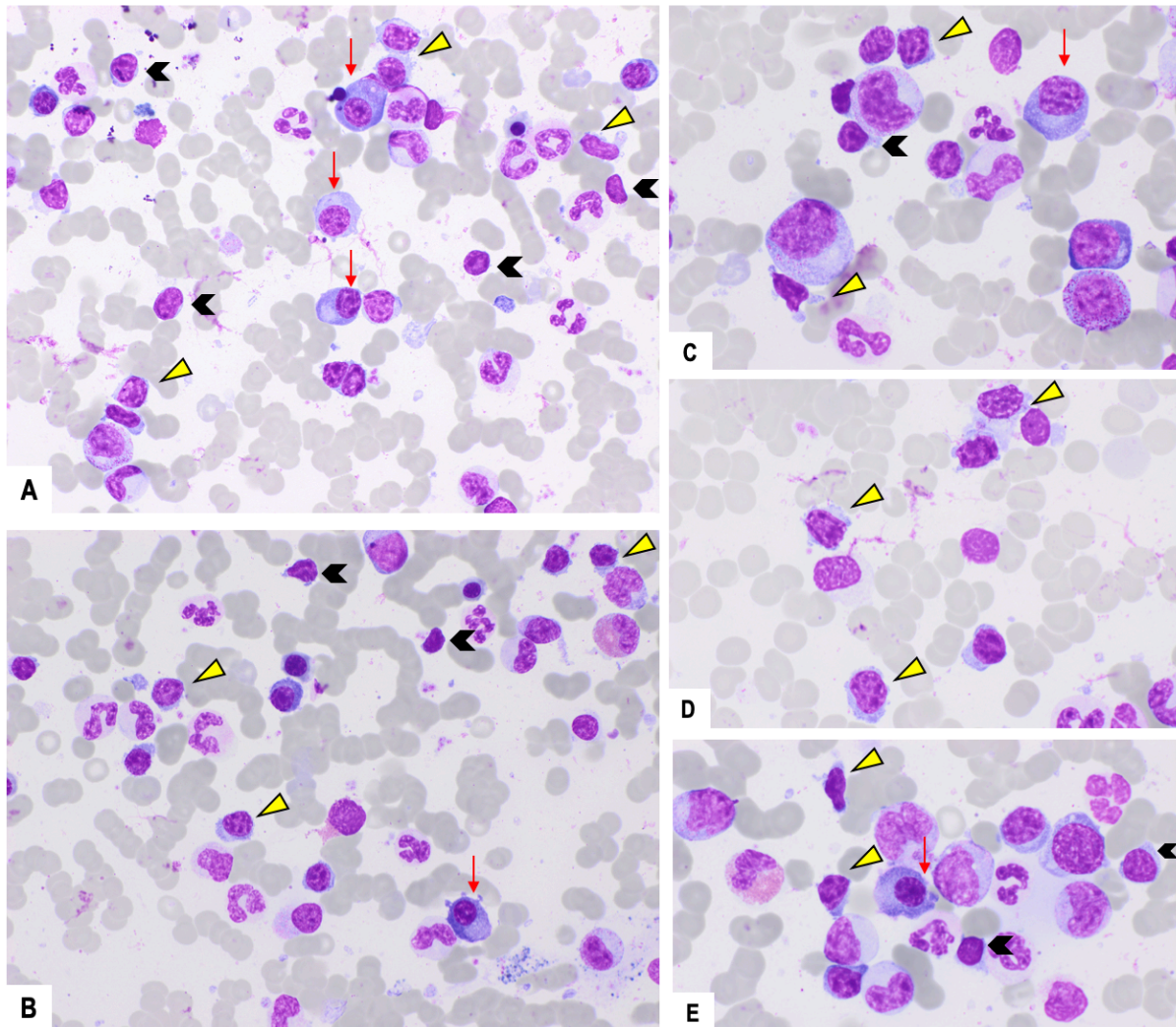
### III- Les composants cellulaires de cette pathologie

#### A- Le compartiment médullaire

##### A-1- Les cellules B

Chez ces patients, l'invasion médullaire des LB est caractérisée par la présence d'un continuum de différenciation comprenant des lymphocytes de petite taille, des cellules lympho-plasmocytaires et des plasmocytes<sup>345</sup> (Figure 20). Outre les différences phénotypiques mises en évidence en immuno-histochimie ou par coloration Giemsa, aucune étude dans la littérature ne caractérise les différences transcriptionnelles existantes entre ces populations. Gutiérrez et ses collaborateurs<sup>346</sup> ont généré des données transcriptomiques de plasmocytes tumoraux (CD138<sup>+</sup>) et les LB (CD19<sup>+</sup>) de la moelle de ces patients, cependant la comparaison entre les deux compartiments n'a pas été publiée. Nous reviendrons sur les gènes identifiés comme étant différentiellement exprimés dans les cellules tumorales par rapport à leurs contreparties normales dans la dernière partie de ce chapitre. Cependant toutes les études publiées ont pour limite le fait qu'elles soient réalisées sur des populations cellulaires constituées de cellules hétérogènes. Le moyennage de l'expression génique de

cellules hétérogènes et le choix de la contrepartie normale rend difficile l'interprétation des résultats.



**Figure 20 : Illustration de l'infiltrat médullaire chez les patients atteints de la maladie de Waldenström.** Cette illustration regroupe 5 myélogrammes différents (Coloration May-Grünwald Giemsa). Les lymphocytes B matures sont représentés par des têtes flèches noires pleines, les lympho-plasmocytes par des flèches jaunes pleines, et les plasmocytes par des flèches rouges. Les lympho-plasmocytes sont caractérisés par une chromatine hypermottée, un cytoplasme festonné (non lisse) et une taille générale légèrement plus importante que les LB matures. (M.Haas, CHU Pontchaillou, Rennes).

## B- Les cellules du micro-environnement

Le LB de Waldenström est décrit comme étant dépendant de son microenvironnement (Figure 21).

### B-1- Les cellules stromales

Parmi les cellules du micro-environnement médullaire on retrouve les cellules stromales de la moelle (Bone Marrow Stromale Cells BMSC). Des études de co-culture *in vitro* ont démontré

des rôles supportifs dans la croissance et la survie des cellules tumorales<sup>326,327</sup>. Ces effets vont être médiés par le contact entre les cellules WM et les BMSC. Pour cela, les BMSC sécrètent le CXCL12 qui va être nécessaire au recrutement et au maintien des cellules dans la niche hématopoïétique. Le contact avec les cellules stromales va être renforcé par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion à la surface de la cellule tumorale comme par exemple VLA-4 en réponse à la stimulation CXCL12<sup>347</sup>. L'étude protéique des cellules CD19<sup>+</sup> menée par Hatjiharissi et ses collaborateurs<sup>348</sup> a elle aussi démontré une augmentation de l'expression de protéines d'adhésion chez les CD19<sup>+</sup> issues de la moelle de patients. Ce contact étroit a été démontré comme promouvant l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le contexte pathologique de WM<sup>326, 327</sup>. L'implication de cet axe de communication CXCL12/CXCR4 a plus généralement été démontrée dans de nombreux cancers. Cela induit l'activation des voies de signalisation NFκB, MAPK, SRC Kinase responsable de la survie des cellules cancéreuses<sup>349</sup>. De plus, lors d'une étude visant à monitorer la présence des cytokines sériques chez les patients atteints de la pathologie de WM, Elswa et ses collaborateurs<sup>350</sup> ont mis en évidence la forte concentration de CCL5/Rantes. Ils ont par la suite démontré que cette cytokine induisait chez les cellules stromales médullaires de ces patients une augmentation de la production d'IL-6. Cette cytokine permet ensuite, chez la cellule tumorale, une augmentation de l'activation des voies ERK, STAT1, et STAT2 favorisant la production d'IgM par ces cellules.

### B-2- Les mastocytes

Il faut aussi noter que l'on retrouve dans la moelle des patients, une proportion significativement plus importante de mastocytes<sup>351</sup>. Tournilhac et ses collaborateurs<sup>352</sup> se sont attachés à comprendre le rôle de ces mastocytes dans ce contexte. Ils ont mis en évidence que contrairement aux mastocytes présents chez les individus sains, les mastocytes présents dans la moelle des patients de WM expriment le CD40L. Dans un modèle de co-culture *in vitro*, ils ont démontré que les mastocytes augmentent les capacités de prolifération des lymphoplasmocytes de WM et que cet effet est partiellement inhibé par l'ajout d'un anticorps bloquant anti-CD40. Il serait intéressant d'analyser les rôles CD40L indépendant de ces mastocytes, en effet la réduction de prolifération étant de l'ordre de 50% lors du traitement avec l'anti-CD40 bloquant, cela suggère d'autres mécanismes de soutien de ces cellules. Par la suite Ho et ses collaborateurs<sup>353</sup> se sont intéressés à la production du CD27 soluble par les

LB tumoraux et son impact sur les mastocytes. Ils ont dans un premier temps démontré que les cellules tumorales exprimaient le gène *CD27*, mais ne présentaient pas cette protéine à la membrane. Après avoir confirmé la production d'un CD27 soluble (sCD27), ils ont démontré que via la fixation sur le CD70 présent à la surface des mastocytes, le sCD27 entraînait une augmentation de la production du CD40L et de APRIL par ces cellules contribuant à la prolifération des cellules tumorales.

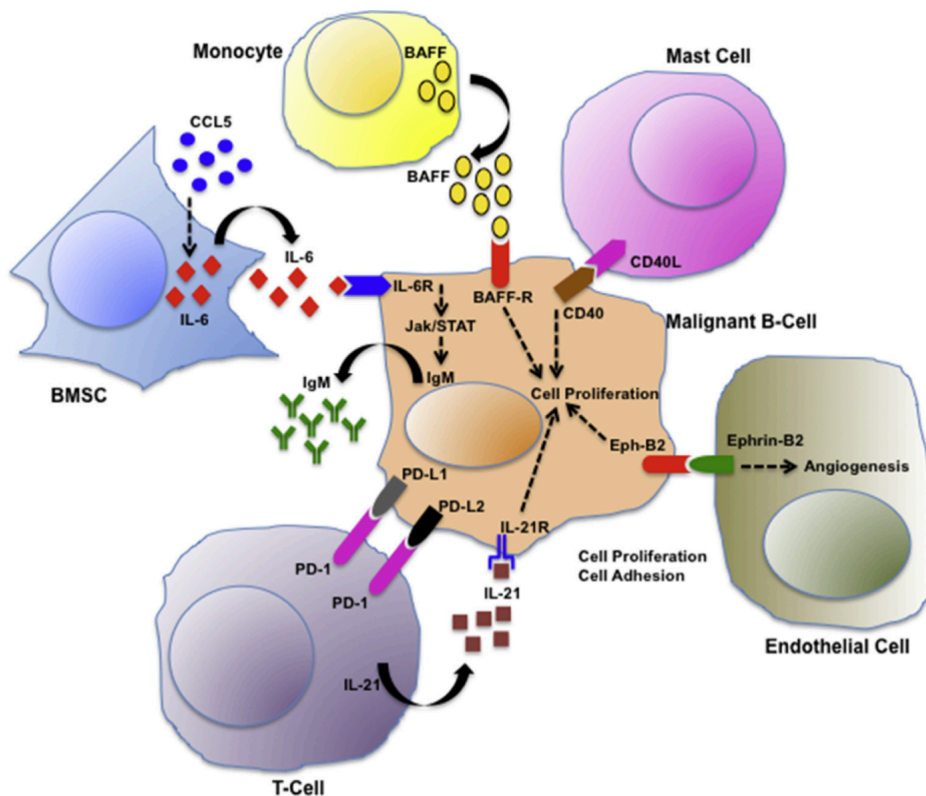
### *B-3- Les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales médullaires possèdent aussi un rôle dans le soutien des cellules tumorales de WM. L'équipe de Ghobrial<sup>354</sup> a mis en évidence que l'un des mécanismes mis en jeu était une interaction forte entre ces cellules médiée par l'axe de communication Ephrin-B2/Ephrin-B2-recepteur (EphrinB2/Eph-B2). Ils ont dans un premier temps observé une expression très forte de Eph-B2 sur les cellules de patients. En utilisant des systèmes de co-cultures *in vitro*, ils ont démontré que la liaison EphrinB2/Eph-B2 entraînait une signalisation bi-directionnelle dans les deux cellules. Ces deux mécanismes engendrent un contact étroit entre les deux cellules grâce à des intégrines. Cela induit l'augmentation des capacités de prolifération de la cellule tumorale via la phosphorylation d'AKT, et l'activation des cyclines D et E promouvant la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire. Les cellules endothéliales permettent aussi une vascularisation importante de la niche hématopoïétique, plusieurs études relatent l'importance du facteur de Willebrand (von Willebrand Factor VWF) dans le diagnostic et l'évolution de la maladie. Hivert et ses collaborateurs<sup>355</sup> évoquent l'hypothèse que l'activation constitutive des cellules endothéliales induit la production constante de ce facteur. Les patients avec un taux important de VWF ont une vascularisation plus importante de la niche hématopoïétique et récemment le groupe de Dimopoulos<sup>356</sup> a démontré qu'un taux important de VWF au diagnostic est de mauvais pronostic pour le patient.

### *B-4- Les cellules T*

Devant les nombreuses interactions qui existent entre les LB et les LT au sein du système immunitaire, il semble cohérent d'évaluer le rôle des LT dans la pathologie de WM. Parmi les

nombreux acteurs de ces dialogues, Hodge et ses collaborateurs<sup>357</sup> ont concentré leurs efforts dans la compréhension du mécanisme de soutien des cellules tumorales par l'IL-21. Ils ont démontré que les LT présents dans la moelle de ces patients sécrétaient de l'IL-21 lors de la stimulation par un anti-CD3/anti-CD28. L'intégration par les LB tumoraux entraîne une activation des voies de signalisation STAT1, STAT3, et STAT5 induisant la prolifération des cellules malignes et la production d'IgM et d'IL-6. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le traitement des cellules à l'IL-21 permet l'augmentation de l'expression de *Prdm1*, *Xbp1*, ainsi que la répression de *Pax5* suggérant leur engagement vers un stade plus différencié. Par ailleurs l'activation constitutive de la voie STAT5 dans les cellules WM a été impliqué dans la sécrétion massive d'IgM par ces cellules<sup>358</sup>, ainsi l'IL-21 doit participer au maintien de celle-ci.



**Figure 21 : Microenvironnement médullaire du clone tumoral dans la maladie de Waldenström.** L'environnement médullaire dans cette pathologie est très hétérogène. De nombreux signaux trophiques vont aboutir à la survie et la prolifération de la cellule tumorale. Les mastocytes soutiennent la prolifération cellulaire grâce à l'augmentation de l'expression du CD40L. La signalisation bi-directionnelle entre la cellule endothéliale et la cellule tumorales grâce à l'axe de communication Eph-B2/Ephrin-B2 favorisera la survie du clone et l'augmentation de l'angiogenèse dans la niche tumorale. Les cellules stromales favoriseront la production massive d'IgM grâce à la production continue d'IL-6. Les LT soutiendront la prolifération cellulaire grâce à l'IL-21.

## C- Le compartiment sanguin

La présence de cellules possédant une IgM membranaire avec un ratio de chaîne légère kappa/lambda dérégulé dans le sang de patients atteints de la pathologie de WM a été mise en évidence très tôt, dès 1972 par Preud'homme et Seligmann<sup>359</sup>. Par la suite, ces données ont été confirmées par deux études démontrant la présence de cellules monoclonales dans le sang indépendamment du stade de la maladie<sup>360,361</sup>. L'émergence des technologies d'étude des mutations a permis de mettre en évidence que les cellules tumorales circulantes possédaient un VDJ similaire aux cellules de la moelle<sup>300</sup>. Plus récemment encore, deux études mettent en évidence la possibilité de détection de la mutation MYD88<sup>L265P</sup> dans les cellules circulantes des patients<sup>323,362</sup>. Les travaux de l'équipe de Brouet en 1990 démontrent la capacité des LB circulantes de patients WM de se différencier *in vitro* en plasmocytes selon des critères morphologiques, la présence d'Ig cytoplasmiques et de sécrétion d'IgM.<sup>363</sup> Malgré ces observations, très peu d'études viendront étayer la description et fonctionnalité de ces cellules.

## IV- La pathologie de WM : L'hypothèse d'une différenciation avortée

### A- La différenciation avortée

Plusieurs éléments de la littérature peuvent étayer la thèse d'une différenciation avortée à l'origine de la maladie de WM. En effet, d'un point de vue transcriptionnel, ces cellules ont une expression des facteurs identitaires B et plasmocytaire qui pourrait correspondre à un stade transitoire de différenciation. Dans une étude menée par l'équipe de Tréon<sup>341</sup>, les transcriptomes de LB CD19<sup>+</sup> de la moelle de patients et des LB mémoires et naïfs circulants isolés à partir du sang de donneurs sains ont été comparés. Il a été mis en évidence que les LB CD19<sup>+</sup> de la moelle de patient possédaient une expression forte des marqueurs de différenciation (*PRDM1*, *IRF4*, *XBP1*, *SDC1*), mais aussi une expression marquée des facteurs de l'identité B (*SPIB*, *PAX5*, *IRF8* et de *BACH2*) suggérant le blocage des LB à un stade lympho-plasmocytaire. Ces données sont néanmoins difficiles à interpréter. En effet, aucune information sur l'envahissement médullaire et la répartition des petites cellules B, des cellules lympho-plasmocytaires et des plasmocytes n'est fournie. L'hétérogénéité des LB dans la

moelle des patients est importante. Ainsi la sélection des cellules sur l'expression du CD19 dans la moelle, tout comme la comparaison à des LB CD19<sup>+</sup> de la circulation sanguine, ne facilitent pas l'analyse. Cette signature pourrait correspondre au résultat du moyennage de l'expression des gènes de LB et de plasmocytes. Une étude<sup>346</sup> a contourné ces biais grâce à des tris des populations lymphocytaires B (CD19<sup>+</sup>) et des plasmocytes (CD138<sup>+</sup>) présents dans la moelle de patients. Parmi les dérégulations transcriptionnelles mises en évidence, une expression plus faible de *BACH2*, *IRF8*, *IL4R*, *MEF2C*, ainsi qu'une expression plus forte de *BTK*, *CD69*, et *CD83*, *IL6*, et *HCK* a été retrouvée en comparant les LB pathologiques à des LB non pathologiques. Ces observations évoquent un état de pré-activation des cellules du compartiment lymphocytaire B. La comparaison des plasmocytes WM a mis en évidence une expression forte de *PAX5*, et une plus faible expression de *BLIMP1* et *IRF4* lors de la comparaison avec des plasmocytes normaux de moelle. Par ailleurs, les plasmocytes de patients semblent avoir une activité proliférative plus intense avec l'expression des éléments *JUN*, *FOSB* et *BATF* participant à la formation du complexe AP-1. Il semblerait donc que les plasmocytes de moelle chez ces patients maintiennent une identité lymphocytaire B plus forte ainsi qu'une identité plasmocytaire plus faible que des PC normaux. La présence anormale de *PAX5* dans certains plasmocytes CD138<sup>+</sup> a été confirmée par Roberts et ses collaborateurs<sup>364</sup> en immunohistochimie. De plus Zhou et ses collaborateurs<sup>365</sup> ont démontré une expression forte de *SPIB* dans les cellules de patients. *SPIB* étant un régulateur négatif de *PRDM1*, *IRF4*, et de *ID2*, sa répression forcée entraîne une levée de l'inhibition de la différenciation des cellules et une augmentation de l'expression de *PRDM1* et *IRF4* chez les cellules de patients. Une expression plus importante dans les cellules tumorales du TF OBF1, qui agit en complexe avec POU2F2 et POU2F1 pour induire la transcription de *SPIB*, pourrait être impliqué dans le blocage de la différenciation. Ainsi, il semble que le réseau de gènes gouvernant l'identité des LB soit perturbé dans cette pathologie. A noter que deux gènes centraux dans le contrôle de la différenciation plasmocytaire, la recombinaison de classe des Ig et la sécrétion d'Ig, *BACH2* et *PRDM1*, sont localisés sur le bras long du chromosome 6 fréquemment délété chez les patients WM.

Une étude récente<sup>366</sup> s'intéresse au rôle de BLIMP1 codé par *PRDM1* dans les cellules de WM. Les résultats suggèrent que BLIMP1 promeut la survie des cellules WM et pourrait être impliqué en coopérant avec EZH2 dans la régulation de gènes impliqués dans l'évasion de la réponse immune. Ainsi BLIMP1 réprime l'expression de gènes codant des ligands



membranaires impliqués dans l'activation des LT et cellules NK (tels que ICOSLG, TNSF9, CLEC2B, ICAM) et des gènes impliqués dans les points de contrôle de l'immunité (TNFRSF14, BTLA, HAVCR2, LGALS9, PDL2), suggérant l'existence d'une résistance à l'immunosurveillance des cellules WM du fait de l'expression de BLIMP1. L'expression de *PRDM1* est en aval de la signalisation MYD88<sup>367</sup> et son expression est augmentée dans les cellules mutées *MYD88*<sup>L265P</sup><sup>341</sup>. Cependant la délétion hétérozygote du locus 6q emportant *PRDM1* est plus fréquente dans les cellules MYD88<sup>L265P</sup><sup>305</sup>. L'hypothèse formulée par Andersen et ses collaborateurs est que le niveau d'expression intermédiaire de BLIMP1 dans les cellules WM lui permettrait d'assurer son rôle dans la survie des cellules sans exercer d'effet inhibiteur sur la prolifération ce qui est observée lorsque les niveaux d'expression de BLIMP1 sont très élevés<sup>368,369</sup>.

En étudiant le rôle de BACH2 dans la différenciation plasmocytaire et la dynamique de son expression et de ses gènes cibles (*cf section résultats: Article 1 + résultats non publiés*), cet aspect avorté de la différenciation lymphocytaire dans la maladie de WM a attisé notre curiosité. De nombreux éléments présents dans cette pathologie peuvent orienter la réflexion vers le rôle de la régulation de BACH2 chez ces cellules. En effet, en plus de sa localisation sur le chromosome 6q, la sécrétion massive d'IgM rappelle le phénotype des souris KO pour *BACH2*<sup>171</sup> et le phénotype des plasmablastes générés via l'inhibition transitoire de BACH2 dans des LB activés humains (Résultats [Projet 1](#)). Bach2 étant un TF régulant de nombreux gènes, sa mauvaise régulation pourrait expliquer cet état de différenciation incomplète.

## B- Rôles de BACH2 dans la lymphomagénèse

Le rôle de BACH2 dans la lymphomagénèse n'est pas très bien connu à ce jour. Malgré cela, des études relatent des altérations géniques pouvant impacter ce gène. *BACH2* a été décrit comme étant un « hotspot » de mutation induit par AID associé au phénomène d'hypermutation-somatique. Jiang et ses collaborateurs<sup>370</sup> rapportent que la mutation induite par AID dans l'intron 1 de *BACH2* permet l'augmentation de l'activité de son promoteur de 40% dans un système rapporteur transfecté dans OCI-Ly1. Par la suite Kobayashi et ses collaborateurs<sup>371</sup> ont décrit la présence d'une translocation chromosomique mettant *BACH2* sous contrôle du promoteur des chaînes lourdes des Ig C $\delta$ . Ces mêmes auteurs démontrent une augmentation de la transcription de *BACH2* dans des lignées de cellules B de lymphomes Non-Hodgkiniens. De plus, dans une lignée de lymphome de Burkitt, la translocation *BACH2*-

*BCL2L1* est retrouvée et elle aboutit à une augmentation importante de la protéine anti-apoptotique BCL-XL<sup>372</sup>. Par ailleurs, *Bach2* semble être la cible d'insertion de génomes viraux pouvant déréguler son expression et son activité<sup>373,374</sup>. Enfin, la détection de *BACH2* en immunohistochimie a permis de stratifier deux groupes de patients atteints de DLBCL dont un de meilleur pronostic lorsque l'expression de *BACH2* était plus importante.

Trois publications font référence à *BACH2* dans le cadre de la pathologie de WM. L'étude du transcriptome des LB WM de moelle réalisée par Gutierrez et ses collaborateurs<sup>346</sup> a démontré une expression plus faible de *BACH2* dans les LB de moelle de patients pouvant correspondre à un stade activé des LB tumoraux. Plus récemment, Herbaux et ses collaborateurs<sup>375</sup> ont démontré un niveau d'expression plus fort de *BACH2* dans les stades asymptomatiques de la maladie comparés aux stades symptomatiques, ils évoquent le rôle protecteur du maintien de l'expression de *BACH2* dans les cellules tumorales. Au cours de leur étude, la surexpression forcée de *BACH2* dans une lignée de LB de WM induit une baisse de l'activité clonogénique de cette lignée. Ainsi *BACH2* semble jouer un rôle de gardien dans la progression de la maladie. Enfin, une dernière étude<sup>301</sup> menée sur les LB de WM décrit une expression plus importante de *BACH2* dans les LB de WM comparés aux LB de la moelle CD22<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (composés majoritairement de LB naïfs). Ils démontrent une surexpression de *BACH2* dans les cellules tumorales au même titre que *CD25*, *IL21R*, *CD27*... Ces résultats discordants avec les deux premières études sont à nuancer au regard des valeurs de « fold-change » associées à l'augmentation de l'expression. Aucun cut-off de fold-change ne semble avoir été choisi pour définir les gènes dont l'expression est augmentée, c'est donc pour cela que *BACH2* (FC = 0.3) est déclaré surexprimé au même titre que *IL2RA* (FC=4.57).

\*\*\*\*\*

Dans ce chapitre, nous avons vu que la pathologie de Waldenström est un désordre lymphoprolifératif de cellules B hétérogènes. Les mutations génétiques ainsi que le micro-environnement médullaire permet la survie et la prolifération du clone. Les caractéristiques phénotypique et transcriptionnelle de la cellule sécrétante convergent vers la notion d'un blocage de la différenciation en cellules effectrices.

## **OBJECTIFS**

## Objectifs

Les objectifs de ma thèse s'inscrivent dans le travail de compréhension des processus physiologiques engageant le lymphocyte B mature vers la différenciation plasmocytaire : mécanismes intrinsèques et mécanismes résultant de l'interaction du LB avec son microenvironnement, pour tester leurs implications dans les processus de lymphomagenèse.

Ces dernières années ont été marquées par une progression importante dans la connaissance de la physiologie des cellules B *in vivo* et de leur différenciation en plasmocytes grâce aux modèles murins et à l'imagerie *intra vitale*. La transposition à l'homme des connaissances acquises chez la souris soulève cependant des difficultés.

De plus si les fonctions des FT impliqués dans la différenciation ont largement été étudiées dans des modèles murins, la hiérarchie exacte et la relation entre ses facteurs de transcription ainsi que la connaissance des facteurs extrinsèques dont les cytokines et des interconnexions entre les voies de signalisations impliquées dans la régulation de ces facteurs sont encore limitées. Ainsi les effets des cytokines produites par le LT restent imparfaitement compris. De façon importante les pathologies dérivées des LB sont fréquemment associées à la dérégulation de ces FT.

Le laboratoire a développé un modèle contrôlé permettant la différenciation *in vitro* des lymphocytes B naïfs humains jusqu'au stade plasmablastique. C'est un modèle particulièrement adapté pour étudier la dynamique temporelle des voies de signalisations et leur contribution respective à la régulation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation terminale des LB. L'équipe a identifié à l'aide de cet outil que la cytokine IL-2, par sa voie de transduction spécifique MAPK-ERK, constitue un signal déterminant dans l'engagement plasmocytaire<sup>133</sup>.

L'investigation du mécanisme moléculaire qui sous-tend l'action de l'IL-2 et le lien avec la voie de signalisation ERK et l'identification du gène cible BACH2 a fait l'objet du travail de thèse d'Hannah Symington et de mon premier objectif de thèse ([Projet 1](#)). Hannah s'est concentrée sur les études fonctionnelles et de cartographie des séquences régulatrices de *BACH2*. Nous

avons contribué à montrer que BACH2, un facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'identité B, est un effecteur majeur de la signalisation IL-2 (travaux publiés dans *Nature Communications*). Dans ce modèle de différenciation plasmocytaire *in vitro*, l'IL-2 semble être le garant d'une différenciation complète. En effet l'extinction précoce de BACH2 conduit à l'émergence de cellules à double identité PC/B IgM. J'ai caractérisé le programme transcriptionnel au-delà de BACH2 nécessaire à la maturation des cellules différenciées (travaux non publiés).

Le second objectif a été **d'évaluer plus généralement les changements transcriptomiques survenant au cours de la différenciation terminale des LB humains pour une meilleure compréhension de la différenciation plasmocytaire normale (Projet 2) et tumorale (Projet 3)**. La réponse cellulaire aux signaux de différenciation est souvent très hétérogène et non synchronisée, de plus les lymphocytes B activés sont rares, transitoires et très hétérogènes *in vivo*. Une cascade complexe d'évènements régulés et coordonnés au niveau moléculaire se produisent. Pour cet objectif nous avons réalisé le séquençage du transcriptome de sous-populations lymphocytaires contenant les progéniteurs des plasmablastes à différents temps de la différenciation *in vitro*. Nous avons utilisé une approche populationnelle mais aussi sur cellule unique pour discriminer les variations fines de l'expression génique (Projet 2). Les résultats obtenus constituent une base importante de données uniques. De nouveaux gènes identifiés par cette approche, potentiellement impliqués dans la régulation du processus de différenciation terminale, seront testés fonctionnellement dans le modèle de différenciation *in vitro*.

Le troisième objectif a été d'étudier **les changements transcriptomiques survenant au cours de la différenciation avortée des cellules B issues de patient atteint de la pathologie de Waldenström**. Pour cela, nous avons étudié la différenciation *in vitro* des cellules sanguines de ces patients à l'échelle de la cellule unique. Nous avons par ailleurs séquencé les cellules CD19<sup>+</sup> de la moelle de ces individus à l'échelle de la cellule unique pour avoir la contre-partie dans la niche tumorale, et comparer la clonalité des cellules différenciées *in vitro* avec celles présentes dans la moelle. Les résultats obtenus confirment la puissance de la technologie utilisée pour étudier l'hétérogénéité des cellules tumorales et leur identité cellulaire.

## **RESULTATS**

## Résultats

Projet 1 : IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression.

Hipp N\*, Symington H\*, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, Fest T, Delaloy C.

\* Contributed equally to this work

Nature Communications. 2017 Nov 13;8(1):1443

---

La différenciation terminale des lymphocytes B est un processus dynamique permettant de générer des plasmocytes sécréteurs d'anticorps ainsi qu'une mémoire immunitaire. Sous l'influence des signaux trophiques du micro-environnement, la cellule B naïve va s'activer, proliférer puis se différencier en cellule effectrice. Ce processus est fortement régulé par un ensemble de facteurs de transcription qui va finement réguler l'identité de la cellule. Ainsi, on distingue des gènes de l'identité B constituant des « freins » de la différenciation (*BCL6*, *PAX5*, *IRF8*, *BACH2*...) et des gènes de l'identité plasmocytaire (*IRF4*, *PRDM1*, *XBP1*...). Bien que ces gènes identitaires soit connus, l'hétérogénéité des signaux trophiques reçus par le LB au cours de sa signalisation complique la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes. De manière intéressante, cette identité génique est retrouvée altérée dans de nombreux cancers hématologiques et la cellule à l'origine de ce désordre malin est une cellule bloquée dans un stade de différenciation (illustré par Basso et Dalla-Favera<sup>26</sup>).

Ces observations impliquent donc de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes pour comprendre leurs dérégulations dans la pathologie. Au cours de ce projet, nous avons concentré nos efforts dans la compréhension des mécanismes de régulation de *BACH2* par l'interleukine-2. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de différenciation des lymphocytes B humains mis en place au laboratoire<sup>133</sup>. Ce modèle est décomposé en deux phases, une phase de d'activation et de prolifération durant 4 jours où les cellules sont en contact avec un anti-BCR, du CD40L, du CpG et de l'IL-2 si indiqué. S'en suit une seconde phase de 3 jours de maturation/ différenciation où les cellules sont en culture

avec de l'IL-2, IL-4, IL-10. L'ajout d'IL-2 dans la première phase de ce modèle est nécessaire à la différenciation plasmablastique. Dans ce projet, nous avons mis en évidence que :

- l'intégration du signal de différenciation IL-2 est très hétérogène dans la culture de lymphocytes B naïfs humains.

- l'IL-2 permet la régulation de l'expression dynamique de BACH2 grâce à l'activation de la voie de signalisation ERK/ELK1. Cette régulation passe par la fixation de ELK1 dans une région régulatrice de BACH2 : un enhancer localisé dans l'intron 1 du gène.

- La répression forcée de BACH2 par siRNA dans notre modèle est suffisante pour générer des plasmablastes en l'absence d'IL-2.

- Cette répression forcée permet l'expression d'un programme transcriptomique commun avec les cellules traitées à l'IL-2. Ce programme transcriptomique partagé entre les deux conditions est suffisant pour promouvoir la différenciation, confirmant le rôle clef de BACH2 dans le blocage de la différenciation plasmocytaire.

- Enfin, nous avons réalisé le séquençage de chromatine immunoprécipitée par BACH2 (ChIP-seq) permettant de mettre en évidence l'ensemble de son régulome et en particulier des gènes cibles impliqués dans la régulation des voies de l'apoptose et de la transformation tumorale dans les lymphomes.



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-01475-7

OPEN

# IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression

Nicolas Hipp<sup>1</sup>, Hannah Symington<sup>1</sup>, Cédric Pastoret<sup>1,2</sup>, Gersende Caron<sup>1,2</sup>, Céline Monvoisin<sup>1</sup>, Karin Tarte<sup>1,3</sup>, Thierry Fest<sup>1,2</sup> & Céline Delaloy<sup>1</sup>

Plasma cell differentiation is a tightly regulated process that requires appropriate T cell helps to reach the induction threshold. To further understand mechanisms by which T cell inputs regulate B cell fate decision, we investigate the minimal IL-2 stimulation for triggering human plasma cell differentiation *in vitro*. Here we show that the timed repression of BACH2 through IL-2-mediated ERK/ELK1 signalling pathway directs plasma cell lineage commitment. Enforced BACH2 repression in activated B cells unlocks the plasma cell transcriptional program and induces their differentiation into immunoglobulin M-secreting cells. RNA-seq and ChIP-seq results further identify BACH2 target genes involved in this process. An active regulatory region within the *BACH2* super-enhancer, under ELK1 control and differentially regulated upon B-cell activation and cellular divisions, helps integrate IL-2 signal. Our study thus provides insights into the temporal regulation of BACH2 and its targets for controlling the differentiation of human naive B cells.

<sup>1</sup>UMR U1236, Université de Rennes 1, INSERM, Etablissement Français du Sang (EFS) de Bretagne, Equipe labellisée Ligue contre le Cancer, Labex IGO, 2 Av du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. <sup>2</sup>Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France. <sup>3</sup>Laboratoire d'Immunologie, Thérapie Cellulaire et Hématopoïèse (ITeCH), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France. Nicolas Hipp and Hannah Symington contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.F. (email: [thierry.fest@univ-rennes1.fr](mailto:thierry.fest@univ-rennes1.fr)) or to C.D. (email: [celine.delaloy@univ-rennes1.fr](mailto:celine.delaloy@univ-rennes1.fr))

**A** well-characterised gene regulatory network governs the transition of a naive B cell precursor to either a plasma cell or a memory B cell within secondary lymphoid organs<sup>1,2</sup>. Following antigen-priming B cells enter into long-lasting interactions with antigen-specific CD4<sup>+</sup> helper T cells at the border of T and B zones<sup>3</sup>. These precursors of T follicular helper cells provide a plethora of signals, costimulatory molecules and cytokines, that can promote B-cell survival, proliferation, and B cell commitment into plasma cells, germinal centre (GC) cells or memory B cells<sup>4</sup>. Temporal dynamic of cell signalling pathways regulating the transcription factor network and influencing B cell fate decision still remains to be investigated. It is suggested that transcriptional repression dominates the program leading to plasma cell differentiation<sup>5–7</sup>. Indeed, B cell transcription factors are collectively involved in repressing *PRDM1/BLIMP1* expression, the multitasking transcription factor in plasma cells<sup>8,9</sup>. The downregulation of *PAX5* early after B-cell activation occurs independent of *BLIMP1*, suggesting that *PAX5* could be the trigger of plasma cell differentiation<sup>10</sup>. *IRF4* and *IRF8* are proposed to antagonise each other for regulating the initial bifurcation in activated B cell fate<sup>11</sup>. Alternatively, evidences showed that the level of *BACH2* instructs B cells to undergo differentiation into either plasma cells or memory cells<sup>6,12,13</sup>. *BACH2* binds to MARE motifs and cooperates with *BCL6* on *PRDM1* promoter<sup>14,15</sup>. However, additional targets of *BACH2* beyond *PRDM1* during the transition from activated B cells to plasma cells must be elucidated. Moreover, the precise mechanisms regulating *BACH2* expression in activated B cells remain unknown despite the description of a super-enhancer in the *BACH2* locus<sup>16,17</sup>.

Difficulties to study signal integration during B cell terminal differentiation originate from heterogeneous and asynchronous cellular responses to differentiation-inducing stimuli<sup>18–20</sup>. Indeed, antigen affinity and the various co-stimuli of the complex microenvironment that are integrated in a spatial and temporal dynamic manner affect the differentiation process in cascade. In this context, obtaining sufficient number of primary activated B cells, which are rare and transient *in vivo*, is problematic. Many aspects of human plasma cell differentiation are recapitulated in a primary culture system combining B-cell receptor (BCR) signal, Toll like receptor activation and T cell helps (CD40L and cytokines)<sup>21,22</sup>. Naive B cells undergo class-switch recombination (CSR) and give rise to plasma cells under these defined conditions. T cell-produced interleukin-2 (IL-2) is one early minimal input required for eliciting differentiation in this model system, independently from proliferation and survival effects<sup>21</sup>. The underlying mechanism involves the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signalling pathway. Accordingly, mice models have confirmed the critical role of interleukins and ERK signalling in the initiation of plasma cell differentiation<sup>23</sup>. ERK signalling pathway was shown to be involved in immune cell cycle progression and survival<sup>24</sup>, but its function in terminal differentiation is still controversial, as opposing effects of BCR-induced ERK activation for plasma cell differentiation have both been described *in vitro*<sup>25,26</sup>.

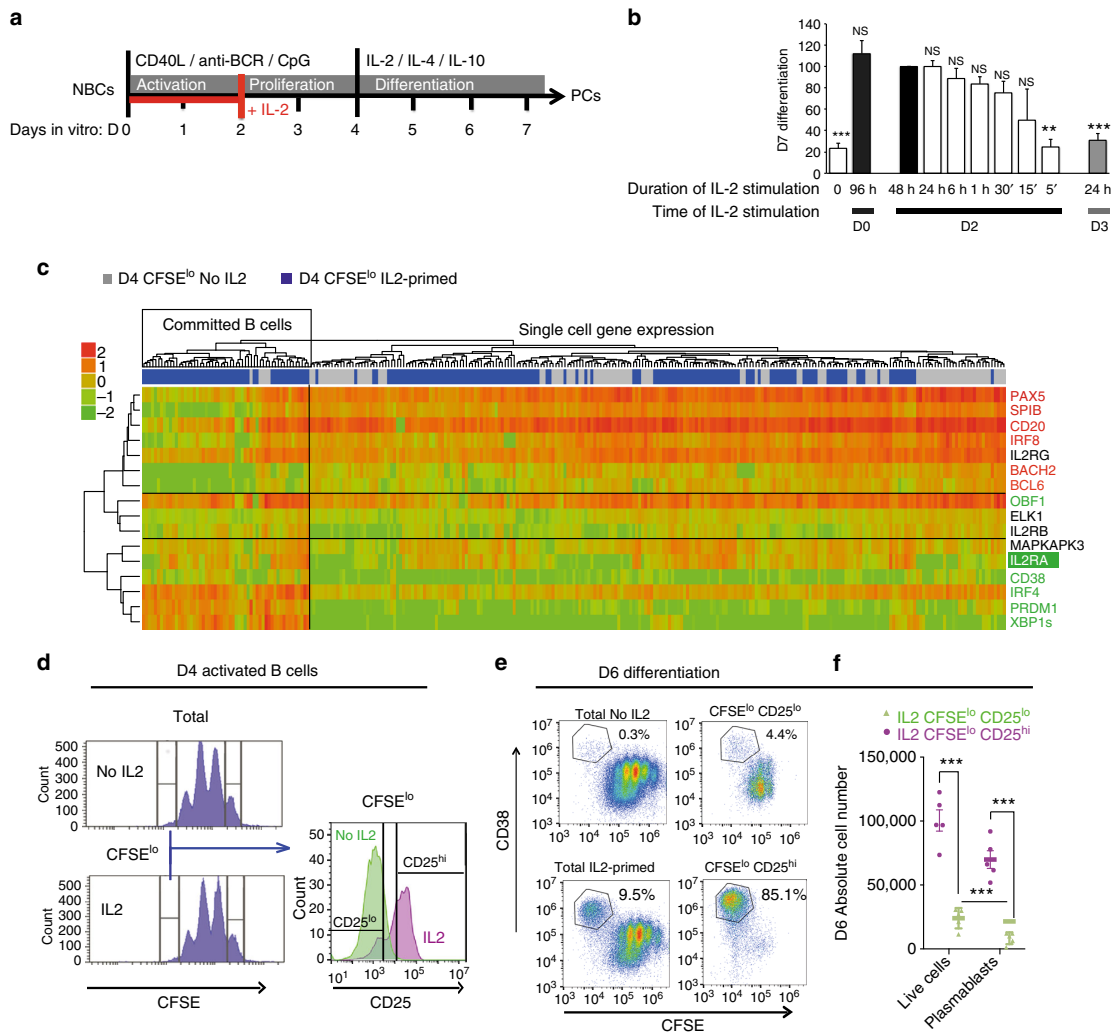
Here we study the function of IL-2-induced ERK signalling for plasma cell lineage commitment. We take advantage of a controlled and well-defined *in vitro* model of the human plasma cell differentiation<sup>21,22</sup> to catch the transient states of B-cell activation and to follow single-cell destiny. We establish that IL-2-ERK-ELK1 signalling pathway overcomes the repressive forces that block plasma cell differentiation. We identify *BACH2* and its target genes as major effectors of the IL-2-ERK-ELK1 signalling pathway for controlling B cell terminal differentiation. Our results suggest a molecular switch of ELK1 acting within the *BACH2* super-enhancer to fine-tune *BACH2* expression. In conclusion,

our data add to the understanding of *BACH2* temporal regulation and function in the process of human B-cell activation with important implications for plasma cell differentiation efficiency.

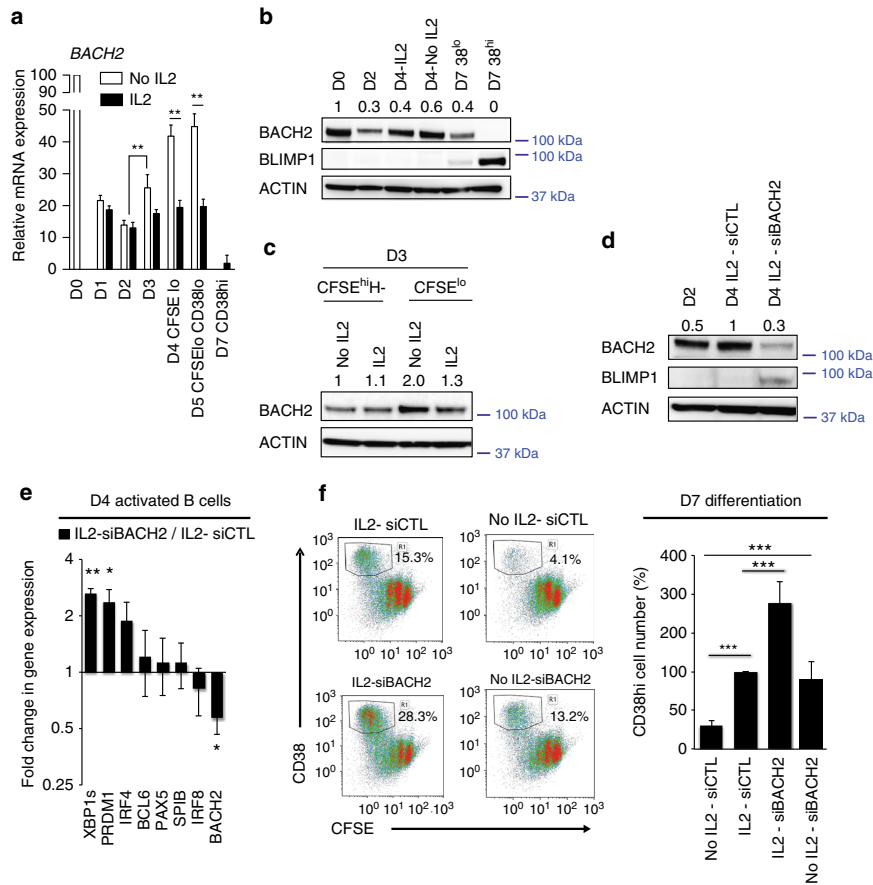
## Results

**Heterogeneity of B cell response to IL-2 stimulation.** Both, human peripheral blood CD19<sup>+</sup>CD27<sup>−</sup>CD10<sup>−</sup> (mainly naive B cells) and highly pure mature ABCB1 transporter-positive naive B cells selected based on their capacity to extrude the mitotracker green fluorescent dye<sup>27,28</sup>, were differentiated into plasmablasts (CD20<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup>) and plasma cells (CD138<sup>+</sup>) after 7 days of culture (Fig. 1a). This differentiation process combines B-cell activation initiated by BCR cross-linking, CpG synthetic oligonucleotides and CD40L, followed by a day-2 to day-4 (D2–D4) expansion of heterogeneous cell populations differing in their proliferative and differentiation capacities. At D4, cell division tracking using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) distinguished CFSE<sup>hi</sup> from CFSE<sup>lo</sup> activated B cell populations. The later population has previously been shown to differentiate into plasma cells when primed with IL-2 or IL-15, in the first 48 h of culture<sup>21</sup>. To address the ability of antigen-primed B cells to respond to transient IL-2 signal, we performed kinetic experiments. By D3 most of the cells were unresponsive to IL-2 while a short IL-2 stimulation at D2 conferred plasma cell differentiation ability to their progeny (Fig. 1b). However, among D4 CFSE<sup>lo</sup> cells, only a subset gained the capacity to differentiate into plasma cells. Thus, to escape the averaging caused by B cell heterogeneity we implemented single-cell QRT-PCR to compare the D4 CFSE<sup>lo</sup> cells that were primed with IL-2 with the non-primed ones. Unsupervised clustering analysis defined a minor subset of cells (30%) among the IL-2 primed cells characterised by the significant downregulation of B cell identity factors including *CD20*, *BACH2*, *BCL6*, *SPIB*, *IRF8* and *PAX5*,  $p < 10^{-4}$  (ANOVA) and the upregulation of plasma cell factors *PRDM1* and *XBPIs*,  $p < 10^{-3}$  (Fig. 1c, Supplementary Fig. 1). These committed cells had efficiently integrated IL-2-mediated STAT5 activation as demonstrated by the upregulation of the STAT5 target *IL2RA*,  $p < 0.005$  (ANOVA). In agreement with the role of IL-2 in triggering ERK signalling that mediates plasma cell fate commitment<sup>21</sup>, the specific ERK-associated *MAPKAPK3* was upregulated in these cells,  $p < 10^{-4}$  (ANOVA). To link this signature with the ability of the cells to differentiate, the cell surface CD25 protein (*IL2RA*) was used to discriminate the committed cells at D4 within the CFSE<sup>lo</sup> subset cultured in presence of IL-2 (Fig. 1d). CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells and the CD25<sup>lo</sup> counterpart were sorted and put back in culture for an additional 48 h prior differentiation monitoring by flow cytometry (Fig. 1e). On average, 76%  $\pm$  5% ( $n = 5$ ) of the CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells underwent differentiation whereas less than 10% of plasmablasts (9.8%  $\pm$  4%) emerged from the CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>lo</sup>. Importantly, this was not due to differences in survival as shown by the absolute number of plasmablasts generated in each condition (Fig. 1f). Thus the heterogeneity in B cell responses results from differences in early IL-2 signal integration.

**BACH2 silencing mimics IL-2-triggered differentiation.** We previously showed that IL-2-induced ERK signalling leads primarily to a downregulation of *BACH2*<sup>21</sup>. We thus monitored its expression in two culture conditions, with or without IL-2 added at D0 (Fig. 2a). Relative gene expression analysis showed a marked decrease of *BACH2* independently of IL-2 stimulation within the first 48 h of culture. Its expression increased significantly at D3 and in the D4 and D5 proliferative subsets in the absence of IL-2,  $p < 0.01$  (Mann–Whitney test). In contrast IL-2 stimulation repressed *BACH2* expression between D2 and D4. This temporal regulation of *BACH2* was confirmed at the



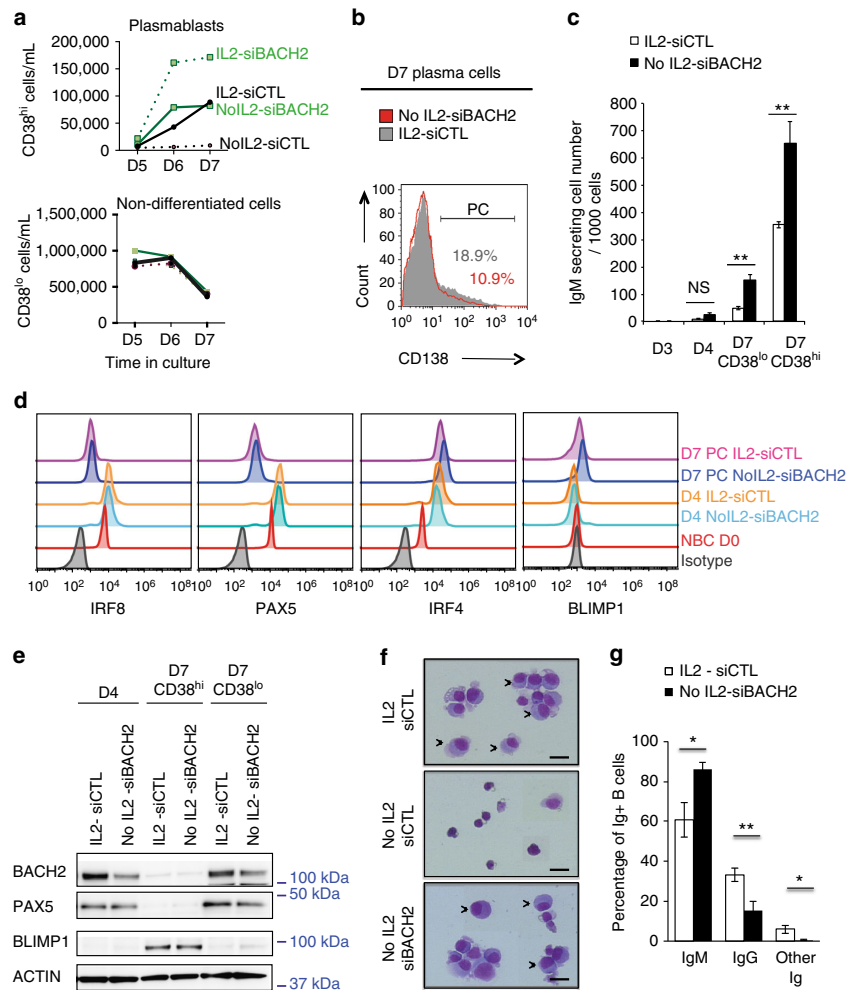
**Fig. 1** A minimal early and transient IL-2 signal confers plasma cell differentiation ability to human naive B cells. **a** Experimental design to differentiate primary naive B cells (NBCs) into plasma cells (PCs). Activation of peripheral blood mature naive B cells was initiated by BCR cross-linking (anti-BCR), CpG and CD40L during 4 days followed by cell washing and induction of terminal differentiation into plasma cells with IL-2, IL-4 and IL-10 over 3 days. Antigen-primed naive B cells have 2-day window (in red) for acquisition of early T cell help in the form of IL-2 which is required to recruit B cells into the plasma cell differentiation program. **b** Kinetic experiments of IL-2 stimulation to determine the time window (in day, D) and the minimal duration (in hours, h) for B cell to acquire differentiation ability. IL-2 was added in the medium at the indicated day. Neutralising antibodies against IL-2 or IL2 receptors were used to block IL-2 signalling and isotype antibodies were used as controls. Results are the mean of plasma cell numbers with the s.d. quantified at D7 by flow cytometry and fixed to 100 for the condition corresponding to 48 h of IL-2 stimulation (black bar) to normalise between experiments ( $n = 5$ ). **c** Single-cell QRT-PCR analysis in the D4-CFSE<sup>lo</sup> subset of cells that were primed with IL-2 (in blue,  $n = 175$ ) or not (in grey,  $n = 110$ ) at D2. The heatmap shows the spectrum of normalised Ct values with a global Z-score: red indicates high level of expression and green indicates low level of expression. Non-hierarchical clustering corresponding to 16 selected genes is shown. Two clusters of cells can be identified with on the left the nascent fraction of plasma cell progenitors showing induced plasma cell transcription factors expression in green linked to an IL-2 signature (IL2RA expression), concomitant with B cell factors repression in red. **d** Heterogeneity of CD25 (IL2RA) expression analysed by flow cytometry in the D4-CFSE<sup>lo</sup> subset of cells. Cell division visualised by CFSE dilution at D4 is similar in IL-2 treated and non-treated cells (IL2 and No IL2, respectively). Among CFSE<sup>lo</sup> cells, CD25 was upregulated in a subset of cells that were cultured in presence of IL-2 (CD25<sup>hi</sup>). **e** IL-2-primed cells, sorted at D4 based on CFSE dilution and CD25 expression from gates in **d**, were put back in culture to assess differentiation into plasma cells (CFSE<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup>) monitored by flow cytometry at D6, in comparison with their non-sorted counterpart (Total IL2-primed) and the control cells cultured without IL-2 (Total No IL2). One experiment representative of 5 is shown. **f** Absolute numbers of DAPI negative cells (Live cells) and CFSE<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup> plasmablasts generated from 10<sup>5</sup> CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>lo</sup> cells (in green) or CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells (in purple) sorted at D4 from gates in **d**, and put back in culture for 2 more days (mean  $\pm$  s.e.m,  $n = 5$ ). For experiments shown in **b** and **f**, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , NS: No significant differences, two-tailed unpaired Student's *t*-test



**Fig. 2** Transient inhibition of *BACH2* expression induces plasma cell differentiation. **a** Time course analysis (D0–D7) of *BACH2* expression quantified by QRT-PCR and normalised to *HPRT1* during naive B cells differentiation in proliferative subsets (sorted  $CFSE^{lo}$  cells) and differentiated plasma cells ( $CD38^{hi}$ ). Naive B cells were stimulated with IL-2 during the activation phase (black bars) or not (No IL2, white bars). Expression in naive B cells (D0) was fixed to 100 and the experiments repeated on 6 different B cell donors. **b** Representative western blot for *BACH2* and *BLIMP1* protein levels at the indicated days of naive B cells culture.  $\beta$ -ACTIN was used as loading control. Values are the average fold changes in the expression levels of *BACH2* normalised to  $\beta$ -ACTIN for three independent experiments. **c** *BACH2* protein levels in different subsets of D3-naive B cells stimulated or not with IL-2 for 24 h. Cells were sorted according to CFSE dilution and Hoechst (H) staining.  $CFSE^{hi}H^{-}$  corresponds to the non-proliferative subset.  $\beta$ -ACTIN served as loading control. This analysis was repeated two times. Values are the average fold changes in the expression levels of *BACH2* normalised to  $\beta$ -ACTIN levels. **d** Protein expression levels of *BACH2* and *BLIMP1* analysed by immunoblotting,  $\beta$ -ACTIN was used as loading control. The efficiency of *BACH2* inhibition with siRNA (siBACH2) was monitored at D4, 48 h after cell electroporation. Non-targeting siRNA (siCTL) was used as control. Values are the average fold changes in the expression levels of *BACH2* normalised to  $\beta$ -ACTIN levels for four independent experiments. **e** Fold change in gene expression levels analysed by QRT-PCR in D4-IL-2-primed cells that were electroporated on D2 with siBACH2. Expression levels of three independent experiments were normalised to expression levels in the control cells (IL2-siCTL). **f** Flow cytometry analysis of  $CD38^{hi}CFSE^{lo}$  plasmablasts generated at D7 following IL-2 priming (IL2) or in absence of IL-2 priming (No IL2) and electroporated with siBACH2 or siCTL at D2. The absolute numbers of plasmablasts were quantified by flow cytometry for seven independent experiments. Results were normalised to the IL2-siCTL condition arbitrary fixed to 100 for all the experiments. Values in **a**, **e**, **f** are shown as means  $\pm$  s.e.m., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , NS: No significant differences, Mann-Whitney test was used for **a** and **f**, two-tailed unpaired Student's *t*-test for **e**.

protein level (Fig. 2b, c) and raised the possibility that *BACH2* may control the engagement of B cells in the differentiation path. To test this hypothesis, we used small interfering RNAs (siBACH2) to transiently inhibit *BACH2* expression at D2 through to D4. Knockdown efficiency was controlled by immunoblotting 2 days after electroporation (Fig. 2d, Supplementary Fig. 2a). Consistent with the known regulation of *PRDM1* by *BACH2*, an unimpeded *BLIMP1* expression was observed in *BACH2* deficient cells. At the mRNA level the expression of the plasma cell-specific transcription factors *PRDM1* and *XBPIs* was

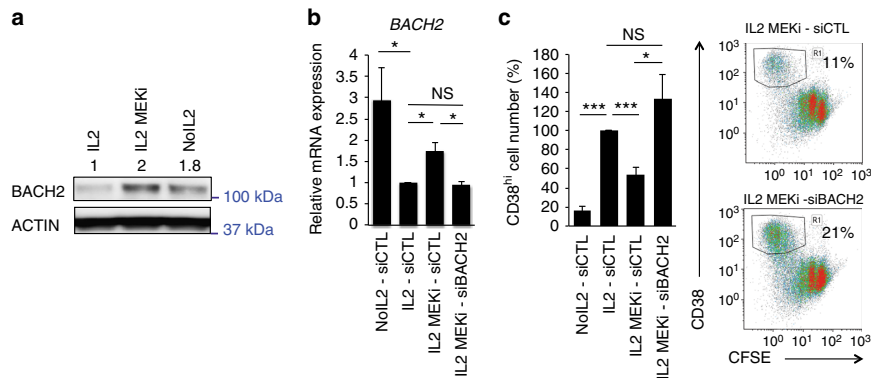
upregulated ( $p < 0.05$ , *t*-test) whereas the expression of the B cell-specific transcription factors *BCL6*, *PAX5*, *SPIB* and *IRF8* did not show any significant difference compared with the control IL-2-primed cells at D4, suggesting that *BACH2* targets primarily the plasma cell transcriptional program (Fig. 2e). We next explored plasma cell differentiation by flow cytometry at D7 (Fig. 2f). *BACH2* inhibition significantly increased the capacity of IL-2-primed cells to differentiate ( $p < 0.005$ , Mann-Whitney test). More importantly, *BACH2* inhibition was sufficient to drive differentiation in the absence of IL-2.



**Fig. 3** Differentiated B cells driven by siBACH2 exhibit a plasma cell identity. **a** Differentiation kinetics from D5 to D7 analysed by flow cytometry by the quantification of absolute cell number of plasmablasts CD38<sup>hi</sup> (upper panel) and CD38<sup>lo</sup> (lower panel) generated from naive B cells that were electroporated with siBACH2 (green lines) or siCTL (black lines), primed or not with IL-2 (solid and dashed lines, respectively). A representative experiment from three independent experiments is shown. **b** Expression of the plasma cell marker CD138 analysed by flow cytometry at D7 within the differentiated CD38<sup>hi</sup> compartment that were IL-2 primed (IL2-siCTL) or generated with BACH2 inhibition (No IL2-siBACH2). A representative experiment from four independent experiments is shown. **c** IgM secretion measured by ELISPOT at the indicated days and in sorted populations based on CD38 expression level at D7. A representative experiments from two independent experiments is shown. **d** Flowplots of B cell factors (IRF8, PAX5) and plasma cell transcription factors (IRF4, BLIMP1) expression by naive B cells (D0), D4-activated B cells and D7 sorted plasmablasts (PC, based on CD38<sup>hi</sup> expression). Cells were primed with IL-2 when specified and electroporated at D2 with siBACH2 or the control siRNA. Corresponding isotypes were used as negative staining control. **e** Western blot analysis of BACH2, PAX5 and BLIMP1 expression by D4 and D7 sorted plasmablasts (CD38<sup>hi</sup>) and non-differentiated cells (CD38<sup>lo</sup>) that were primed or not with IL-2 and electroporated at D2 with siBACH2 or the control siRNA. **f** Cytospin and Giemsa staining of plasmablasts generated from BACH2 deficient naive B cells (No IL2-siBACH2) compared to controls. Representative cells are shown ( $\times 630$  objective, scale bar 20  $\mu$ m). They displayed features of plasmablasts (arrows), the nucleus is eccentric comparable to plasmablasts generated from naive B cells primed with IL-2 (IL2-siCTL). **g** Assessment of immunoglobulin class switching in CD38<sup>hi</sup> cells at D7 generated from naive B cells deficient from BACH2 (No IL2-siBACH2) or cells that were primed with IL-2 (IL2-siCTL). Data are presented as percentage of positive cells for intracellular staining of IgM and IgG evaluated by flow cytometry. Means  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. Significant differences are shown. For experiments shown in **c** and **g** \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , NS: non-significant differences, two-tailed unpaired Student's *t*-test

We then studied the kinetic of the differentiation. Only few plasmablasts emerged from the No IL2-siBACH2 condition at D5 (Fig. 3a). The maximum rate was obtained at D6 and maintained at D7. At that time plasma cell stage was reached for a small percentage of cells indicated by CD138 expression ( $9\% \pm 1.2$ ;  $n = 5$ , Fig. 3b). Time course of immunoglobulin M (IgM) secretion

(Fig. 3c), and of B cell and plasma cell transcription factors expression confirmed the kinetic of the differentiation (Fig. 3d, e). In coherence with the differentiation process triggered by IL-2 priming, differentiated cells induced by siBACH2 displayed low levels of PAX5 and IRF8 expression and high levels of BLIMP1 and IRF4 as compared to naive B cells. Moreover, differentiated



**Fig. 4** BACH2 mediates the effect of IL-2/ERK signalling on plasma cell differentiation. **a** BACH2 protein levels in D4-activated B cells primed in the absence (No IL2) or in the presence of IL-2 (IL2) and MEK inhibitor (MEKi) added on D2.  $\beta$ -ACTIN was used as loading control. Values are the average fold changes in the expression levels of BACH2 for three experiments. **b** Gene expression levels of BACH2 in D4-activated naive B cells that were electroporated on D2 with siRNA and stimulated with or without IL-2 (IL2, No IL2, respectively) and treated with MEKi. Expression levels analysed by QRT-PCR were normalised to expression level in the IL-2 primed control cells from three independent experiments. **c** Plasma cell differentiation was monitored by flow cytometry at D7. CD38<sup>hi</sup>CFSE<sup>lo</sup> cells were quantified for three independent experiments. Results were normalised to the IL2- siCTL condition arbitrary fixed to 100 for all the experiments. Values shown in **b** and **c** are means  $\pm$  s.e.m., \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , NS: No significant differences, two-tailed unpaired Student's *t*-test

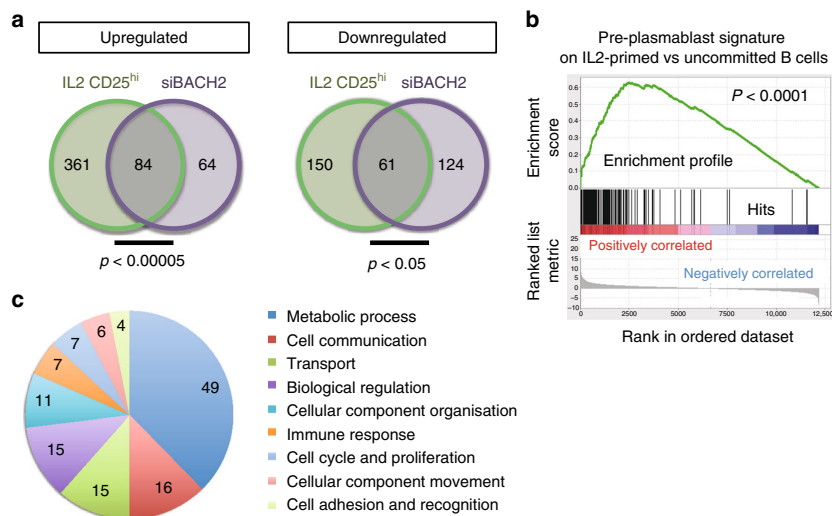
cells induced by siBACH2 displayed morphological features of plasmablasts studied by Giemsa staining (Fig. 3f), but were mainly IgM (Fig. 3g). To demonstrate that BACH2 inhibition did not affect the proliferation capacity of activated B cells in vitro, we performed ModFit analysis on CFSE-stained B cells (Supplementary Fig. 2b). Together with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and active caspase 3 labelling experiments we showed that BACH2 deficiency did not affect activated B cell expansion, survival, or proliferation (Supplementary Fig. 2c). Altogether these results suggest that the mechanism triggering plasma cell differentiation in BACH2-deficient B cells was independent of a proliferation or precocious differentiation effect. Furthermore, differentiation remained dependent of the differentiation stimuli anti-BCR, CpG and CD40L (Supplementary Fig. 2d). Finally to show the specificity of the BACH2 effect, we inhibited the expression of other crucial B cell identity factors including PAX5 and IRF8 identified previously downregulated by IL-2-mediated ERK activation<sup>21</sup>. Their transient repression did not confer plasma cell differentiation ability to activated B cells (Supplementary Fig. 2e). Taken altogether our data confirm the key role played by BACH2 in blocking the plasma cell differentiation program.

**BACH2 is a key effector of IL-2/ERK signalling.** We then wanted to determine whether BACH2 mediates the effect of IL-2/ERK signalling on plasma cell differentiation. To this end, we used MEK inhibitor (MEKi) to temporally and partially inhibit ERK activity at D2 in IL-2-primed cells, at a concentration that did not interfere with cellular proliferation but inhibited their ability to differentiate many divisions later<sup>21</sup>. We first validated that BACH2 expression, repressed by IL-2, was restored by ERK inhibition at the protein level (Fig. 4a). Then, D2 cells were transfected with siBACH2, treated with MEKi and subsequently stimulated with IL-2. At D4, BACH2 expression levels were assessed. Partial inhibition of ERK signalling significantly restored BACH2 expression in IL-2-primed cells,  $p < 0.05$  (*t*-test) and siBACH2 reduced BACH2 expression to a level similar to that in IL-2-primed cells (Fig. 4b). Strikingly, the ability of MEKi-treated cells to differentiate into plasmablasts was significantly rescued with the siBACH2,  $p < 0.05$  (*t*-test, Fig. 4c). These findings

indicate that BACH2 is a key downstream target of IL-2 signalling.

**BACH2 controls IL-2-driven transcriptional programs.** To characterize the transcriptional program involved in the commitment towards plasma cell, we compared the RNA-seq gene expression profiles of D4 IL-2-primed cells (the CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells, Fig. 1d) to the D4 CFSE<sup>lo</sup> siBACH2 cells. As control we took the D4 CFSE<sup>lo</sup> cells obtained in absence of IL-2. We established a list of 656 genes that were differentially expressed between the IL-2-committed cells and controls (445 genes upregulated and 211 genes downregulated, FC > 1.4 and Benjamini-Hochberg adjusted *p*-value (p.adj) < 0.05, Wald test), and a list of 333 genes that were differentially expressed between siBACH2-committed cells and controls (148 genes upregulated and 185 genes downregulated, FC > 1.4 and p.adj < 0.05, Wald test). Both lists were then compared and genes in common represented in the Venn diagrams (Fig. 5a, Supplementary Fig. 3 and Supplementary Data 1). We observed significant overlaps between IL-2 and BACH2 signatures confirming the major contribution of BACH2 in IL-2-triggered plasma cell fate commitment ( $p < 5.10^{-5}$  for upregulated genes and  $p < 0.05$  for downregulated genes, hypergeometric distribution). The IL-2 signature was highly enriched in transcripts induced in pre-plasmablasts<sup>29</sup> demonstrating that IL-2 signalling confers broad changes in gene expression associated with plasma cell differentiation (Fig. 5b). Interestingly, the strongest siBACH2 effect in committed cells was the upregulation of metabolic genes followed by genes devoted to cellular processes such as cell communication, transport, cell cycle and proliferation, cellular component organisation and immune response (Fig. 5c).

**Identification of BACH2 target genes.** To infer the direct targets of BACH2, we mapped genome-wide BACH2 binding sites using ChIP-seq. To this end, we used activated B cells after 3 days of culture without IL-2; at that time BACH2 expression was increased (Fig. 2a, c). We took siBACH2-cells as control. After normalisation, 7883 regulatory regions were obtained compared with 1439 for the control-siBACH2 (Fig. 6a). We observed extensive binding at intergenic and intronic regions



**Fig. 5** siBACH2-committed cells share an extensive transcriptional program with IL-2 primed cells. **a** Expression profiles of committed cells through IL-2 priming (IL2 CD25<sup>hi</sup>, sorted at D4 based on CFSE<sup>lo</sup> and CD25<sup>hi</sup> expression, in green) or through BACH2 transient inhibition (siBACH2 CFSE<sup>lo</sup> cells sorted at D4, in purple). They were determined by RNA sequencing ( $n = 3$  per condition) and compared to uncommitted cells (CFSE<sup>lo</sup> cells that were cultured in absence of IL-2). A list of 445 and 211 genes that were, respectively, upregulated or downregulated after IL-2 priming were compared with the 148 and 185 genes that were, respectively, over- or under-expressed in siBACH2 compared with control cells (with a FC > 1.4 and  $p_{\text{adj}} < 0.05$ , Wald test) to generate Venn diagrams. The numbers of genes that are in common in both lists are indicated at the intersection between two circles. Hypergeometric distribution was used to calculate the  $p$ -value according to GSEA. **b** Gene set enrichment plot for genes highly expressed in preplasmablasts in the comparison between D4 IL-2-committed B cells and uncommitted B cells. **c** Functional analysis of upregulated genes in the BACH2 signature with the PANTHER classification system. The numbers of genes in each functional category are shown

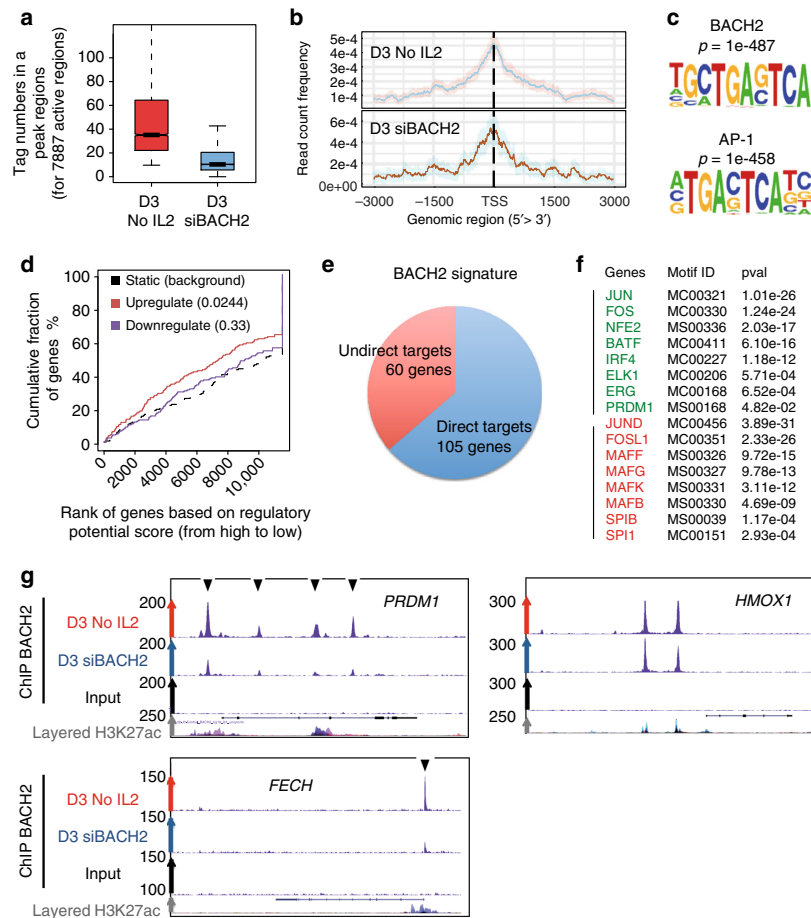
(Supplementary Fig. 4), while 20% of regulatory regions were located in gene promoters and enriched at transcription start sites (TSS, Fig. 6b). Motif enrichment analysis identified BACH2 consensus motif that embeds AP-1 binding sites (Fig. 6c). We then performed BETA analysis to integrate BACH2 bindings with differentially expressed genes identified above in the BACH2 repression condition. A repressive function for BACH2 was predicted,  $p < 0.05$  (Kolmogorov–Smirnov test, Fig. 6d). Hereafter we focused our analysis on the 165 upregulated genes in the siBACH2 condition (FC > 1,  $p_{\text{adj}} < 0.05$ , Wald test), 105 genes were predicted to be direct targets of BACH2 (Fig. 6e, Supplementary Data 2). Motif analysis of these genes demonstrated enrichment of binding sites for both B and plasma cell transcription factors (Fig. 6f). ChIP-seq data confirmed BACH2 binding to *PRDM1* locus and inferred new targets linked to the commitment. Of particular interest was the ferrochelatase gene *FECH* required for haeme synthesis (Fig. 6g). Haeme homeostasis plays a key role in plasma cell fate determination and CSR and high concentration of haeme inhibits BACH2 function<sup>30</sup>. Interestingly in T cells BACH2 was found to bind the haeme oxygenase gene *HMOX1* that in contrast to *FECH* is involved in haeme degradation<sup>31</sup>. Here we confirmed the binding of BACH2 in *HMOX1*; however, the binding was not affected in the siBACH2-cells, in line with our transcriptomic data showing no induction of *HMOX1* transcripts in the siBACH2 condition (Fig. 6g). Thus, *FECH* upregulation may be involved in haeme accumulation inhibiting BACH2 function in siBACH2 cells, a regulatory loop that may explain why a small difference in BACH2 expression level may tilt the balance in favour of plasma cell differentiation.

Three members of the dual-specific phosphatases (DUSP) family were identified as targets of BACH2 and found upregulated in the committed signature: *DUSP4*, *DUSP5* and

*DUSP16* suggesting that the ERK pathway was ultimately under the control of inhibitory molecules in both commitment conditions. Indeed, *Dusp5* is required for murine plasma cell differentiation, inhibiting BCR-mediated ERK activation<sup>25</sup>.

Four transcription factors commonly upregulated in committed cells were bound by BACH2: *ID2*, *TOX2*, *PIR* and *ATF5*. *ATF5* has a well-established pro-survival activity, regulating *MCL1* expression which is essential for GC formation<sup>32</sup>. Members of the *BCL2* family were also part of the BACH2 signature: the anti-apoptotic *BCL2L1* (*BCCL1*) previously described upregulated in GC B cells<sup>32</sup>, and the pro-apoptotic member *BCL2L15* whose expression was downregulated, revealing BACH2 contribution to a balance of the apoptotic signalling pathway. Other genes critical for GC homeostasis were part of the BACH2 program such as *S1PR2* involved in GC B cell clustering and survival<sup>33</sup>.

**ELK1 controls BACH2 expression.** To understand the mechanism by which IL-2 regulates *BACH2* expression, we searched for factors regulated by the ERK pathway and whose inhibition restores *BACH2* expression. Yasuda et al.<sup>23</sup> provided evidences in mouse models for the control of Blimp1 expression by ERK/ELK1 signalling pathway. To test whether ELK1 is involved in IL-2-triggered plasma cell differentiation, we first realized western blot analysis that demonstrated phosphorylation of ELK1 by IL-2 stimulation, in an ERK-dependent manner (Fig. 7a). Next, we implemented siRNA experiments against *ELK1* at D1 to inhibit its expression prior to IL-2 stimulation. Knockdown efficiency was verified 2 days after B-cell electro- poration at the transcript and protein levels (Fig. 7a, Supplementary Fig. 5a). We analysed the effect of *ELK1* deficiency in D3 CFSE<sup>lo</sup> cells. A known target of *ELK1*, *MYD88*<sup>34</sup> was used as control and found significantly repressed in *ELK1* deficient B



**Fig. 6** ChIP-seq integrated with transcriptomic data infers direct targets of BACH2. **a** Boxplots comparing peak size in 7887 active regions bound by BACH2 at D3 in activated naive B cells cultured in absence of IL-2 (No IL2). Reduced numbers of reads per regions were observed in siBACH2 condition compared to WT condition. Boxed area represents the centre 2 quartiles (notched-lines = median). Whiskers show the top and bottom quartiles without outliers. **b** Tag distribution (using bigWIG metrics) across transcription start sites (TSS). **c** Known motif enrichment in the ChIP-seq (D3 activated B cells, No IL2) using HOMER. The AP-1 consensus motif is embedded within the BACH2 motif. **d** BETA-plus analysis highlights activating/repressive function prediction of BACH2 in activating B cells. The red and blue lines represent the upregulated and downregulated genes, respectively. The dashed line indicates the non-differentially expressed genes as background;  $p$ -values represent the significance of the UP or DOWN group established by the Kolmogorov–Smirnov test. **e** Prediction of direct or indirect targets of BACH2. BETA-plus analysis was performed with BACH2 ChIP-seq data from D3 activated B cells and correlated with upregulated gene induced by siBACH2 in D4 CFSE<sup>lo</sup> cells ( $p_{adj} < 0.05$ , Wald test). BETA package predicts direct regulation of 105 genes by BACH2, and 60 indirect targets. **f** Motif analysis in upregulated gene regions using basic setting of BETA software. Specific enrichment for transcription factor promoting plasma cell differentiation (green), or repressing this process (red) is shown. **g** UCSC genome browser visualisation of ChIP-seq data generated at D3 in activated naive B cells. Arrows represent ChIP-seq peaks of BACH2 binding that is decreased in the siBACH2 condition. Enforced BACH2 repression affects BACH2 bindings in PRDM1 and FECH regulatory regions identified by H3K27Ac layer from ENCODE, but does not affect BACH2 binding in HMOX1

cells,  $p < 0.05$  ( $t$ -test, Fig. 7b). In contrast *BACH2* and *IRF8* expression levels were significantly increased recapitulating the effects observed with MEK1, suggesting that IL-2-mediated ELK1 phosphorylation can suppress the expression of *BACH2*. In accordance with this finding, we observed a marked reduction in plasmablast generation in the siELK1 condition at D7, independently from a proliferation effect reinforcing the ELK1/BACH2 axis (Fig. 7c, Supplementary Fig. 5b).

**ELK1 binds *BACH2* intron 1 within a region of open chromatin.** In silico motif search for transcription factor binding sites identified an ELK1 binding motif in the first intron of *BACH2* with an exact match with matrix consensus used by MatInspector

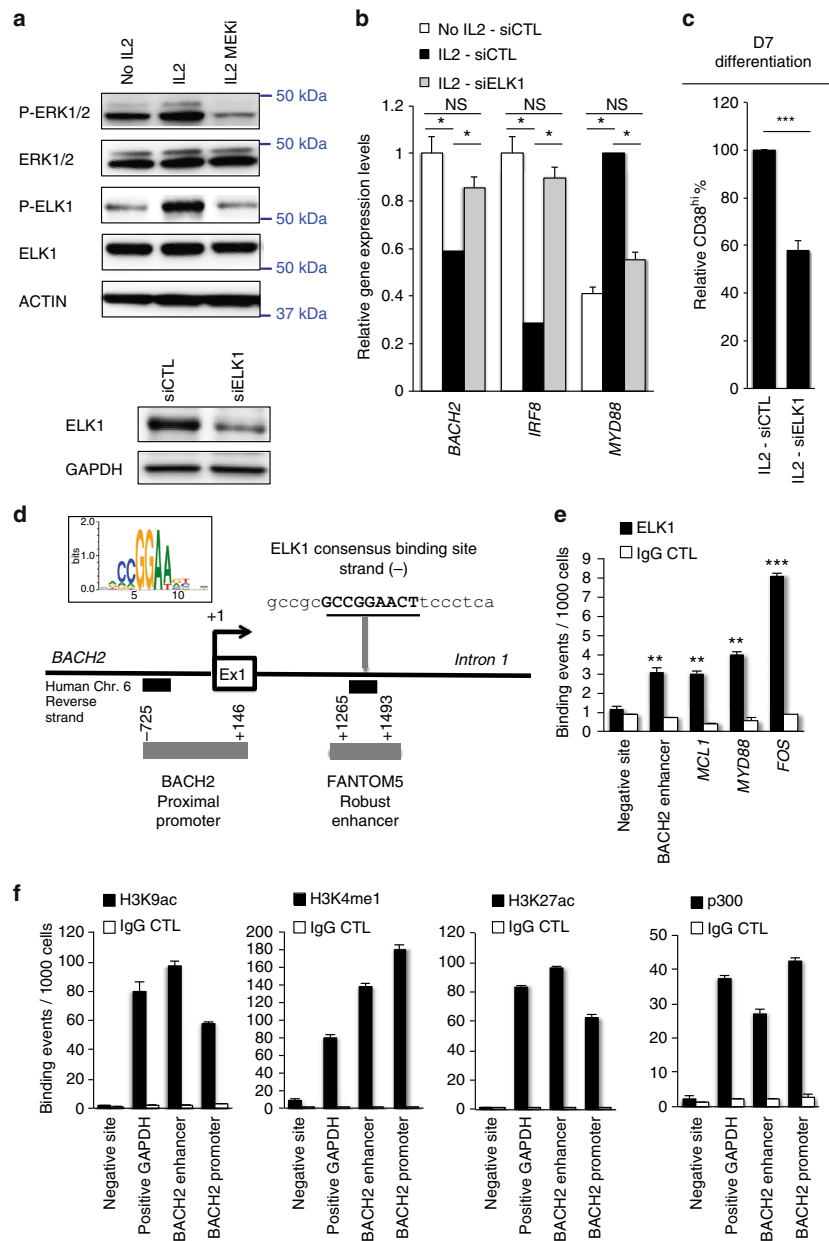
(Fig. 7d). This region is highly CpG rich and shows more than 70% local nucleotide sequence identity between mouse and human (Supplementary Fig. 6a). Moreover, the sequence surrounding ELK1 binding motif (hg19: 91004796–91006944) was predicted to be a robust enhancer by the FANTOM5 project<sup>35</sup>, located in a super-enhancer structure identified by H3K27ac loading<sup>16,17</sup> (Supplementary Fig. 6b). This region was thus hereafter called *BACH2* enhancer. We demonstrated an in vivo binding of ELK1 to this putative enhancer by chromatin immunoprecipitation followed by QPCR (ChIP-QPCR) in IL2-primed B cells collected at D3 (Fig. 7e). We also assessed binding of ELK1 to loci previously described in the literature including *MCL1*, *MYD88* and *FOS*<sup>34</sup> as controls. To examine whether ELK1



binding occurred within an open chromatin region, H3K9ac, H3K4m1, H3K27m1 and H3K27ac were studied by ChIP-QPCR. All these histone marks were present in the proximal promoter region of *BACH2* and in the enhancer (Fig. 7f). Moreover we examined p300 binding by ChIP-QPCR since it is a highly accurate means for identifying enhancers and their associated activities<sup>36</sup>. In line with an enhancer region, we observed marked enrichment of p300 binding at D3 (Fig. 7f). Interestingly, p300 time course analysis during naive B-cells activation mimicked, to some extent, *BACH2* mRNA variations (Supplementary Fig. 6c). We then wanted to know whether ELK1 DNA-binding was modulated by IL-2 stimulation. To this end we performed

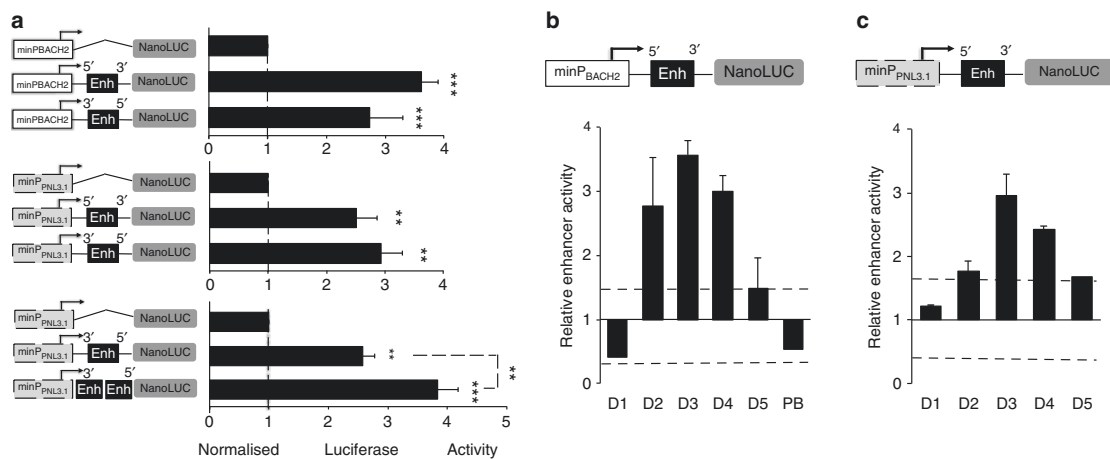
ChIP-QPCR analyses in D3 cells that were stimulated or not with IL-2 (Supplementary Fig. 6d). No significant differences were observed between these two conditions, in agreement with previous studies demonstrating that ELK1 can be bound in the absence of stimulus<sup>37–40</sup>. Thus we hypothesised that IL-2/ERK may modify the transcriptional activity of ELK1.

**Mapping of a functional *BACH2* enhancer in activated B cells.** We decided to detail the functional DNA regulatory sequence by luciferase reporter assay in the context of primary human naive B cell activation. The *BACH2* proximal promoter<sup>41</sup>



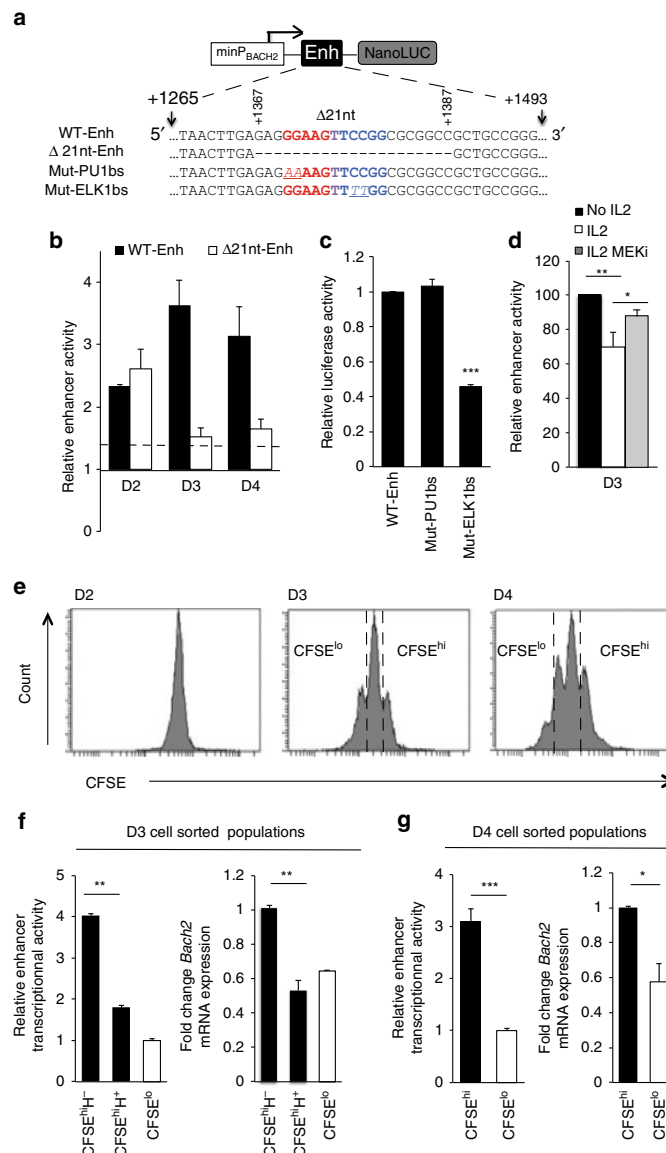
(minP<sub>BACH2</sub>, -725; +146) ligated upstream from the nano-luciferase coding sequence (NanoLuc) demonstrated a  $4.2 \pm 0.2$  ( $n = 15$ ) fold more transcriptional activity than the promoterless NanoLuc vector (pNL1.1), whatever the time point of B-cell electroporation (from D0 to D3). As minP<sub>BACH2</sub> did not respond substantially to the B-cell activation cocktail, it was used to test the transcriptional activity of ELK1. The enhancer region (+1265; +1493) was inserted in the native and reverse orientation downstream from the minP<sub>BACH2</sub>. The addition of this sequence resulted in a threefold to fourfold increase in luciferase activity measured at D3 (Fig. 8a, upper panel). A similar effect was observed when the *BACH2* intronic sequence was ligated downstream from an independent promoter (minP<sub>PNL3.1</sub>) (Fig. 8a,

middle panel). Finally, an additive effect on transcriptional activity was observed when 2 copies of the sequence were inserted in the plasmid (Fig. 8a, lower panel) conform to a functional enhancer sequence. We then studied the dynamic of its activity during naive B-cell activation and differentiation triggered by IL-2. For each time point analysed, the cells were electroporated 24 h before with the enhancer sequence in conjunction with minP<sub>BACH2</sub> (Fig. 8b) or with minP<sub>PNL3.1</sub> (Fig. 8c). No activity was observed at D1 or in sorted D6 plasmablasts. Time course analysis however revealed the dynamic activation of the enhancer starting from D2, up to D4, with a peak at D3. Interestingly the kinetic activity of the enhancer mimicked the upregulation of *BACH2* mRNA observed between D2 and D4, which was more

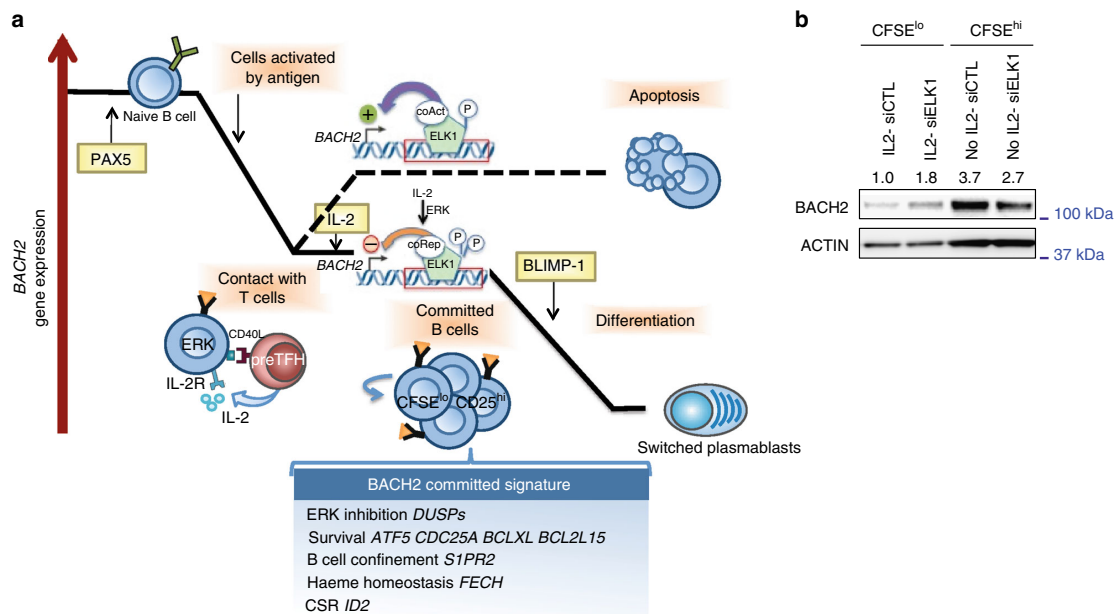


**Fig. 8** Enhancer activity of the 228 bp intronic sequence encompassing the ELK1 binding site. **a** Luciferase activity of primary activated naive B cells transfected with luciferase reporter plasmids for intron 1 enhancer (Enh) sequence (position +1265; +1493) ligated in either 5'-3' or 3'-5' orientations, made in conjunction with the proximal *BACH2* promoter (minP<sub>BACH2</sub>, position -725; +146) or with the independent pNL3.1 minimal promoter (minP<sub>PNL3.1</sub>). Luciferase activity measured at D3, 24 h after electroporation, is presented relative to the promoter activity alone fixed to 1 (line1). Data are representative of three independent experiments (means  $\pm$  s.e.m., \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.005$ , two-tailed unpaired Student's *t*-test). **b** Temporal dynamic of the enhancer activity across naive B cells activation and differentiation assessed from D1 to D6 in sorted plasmablasts (PB). Activated B cells were electroporated with the reporter constructs carrying the enhancer sequence in conjunction with the *BACH2* promoter **b** or an independent minimal promoter **c**. Luciferase activity was measured 24 h later. Enhancer activity is presented relative to promoter activity alone arbitrary fixed to 1. Data are means  $\pm$  s.e.m. from 6 (in **b**) and 3 (in **c**) independent experiments. Statistically significant cutoff values (dotted lines) were obtained by adding two standard deviations to the mean value obtained for the promoter activity

**Fig. 7** ELK1 is a mediator of IL-2 signalling and binds within *BACH2* super-enhancer. **a** Upper panel: MAP kinase activity analysed by phospho-specific immunoblotting in D2-activated B cells, starved and stimulated or not for 5 min with IL-2 and MEK inhibitor (MEKi) or DMSO; IL-2 signal triggers ERK and ELK1 phosphorylation (P-ERK1/2, P-ELK1) which is blocked with MEKi treatment.  $\beta$ -ACTIN was used as loading control. One representative of two experiments is shown. Lower panel: Protein expression levels of total ELK1 analysed by immunoblotting 2 days after siELK1 electroporation. GAPDH was used as loading control. **b** Effect of ELK1 inhibition on gene expression levels analysed by QRT-PCR in D3 B cells primed (IL2) or not (No IL2) with IL-2 for 24 h and electroporated at D1 with siELK1 or siCTL. *BACH2*, *IRF8* and *MYD88* expression levels in CFSE<sup>lo</sup>-cell sorted compartments were normalised to expression levels in IL-2 primed control-B cells. Means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. **c** Effect of siELK1 on the ability to differentiate into plasmablasts (CD38<sup>hi</sup>) in condition that favours plasma cell generation (IL-2 priming). Data from six independent experiments are presented relative to CD38<sup>hi</sup> cell number generated by IL-2-primed and siCTL-electroporated cells at D1 (fixed to 100%). Means  $\pm$  s.e.m. **d** Human *BACH2* locus including the position of the ELK1 consensus binding site (MATINSPECTOR prediction) in intron 1, within an enhancer region (FANTOM5 prediction) and the positions detected by QPCR for the ChIP assays within the proximal promoter and intron 1 identified by dark boxes. Numbers indicate positions relative to the TSS (+1). Ex1 means Exon 1. **e** ChIP assay of the in vivo binding of ELK1 in IL-2-primed D3 B cells. DNA immunoprecipitated by total ELK1 antibody or immunoglobulin G (IgG CTL) was amplified by real-time PCR using primers flanking the putative ELK1 binding site in *BACH2* intron 1 (predicted *BACH2* enhancer position), known ELK1 binding regions in *MCL1*, *MYD88* and *FOS* genes, and negative control primers as a reference (negative site). Means  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments. **f** ChIP analysis of histone modifications and p300 binding in IL-2-primed D3 B cells. Immunoprecipitated DNA was amplified by QPCR using primers in the *BACH2* proximal promoter (*BACH2* promoter) and predicted enhancer (*BACH2* enhancer). Silent locus (negative site) and *GAPDH* specific positive control primers were used. Data are representative of two experiments (average and standard deviation of binding events per 1000 cells) with IgG control ChIP values (IgG CTL) shown separately. For experiments shown in **b**, **c**, **e**, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.005$ , two-tailed unpaired Student's *t*-test



**Fig. 9** Role of the ELK1 binding motif in *BACH2* enhancer. **a** ELK1 binding motif (core motif in blue) partially overlaps PU.1 predicted binding motif (core motif in red) within the enhancer of *BACH2* intron 1. Positions refer to +1 transcription start site. Deletion of 21 nucleotides from the enhancer ( $\Delta 21$  nt-Enh) or point mutations in the core motifs of PU1 binding site (Mut-PU1bs) or ELK1 binding site (Mut-ELK1bs) are underlined. **b** Luciferase activity of activated naive B cells electroporated with the wild-type enhancer (WT-Enh) or the enhancer deleted of 21 nucleotides ( $\Delta 21$  nt-Enh), at different time points (D1, D2 and D3) and cultured for 24 h. Luciferase activity is presented relative to the cells electroporated with the *BACH2* promoter (minP<sub>BACH2</sub>) alone (activity fixed to 1 for the different time points). Statistically significant cutoff value (dotted line) was obtained by adding 2 standard deviations to the mean value obtained for the promoter activity alone. **c** Luciferase activity measured at D3, 24 h after electroporation of reporter construct that carries the wild-type enhancer sequence (WT-Enh) and the derivative plasmids with mutations in PU1 core motif (Mut-PU1bs) or ELK1 core motif (Mut-ELK1bs). Luciferase activity is presented relative to the activity of the WT-Enh. ( $n = 3$ , mean  $\pm$  s.e.m.,  $***p < 0.001$ , two-tailed unpaired Student's *t*-test). **d** Effect of IL-2 stimulation on the enhancer activity. Activated B cells were electroporated on D2 with the WT enhancer reporter construct and then stimulated (IL2) or not (No IL2) with IL-2 for 24 h in presence of MEK inhibitor (MEKi) or DMSO. Enhancer activity (fixed to 100 for the No IL2 condition) was determined relative to luciferase activity of the *BACH2* promoter alone. ( $n = 6$ , mean  $\pm$  s.e.m.,  $**p = 0.007$ , two-tailed unpaired Student's *t*-test). **e** Kinetic of CFSE profiles. **f** Enhancer activity measured by luciferase assay and *BACH2* gene expression level at D3 in **f** and D4 in **g**, in cell-sorted populations based on CFSE dilution from gates in **e** (CFSE<sup>hi/lo</sup>), and cell cycle: Hoechst positive (H<sup>+</sup>) vs. Hoechst negative (H<sup>-</sup>). Data are representative of three independent experiments (means  $\pm$  s.e.m.,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.005$ , two-tailed unpaired Student's *t*-test)



**Fig. 10** Proposed model of *BACH2* regulation during terminal B cell differentiation. **a** *BACH2* is highly expressed in naive B cells, under PAX5 control. Its expression decreases with antigen priming. In absence of T cell help, *BACH2* acts as a key lock in repressing the plasma cell transcriptional program. *BACH2* expression is under the control of the transcriptional activity of an enhancer mediated by ELK-1 in association with co-activator (coAct) complex. Contact with cognate helper T cells and signals that sustained ERK signalling instruct a dynamic switch in ELK1 transcriptional activity that may recruit a corepressor (coRep) complex responsible for *BACH2* downregulation and plasma cell fate commitment. The IL-2-primed activated B cells that have proliferated (CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup>) are committed for plasma cell differentiation. The differentiation program initiated by IL-2 revealed the major contribution of *BACH2* downregulation. RNA-seq and ChIP-seq revealed the broad program of molecular and cellular processes regulated by *BACH2* at this early time point of B cell fate commitment. **b** *BACH2* expression levels analysed by immunoblotting in subpopulations of D4-activated B cells sorted based on CFSE dilution. Naive B cells were primed or not with IL-2 and electroporated with siELK1 or a control siRNA (siCTL).  $\beta$ -ACTIN was used as loading control. Values are the average fold changes in the expression levels of *BACH2* normalised to  $\beta$ -ACTIN levels for three independent experiments

pronounced in the absence of IL-2 (Fig. 2a). These results suggested that this functional sequence might control *BACH2* expression during the critical IL-2-mediated molecular switch responsible for early B cell engagement towards plasma cell differentiation.

**ELK1 and cell division regulate *BACH2* enhancer activity.** We then tested the contribution of the ELK1 motif to the temporal activation of the enhancer. First we made serial deletions from the enhancer and measured the transcriptional activities at D3. Deletion of the ELK1 binding motif (positions +1367 to +1387, Supplementary Fig. 7) resulted in diminished luciferase activity almost equal to that of the minP<sub>*BACH2*</sub>, in line with a positive role of ELK1 motif. Then, reporter constructs carrying the full-length enhancer (referred as WT-Enh) or the enhancer sequence deleted of 21 nucleotide (nt) corresponding to the ELK1 motif (referred as  $\Delta$ 21nt-Enh) (Fig. 9a) were transfected in activated B cells at different time points of the culture and luciferase activities were measured 24 h later (Fig. 9b). We confirmed the positive role of the 21 nt sequence at D3 and D4 as its deletion resulted in diminished activity almost equal to that of the minP<sub>*BACH2*</sub>. In contrast, analysis performed in D2-activated B cells showed lower enhancer activity compared to that performed at later time points, and the 21 nt deletion did not demonstrate any substantial effect on the luciferase activity (Fig. 9b). These data indicated that different regulatory elements contributed to the enhancer function at different time point of the activation process.

In addition to the predicted binding motif for ELK1 in the 21 nt sequence, we identified a putative motif for PU.1 in the opposite strand of DNA, partially overlapping the ELK1 motif (Fig. 9a). To demonstrate the direct binding of ELK1 to its putative binding site and to exclude the possibility that PU.1 was responsible for the enhancer activity at D3, we performed point mutations in one of the two motifs. Inactive PU.1 motif (Mut-PU1bs) did not affect luciferase activity while inactive ELK1 motif (Mut-ELK1bs) led to a marked decrease of luciferase activity (Fig. 9c). Thus ELK1 binding contributed to enhancer function.

Next we investigated the responsiveness of the enhancer to IL-2 signal at D3. In line with IL-2-induced *BACH2* repression, we were able to show that IL-2 counteracts the enhancer activity although these experiments were done in heterogeneous cell populations (Fig. 9d). By partially inhibiting the ERK signal in the presence of IL-2 we observed a significant rescue of enhancer activity ( $p < 0.05$ , *t*-test) suggesting that sustained ERK activity may be responsible for maintaining or switching ELK1 under its repressive form, although the possible involvement of other regulatory elements cannot formally be excluded. Thus we proposed that IL-2 stimulation is involved in the ELK1 switch from an activating to a repressive form following ERK activation above a threshold. A similar mechanism was described upon mitogenic stimulation by Yang et al.<sup>42</sup>

ERK activity has been linked to B cell proliferation and some evidence suggests that B cells would integrate T cell derived signals, in addition to BCR signals, in a cell cycle-dependent

manner<sup>43</sup>. Furthermore cell proliferation affects *BACH2* expression<sup>22</sup>. Thus, to explore whether proliferation can modulate *BACH2* expression and the enhancer activity, we profiled *BACH2* expression and enhancer activity at D3 and D4 in sorted populations based on CFSE dilution (Fig. 9e) and cell cycle (Hoechst staining). A marked difference in enhancer activity was observed in CFSE<sup>lo</sup> compared to CFSE<sup>hi</sup> cells at both time points (Fig. 9f, g). In line with enhancer contribution to *BACH2* expression, *BACH2* levels mimicked enhancer activities with higher enhancer activity and *BACH2* expression level being observed in CFSE<sup>hi</sup> Hoechst-negative (G0/G1 phases) cells compared to Hoechst-positive (S and G2/M phases) cells (Fig. 9f). Collectively, these results characterize a *BACH2* enhancer under ELK1 control that may contribute to maintain *BACH2* expression, and when ERK activity becomes sustained with IL-2 stimulation and/or cell divisions, it may switch from an active to an inactive/repressive form, underlying the decline of *BACH2* expression and plasma cell commitment (Fig. 10a). Supporting this model, ELK1 contributed to the upregulation of *BACH2* expression in the non-proliferative subset isolated at D4. In contrast, ELK1 repressed *BACH2* expression in the CFSE<sup>lo</sup> cells stimulated with IL-2 (Fig. 10b).

## Discussion

This study established a new link between early T cell help, intracellular signalling pathways, regulation of effector transcription factors expression and the B cell response through the characterisation of the IL2/ERK/ELK1/*BACH2* axis which governs the B cell capacity to differentiate into plasma cell in a model system of primary human naive B cell culture. Strength in this model lies within the preliminary phase of activation as the full activation and proliferation of naive B cells in response to antigen-priming and T cell help (CD40L and cytokines) closely recapitulates the minimal initiation events observed during the first 4 days of an in vivo T cell-dependent response<sup>44,45</sup>. The sustained presence of exogenous anti-BCR during this phase is reminiscent of the readily accessible antigen presented by dendritic cells within the interfollicular zone, while soluble CD40L and IL-2 recreate the consecutive interactions undertaken by cognate B and T cells in vivo<sup>46,47</sup>. This T cell help activates B cells above a threshold required for eliciting plasma cell response, an effect mediated by *BACH2* repression (Fig. 10a). This finding is in accordance with the inverted relationship observed in mice between the strength of T cell help received by B cells in the GC and *Bach2* expression levels<sup>13</sup>. This is also in line with the synergistic effect of IL-2 and IL-21 observed in our culture system confirming observations made by others<sup>48</sup>. IL-21 is presumed to be the most potent inducer of B cell terminal differentiation, an effect mediated by STAT3 activation and BCL6 repression<sup>49,50</sup>. Beside its differentiation effect and unlike IL-2, IL-21 enhanced cell proliferation of human activated B cells, which complicate the study of the underlying molecular mechanisms. We decided therefore to focus our study on the minimal IL-2-mediated ERK signalling triggering plasma cell differentiation through *BACH2* downregulation. We believe this IL-2/ERK axis could mimic in vivo situations when ERK is activated above a threshold potentially through different stimuli such as IL-4 or IL-15, or as a result of intense proliferation. In this context IL-21 that promotes proliferation may also contribute to the activation of this pathway. At least, a recent study demonstrated that antigen-primed murine B cells have a maximal 2-day window for acquisition of T cell help<sup>51</sup>. This finding is again in line with our study and the ability of human naive B cells to engage the plasma cell differentiation program in response to a very short duration of IL-2 stimulation within the first 2 days in culture (Fig. 2b). This is

also in coherence with the short half-life of this cytokine<sup>52</sup> and the transient secretion of IL-2 by the T cells<sup>53,54</sup>.

Defined differentiation stimuli in our model system contributed to dissect heterogeneity in B cell responses, which is an important challenge in investigating B cell physiology. Using single-cell QPCR we found that only a small fraction of cells were early committed to plasma cell differentiation. Our integrating transcriptomic and *BACH2* chromatin binding data allowed the identification of a *BACH2* gene-signature in these cells, what revealed a significant *BACH2* contribution at the early stage of B-cell activation. Some genes of this signature are known for their role in both the GC biology and lymphomagenesis. *ATF5* for instance was found overexpressed in lymphoma and was recently associated with transformation to aggressive form of follicular lymphomas<sup>55,56</sup>. Several members of the BCL2 family were found regulated by *BACH2* in this study. Oncogenic processes may corrupt the balance of the apoptotic-signalling pathway under *BACH2* control leading to cell proliferation and tumour progression. In fact, cumulative evidences exist for a role of *BACH2* in lymphomagenesis, including the description of chromosomal translocations and mutations involving *BACH2* in some lymphomas<sup>57–59</sup>.

Our study reveals a mechanism involved in the temporal regulation of *BACH2* expression that control-B cell fate destiny (Fig. 10a). *In vivo* *BACH2* controls a specific time frame where AID expression/activity is fully efficient until *PRDM1* expression is induced<sup>6</sup>. By taking in account those elements it is highly probable that *BACH2* expression is finely regulated to enable immunoglobulin affinity maturation and to avoid unwanted genome-wide damages. In this study, our IL-2/ERK/*BACH2* pathway fits with such fine-tune regulation of *BACH2* expression. The enforced repression of *BACH2* in recently activated B cells recapitulated the phenotypes reminiscent of *Bach2*-deficient B cells in mice: the unimpeded BLIMP1 induction, a higher frequency of differentiated cells and a defect of CSR<sup>6</sup>. The unimpeded *PRDM1* expression could explain the impaired CSR observed in our model system. However beyond this mechanism we identified *ID2* as a direct target of *BACH2*. *ID2* inhibits E proteins such as E2A involved in *AICDA* (encoding AID) expression, thus regulating CSR<sup>60,61</sup>. Therefore our study suggests that *BACH2* expression may sustain *AICDA* expression through the repression of *ID2*.

Another insight into the effector functions of *BACH2* at this early time point of B cell fate decision was its implication in mitochondrial metabolism and haeme homeostasis. Herein we provide the first evidence that *BACH2* regulates *FECH* expression encoding a key enzyme required for haeme synthesis. We propose a regulatory loop initiated by *BACH2* repression, triggering haeme synthesis and consequently completing *BACH2* inhibition by impairing its function.

Our data have shown that small differences in the expression levels of *BACH2* at critical time point of B-cell activation have consequent effects on B cell fate. We characterised a novel *BACH2* enhancer whose activity was dynamically regulated along the differentiation process. ELK1 was identified as the mediator of this IL-2-induced mechanism, accessing and binding to this new enhancer. ELK1 is a member of the ETS family of transcription factors at the crossroads of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling cascades<sup>62</sup>. Its phosphorylation at S383 has mainly been studied, meanwhile different phosphorylation states and patterns of ELK1 exist and may vary with the stimuli triggering ERK activation thus determining the transcriptional response<sup>63</sup>. During the critical D2–D4 time window of *BACH2* regulation, the *BACH2* enhancer activity was under ELK1 positive control perhaps resulting from summed signal input integration (BCR, CD40L and TLR9 signalling). In contrast, IL-2 input

seemed to repress both the transcriptional activity of the enhancer and *BACH2* expression in ERK-dependent manner. Thus we propose that IL-2 signalling may be involved in ELK1 activator-repressor switching following ERK activation above a threshold (Fig. 10a). A similar mechanism was described earlier by Yang et al.<sup>42</sup> involving the temporal recruitment of corepressor complex depending on the dynamic phosphorylation status of ELK1. Collectively, our data suggest that this enhancer is important for *BACH2* regulation in activated B cells and may provide a mechanism behind the Elk1-mediated upregulation of *Prdm1* described earlier in a mouse model<sup>23</sup>.

In conclusion, our study has demonstrated a remarkably sensitive mechanism controlling the diversification and destiny of activated B cells. A short extrinsic input sustaining ERK activation initiates a molecular switch of ELK1 acting within the *BACH2* super-enhancer and fine-tuning *BACH2* expression. *BACH2* regulates of a broad program of molecular and cellular processes that may have if disturbed potentially important implications for antibody response efficiency and in lymphomagenesis.

## Methods

**Primary B cell purification.** Peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers were obtained from the Etablissement Français du Sang (Rennes, France) after Ficoll density centrifugation (Sigma-Aldrich). Volunteers were recruited under French Ministry of Higher Education and Research approval (AC-2014-2315) with written informed consent according to the Declaration of Helsinki. Human naive B cells were purified by negative selection using magnetic cell separation (Naive B Cell Isolation Kit II; cat no. 130-091-150 from Miltenyi Biotec) with anti-CD10 (0.5 µL/M of cells, cat no. 130-093-451 from Miltenyi Biotec) added in the antibody cocktail, using the AutoMACS deplete-sensitive program. The purity of the isolated CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> naive B cell population was routinely >99%. For experiments involving CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>MTG<sup>-</sup> naive B cells, the CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> population was stained with 100 nM MitoTracker Green FM (ThermoFisher) for 25 min at 37° and chased for 3 h (RPMI, SVF10%, 37°) before cell sorting populations on the BD FACSAria cell sorter (BD Biosciences).

## Cell culture and cell sorting.

Cell culture conditions, antibodies and flow cytometry procedures are as described in ref. 21 with a few modifications. All cultures were performed in complete medium consisting of RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Biowest) and antibiotics (Invitrogen). Apoptosis and proliferation were analysed using a PE-conjugated anti-active caspase-3 apoptosis kit (cat no. 550914 from BD Biosciences) and Click-IT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow cytometry assay kit (cat no. C10634 from ThermoFisher), respectively, according to the manufacturer's instructions. CFSE labelling of naive B cells was performed with 1 µM CFSE (Invitrogen) in serum free medium at 37 °C for 10 min and washed in complete medium to follow cellular divisions (ModFIT analysis—VSH), and enable cell sorting of CFSE<sup>hi/lo</sup> populations. Purified naive B cells were cultured at 7.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml in 24-well plates and stimulated during 4 days with 2.6 µg/ml F(ab')<sub>2</sub> fragment goat anti-human IgA + IgG + IgM (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 100 ng/ml recombinant human soluble CD40L (NCI), 1.0 mg/ml CpG oligodeoxynucleotide 2006 (Cayla Invivogen), and 50 U/ml recombinant IL-2 (SARL Pharmaxie). ERK1/2 activation was inhibited with MEK1 0.5 µM (PDI184161, Calbiochem). Day 4-activated B cells were washed and cultured at 4 × 10<sup>5</sup> cells/ml for up to 3 days with 50 U/ml IL-2, 12.5 ng/ml IL-10, and 5 ng/ml IL-4 (R&D Systems). All Abs used for flow cytometry analysis are listed in Supplementary Table 1 For QRT-PCR analyses and luciferase reporter assays, CFSE-stained B cells were collected at the required time point and cell sorted into CFSE<sup>hi/lo</sup> populations using FACSAria (BD Biosciences). All flow cytometry gating strategies are shown in Supplementary Fig. 8.

To identify the minimal time and duration for IL-2 stimulation during the activation phase, anti-IL-2 neutralising Ab or anti-IL-2 receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Abs with their isotype controls (all from R&D Systems) were used at 10 µg/mL in the medium.

For IgM secretion assessed by ELISA, D6-differentiated cells were sorted as CD20<sup>low</sup>CD38<sup>hi</sup> and reseeded with IL-2, IL-4 and IL-10 at 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL for 24 h. IgM antibodies were detected using AffiniPure Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H + L) (Jackson Immuno-Research Laboratories) coated on 96-well plates, followed by secondary peroxidase-conjugated goat anti-human IgM (Jackson Immuno-Research Laboratories). Purified Chrompure Human IgM (Jackson Immuno-Research Laboratories) was used as standard. Plates were developed using TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences). For ELISPOT, D6-sorted plasmablasts (100 and 500 cells, in triplicate) were grown for 1 h in 96-well plates with anti-IgM coated membranes (SIGMA). Secreting cells were detected with secondary anti-

human IgM-peroxydase antibody (SIGMA). For both experiments, D6-non-differentiated B cells were used as negative control.

Cytologic analysis of differentiated cells was performed by preparing 10<sup>5</sup> D6-cells for microscopy using cytospin followed by May-Grumwald-Giemsa staining.

**QRT-PCR analysis.** RNA was extracted using RNeasy microkit (cat no. 74004 from Qiagen) and reversed transcribed into cDNA with Superscript II (Invitrogen). QRT-PCR was performed using the TaqMan Gene Expression Master Mix and run on the Step One Plus Real-time PCR System from Applied Biosystems. All TaqMan primers (Applied Biosystems) used in this study are listed in Supplementary Table 2. Gene expression levels were quantified using *HPRT1* as endogenous control. The 2 exp(- $\Delta\Delta C_t$ ) method was used to determine the relative expression of each gene.

For single-cell QRT-PCR experiments, gene expression levels for the 16 selected Taqman assays within single-cell cDNA were measured with qPCR on 96.96 Dynamic Array IFC using the Fluidigm BioMark HD system. A total of 285 single cells from C1 captures were profiled using Dynamics Array IFC. Hierarchical clustering was performed on R version 3.2.4 with ComplexHeatmap (R package version 1.6.0), fluidigmSC (Fluidigm SINGuLAR Analysis Toolset, R package version 3.5.2), dendextend, amap (R package version 0.8-14) packages. We used a conservative Ct of 24 as LOD based on published guidelines<sup>64</sup>. Gene expression was defined on a log2 scale as: log2 expression = LOD-Ct. Samples were clustered by the Euclidean distance, and genes were clustered by the Pearson distance. Heatmap was generated with the 'global\_z\_score' (normalisation by the expression value with the global mean and the global standard deviation).

**Western blotting and DNA-binding ELISA.** All antibodies used for western blotting are listed in Supplementary Table 3. 0.8–1 × 10<sup>6</sup> primary naive B cells were recovered for protein extraction, which was performed using RIPA lysis buffer (Pierce) followed by cycles of sonication performed using the Biorupter Sonicator (Diagenode). Protein concentration was analysed using the BCA Protein Assay kit (cat no. 23225 from Pierce) and read by the Model 680 Microplate reader (Bio-Rad). Proteins were separated by the NuPAGE SDS-PAGE Gel system (Thermo Scientific) and transferred onto Immobilon-P PVDF membranes (Sigma-Aldrich) according to standard procedure. Detections were performed with HRP-conjugated secondary Ab (Bio-Rad) and enhanced chemiluminescent (ECL Plus) reagent (Amersham) using the G:BOX Chemi imaging system (Syngene). GAPDH or  $\beta$ -ACTIN on the same membrane served as loading control. Uncropped original scans of immunoblots are provided in Supplementary Fig. 9.

**Sequence alignment and regulatory elements identification.** MatInspector<sup>65</sup>, TFBSSEARCH<sup>66</sup>, TFSEARCH ([http://cbrc3.cbrc.jp/papia/howtouse/howtouse\\_tfsearch.html](http://cbrc3.cbrc.jp/papia/howtouse/howtouse_tfsearch.html)), PROMO<sup>67</sup> and comparative genomics tool rVISTA<sup>68</sup> were used for the identification of regulatory elements in human *BACH2* locus. BLAST program (NCBI) was used to search for alignment.

**ChIP-QPCR assay and analysis.** ChIP-IT PBMC kit (cat no. 53042 from Active Motif) was used according to the manufacturer's instructions. D3-activated naive B cells primed with IL-2 were fixed according to the protocol and lysed by sonication using the Epishear probe sonicator and the cooled sonication platform (Active Motif). Sonicated chromatin was controlled on gel prior to immunoprecipitation. Rabbit antibodies to ELK1 (ab32106), H3K9ac (ab44411), H3K27ac (ab4729), H3K4me1 (ab8895), p300 (ab10485) and IgG (ab37415) were from Abcam. Results were analysed with the ChIP-IT qPCR Analysis kit (cat no. 53029 from Active Motif) to calculate binding events detected per 1000 cells. Human Negative Control Primer Set1 and Human Positive Control Primer Set GAPDH-2 from the ChIP-IT qPCR Analysis kit were used, other primers are listed in Supplementary Table 4.

**siRNA experiments.** All siRNAs (ON TARGET Plus, SMART Pool, Dharmacon) used in this study are listed in Supplementary Table 5. 10<sup>6</sup> primary naive B cells per condition were recovered from culture for transfection using the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (cat no. VCA-1003 from Lonza). Naive B cells were centrifuged at 1800 r.p.m. for 10 min at room temperature, re-suspended in transfection buffer and combined with 100 pmol of either target or control siRNA. Naive B cells were then electroporated using program O-17 of the Amaxa Nucleofector II Device (Lonza), re-suspended with pre-incubated media and cultured at 37 °C for 24 or 48 h. Transfection was optimised using a labelled siRNA control (AF647). 75% of the electroporated cells were positive 24 h after electroporation with 80–90% cell viability. Knockdown mRNA efficiency was determined for each siRNA by QRT-PCR and western blot analysis.

**Luciferase reporter constructs.** All oligonucleotides used in the construction of the *BACH2* luciferase reporter plasmids were designed using Primer3 and synthesised by Eurogentec. The list of cloning and sequencing primers is available in Supplementary Table 6. DNA insert sequences were amplified by PCR using Q5 High-Fidelity DNA polymerase (NEB) with primers containing restriction sites followed by PCR product purification (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up,

Machery-Nagel). Purified insert DNAs together with the appropriate expression vectors were then restriction digested using corresponding enzymes (CutSmart restriction endonucleases, NEB), purified and ligated together using T4 DNA ligase (Roche). The reporter vectors implemented for DNA insertion were the basic vector pNLI.1[*Nluc*] and minimal promoter vector pNLI.1[*Nluc*/minP] that both encoded the NanoLuc luciferase reporter gene (Promega). The pGL4.50[*luc2*/CMV/Hygro] vector (Promega) encoding the Firefly luciferase reporter gene *luc2* (*Photinus pyralis*) was used for transfection efficiency. *Escherichia coli* cells (MAX Efficiency DH5 $\alpha$  Competent cells, Invitrogen) were transformed with the recombinant plasmid DNA and individual colonies were then screened for the presence of the DNA insert by PCR (*Taq* DNA Polymerase with ThermoPol Buffer, NEB). Positively identified clones were sent for Sanger sequencing analysis. NCBI BLAST confirmed the absence of mutations. Finally, the selected plasmid DNA clones were further expanded and purified (NucleoBond Xtra Midi Plus EF, Machery-Nagel).

The luciferase reporter containing the *BACH2* minimal promoter (−725; +146), pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>, was constructed through PCR amplification from tonsil B cell DNA as previously described by ref.<sup>41</sup>, followed by *NheI*/*XhoI* restriction digestion and ligation into the pNLI.1 [Nluc] vector.

The luciferase reporter vector containing the 228 bp (+1265; +1493) *BACH2* enhancer (Enh), pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh, was constructed through PCR amplification from the PAC clone RP1-104D1 followed by *XhoI* restriction digestion and downstream ligation into the *BACH2* minimal promoter construct pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>. The enhancer was then sub-cloned from pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh and ligated into the *XhoI* site of the independent minimal promoter vector pNLI.1[*Nluc*/minP] to generate minP<sub>NLI.1</sub>/Enh. All enhancer inserts were screened by PCR to identify sequence ligations in both the 5'–3' and 3'–5' orientation. Sequencing confirmed the orientation of inserts.

The remaining luciferase reporter constructs containing fragmented sequences of the *BACH2* enhancer, namely Enh80 (+1265/+1366), Enh122 (+1388/+1493) and Enh115 (+1265/+1381) were generated by PCR amplification with primers containing *XhoI* restriction sites at the 5' end and ligation into pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>. pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Δ21nt-Enh was generated by sub-cloning the Enh122 sequence by blunt ended ligation into the *EcoRV* site of the pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh80 vector. All fragmented enhancer inserts were screened by PCR to identify sequence ligations in both the native 5'–3' and reverse 3'–5' orientation.

For preparation of the mutant Mut-PU1bs and Mut-ELK1bs forms of the enhancer, pNLI.1/Enh was implemented as DNA template for PCR site-directed mutagenesis (Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit, cat no. E0554 from NEB). The presence of the substitution mutations within the enhancer was confirmed by sequencing. The mutated enhancer sequences were then sub-cloned by *XhoI* restriction digestion into the *XhoI* site of pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub> to generate pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Mut-PU1bs and pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Mut-ELK1bs.

**Luciferase reporter assays.** The following luciferase assay experiments were performed on primary naive B cells, transfected using the Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit V (cat no. VCA-1003 from Lonza) and cultured under the conditions of the *in vitro* B cell differentiation model. Depending on the day of electroporation between 1.0 and 5.0  $\times 10^6$  B cells were re-suspended in transfection buffer and combined with 4–5  $\mu$ g of appropriate *BACH2* containing NanoLuc reporter vectors together with 1  $\mu$ g of control plasmid, pGL4.50[*luc2*/CMV/Hygro]. B cells were electroporated using program O-17 of the Amaxa Nucleofactor II Device (Lonza), re-suspended with pre-incubated media and cultured at 37 °C for 24 h. 40% transfection efficiency was observed with 2  $\mu$ g pmax-GFP and ~80–90% cell viability with 2–4  $\mu$ g DNA. Cells were then collected, washed with PBS and centrifuged at 1800 r.p.m. ( $\times 2$ ). Finally the cells were lysed in 50  $\mu$ L 1X Passive Lysis Buffer (Promega) for 15 min at room temperature followed by storage of the lysate at −80 °C. The Nano-Glo Dual-Luciferase reporter Assay system (Promega) was used to detect luciferase expression from the NanoLuc and pGL4.50[*luc2*/CMV/Hygro] reporter vectors within lysate samples using the luminometer of the Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific). The luciferase expression values, read as relative light units (RLU), from both reporter vectors were averaged and NanoLuc was normalised to firefly luciferase. Ratios of RLU were then normalised to that of control promoterless condition (pNLI.1) or minP<sub>BACH2</sub> or minP<sub>NLI.1</sub>.

For the kinetic experiments of pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh and pNLI.1/Enh, naive B cells were electroporated starting from D0 through to D5. D6 plasmablasts were initially electroporated on D4 and cell sorted as CD20<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup> cells on D6. For the kinetic experiment of pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Δ21nt-Enh, activated B cells were electroporated between D1–D4. Following each electroporation, transfected cells were placed back into the stimulation medium that corresponded with the two-step culture system and the luciferase activity of all the constructs was determined 24 h later (or 48 h for D6 plasmablasts).

To determine the effect of IL-2 on the *BACH2* enhancer in total activated B cells, cells were electroporated on D2 with pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh (native orientation) and subsequently placed back into culture with or without IL-2 for 24 h. For identification of the sub-population of dividing and proliferating cells, naive B cells stained with CFSE on D0 were electroporated on D2 with pNLI.1/minP<sub>BACH2</sub>/Enh (native orientation) and cultured for 24 h and 48 h. On D3, cells were stained with Hoechst and sorted into three populations CFSE<sup>hi</sup>H<sup>+</sup>, CFSE<sup>hi</sup>H<sup>−</sup>

and CFSE<sup>lo</sup>. On D4, cells were sorted on CFSE staining alone into CFSE<sup>hi</sup> and CFSE<sup>lo</sup> populations.

**RNA-seq.** Three experiments from independent blood donors were analysed. RNA extractions were performed with the NucleoSpin RNA XS kit (cat no. 740902.250 from Machery-Nagel). QC, library preparation and sequencing were performed by Helixio company (Clermont Ferrand, France). Briefly, libraries were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (cat no. RS-122-2101 from Illumina) and samples were sequenced on an Illumina NextSeq 500 using 75-bp single-end reads (NextSeq 500 High Output v2, Illumina). Quality of sequencing data was monitored by FastQC. Residual adapters from sequencing were trimmed using cutadapt 1.0. Potential PCR duplicates were removed using SAMtools 1.3. Reads were then aligned on the GRCh38 human genome using STAR 2.4.2a. Differential expression on filtered genes (HTSfilter 1.7.1), were performed using DESeq2 in R 3.3.1. Genes were declared differentially expressed with a false discovery rate < 5%. For heatmap, genes differentially expressed with fold change > 1.4 in CD25<sup>hi</sup> and siBACH2 condition compare to CFSE<sup>lo</sup> population was plotted. Log2 normalised read counts from DESeq2 were used to generate the representation with glplots 3.0.1, and RColorBrewer 1.1–2. Hierarchical clustering was generated using Euclidean distance matrix with complete linkage.

**ChIP-seq.** *BACH2* antibody performance used for the ChIP (D3T3G, Cell signalling) was certified by Active Motif Epigenetic Services. Activated naive B cells at D3 of the culture were fixed with 1% formaldehyde for 15 min at room temperature. Cross-linking was quenched with Glycerine. For immunoprecipitation, 28  $\mu$ g of chromatin and 40  $\mu$ L of antibody were used. Control, siBACH2 and input were sequenced and aligned on hg19. For comparative analysis, standard normalisation is achieved by down-sampling the usable number of tags for each sample in a group to the level of the sample in the group with the fewest usable number of tags. Peaks were called using the MACS 2.1.0 algorithm<sup>69</sup>. MACS default cutoff is p-value 1e-7 for narrow peaks and 1e-1 for broad peaks. Peak filtering was performed by removing false ChIP-seq peaks as defined within the ENCODE blacklist<sup>70</sup>.

Known motifs were identified with the findMotifsGenome program of the HOMER package<sup>71</sup> using default parameters and input sequences comprising  $\pm 100$  bp from the centre of the top 1000 peaks.

*BACH2* target analysis was realized using BETA<sup>72</sup> using the default parameters with differential gene expression data set (siBACH2 vs. uncommitted B cells,  $p < 0.05$ ) and ChIP-seq data.

**Statistical analyses.** GraphPad Prism software was used for statistical analysis using the Mann–Whitney non-parametric test or the two-tailed unpaired Student's *t*-test if not stated otherwise.

**Data availability.** The data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files, or are available on reasonable request from the corresponding authors. RNA-seq and ChIP-seq data have been deposited in Gene Expression Omnibus with the primary accession code GSE102460.

Received: 8 December 2016 Accepted: 19 September 2017

Published online: 13 November 2017

## References

- Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A. & Muto, A. Orchestration of plasma cell differentiation by *Bach2* and its gene regulatory network. *Immunol. Rev.* **261**, 116–125 (2014).
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 160–171 (2015).
- Victoria, G. D. et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **143**, 592–605 (2010).
- Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 185–189 (2015).
- Carotta, S. et al. The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J. Exp. Med.* **211**, 2169–2181 (2014).
- Muto, A. et al. *Bach2* represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J.* **29**, 4048–4061 (2010).
- van Keimpema, M. et al. The forkhead transcription factor FOXP1 represses human plasma cell differentiation. *Blood* **126**, 2098–2109 (2015).
- Tellier, J. et al. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.3348> (2016).

9. Minnich, M. et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.3349> (2016).
10. Kallies, A. et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **26**, 555–566 (2007).
11. Xu, H. et al. Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nat. Immunol.* **16**, 1274–1281 (2015).
12. Kometani, K. et al. Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* **39**, 136–147 (2013).
13. Shinnakasu, R. et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* **17**, 861–869 (2016).
14. Tanaka, H. et al. Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* [jbc.M116.713842](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.713842) (2016). doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.713842>
15. Huang, C., Geng, H., Boss, I., Wang, L. & Melnick, A. Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation. *Blood* **123**, 1012–1020 (2014).
16. Hnisz, D. et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* **155**, 934–947 (2013).
17. Qian, J. et al. B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* **159**, 1524–1537 (2014).
18. Duffy, K. R. et al. Activation-induced B cell fates are selected by intracellular stochastic competition. *Science* **335**, 338–341 (2012).
19. Hawkins, E. D. et al. Quantal and graded stimulation of B lymphocytes as alternative strategies for regulating adaptive immune responses. *Nat. Commun.* **4**, 2406 (2013).
20. Taylor, J. J., Pape, K. A., Steach, H. R. & Jenkins, M. K. Humoral immunity. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell. *Science* **347**, 784–787 (2015).
21. Le Gallou, S. et al. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J. Immunol.* **189**, 161–173 (2012).
22. Caron, G. et al. Cell-cycle-dependent reconfiguration of the DNA methylome during terminal differentiation of human B cells into plasma cells. *Cell Rep.* **13**, 1059–1071 (2015).
23. Yasuda, T. et al. ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Sci. Signal* **4**, ra25–ra25 (2011).
24. Yasuda, T. et al. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* **28**, 499–508 (2008).
25. Rui, L., Healy, J. L., Blasioli, J. & Goodnow, C. C. ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation. *J. Immunol.* **177**, 5337–5346 (2006).
26. Niu, H., Ye, B. H. & Dalla-Favera, R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev.* **12**, 1953–1961 (1998).
27. Wirths, S. & Lanzavecchia, A. ABCB1 transporter discriminates human resting naïve B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3433–3441 (2005).
28. Palanichamy, A. et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol.* **182**, 5982–5993 (2009).
29. Jourdan, M. et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J. Immunol.* **187**, 3931–3941 (2011).
30. Jang, K.-J. et al. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nat. Commun.* **6**, 6750 (2015).
31. Tsukumo, S.-I. et al. Bach2 maintains T cells in a naïve state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 10735–10740 (2013).
32. Vikstrom, I. et al. Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* **330**, 1095–1099 (2010).
33. Green, J. A. et al. The sphingosine 1-phosphate receptor SIP<sub>2</sub> maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat. Immunol.* **12**, 672–680 (2011).
34. Boros, J. et al. Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery. *Genome Res.* **19**, 1963–1973 (2009).
35. Arner, E. et al. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science* **347**, 1010–1014 (2015).
36. Visel, A. et al. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* **457**, 854–858 (2009).
37. Sharrocks, A. D. ERK2/p42 MAP kinase stimulates both autonomous and SRF-dependent DNA binding by Elk-1. *FEBS Lett.* **368**, 77–80 (1995).
38. Li, Q., Vaingankar, S. M., Green, H. M. & Martins-Green, M. Activation of the 9E3/cCAF chemokine by phorbol esters occurs via multiple signal transduction pathways that converge to MEK1/ERK2 and activate the Elk1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15454–15465 (1999).
39. Li, Q. J., Vaingankar, S., Sladek, F. M. & Martins-Green, M. Novel nuclear target for thrombin: activation of the Elk1 transcription factor leads to chemokine gene expression. *Blood* **96**, 3696–3706 (2000).
40. Herrera, R. E., Shaw, P. E. & Nordheim, A. Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* **340**, 68–70 (1989).
41. Casolari, D. A. et al. Transcriptional suppression of BACH2 by the Bcr-Abl oncoprotein is mediated by PAX5. *Leukemia* **27**, 409–415 (2013).
42. Yang, S. H., Vickers, E., Brehm, A., Kouzarides, T. & Sharrocks, A. D. Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2802–2814 (2001).
43. Khalil, A. M., Cambier, J. C. & Shlomchik, M. J. B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science* **336**, 1178–1181 (2012).
44. Kerfoot, S. M. et al. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* **34**, 947–960 (2011).
45. Kitano, M. et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* **34**, 961–972 (2011).
46. Okada, T. et al. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* **3**, e150 (2005).
47. Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C. & Germain, R. N. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* **312**, 1672–1676 (2006).
48. Berglund, L. J. et al. IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* **122**, 3940–3950 (2013).
49. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage. *Front. Immunol.* **5**, 65 (2014).
50. Linterman, M. A. et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* **207**, 353–363 (2010).
51. Turner, J. S., Marthi, M., Benet, Z. L. & Grigorova, I. Transiently antigen-primed B cells return to naïve-like state in absence of T-cell help. *Nat. Commun.* **8**, 15072 (2017).
52. Donohue, J. H. & Rosenberg, S. A. The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J. Immunol.* **130**, 2203–2208 (1983).
53. Sojka, D. K., Bruniquel, D., Schwartz, R. H. & Singh, N. J. IL-2 secretion by CD4<sup>+</sup>T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J. Immunol.* **172**, 6136–6143 (2004).
54. Rothenberg, E. V. & Ward, S. B. A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9358–9365 (1996).
55. Shringarpure, R. et al. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br. J. Haematol.* **134**, 145–156 (2006).
56. Bisikirska, B. et al. Elucidation and pharmacological targeting of novel molecular drivers of follicular lymphoma progression. *Cancer Res.* **76**, 664–674 (2016).
57. Kobayashi, S. et al. Identification of IGHCδ-BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 207–216 (2011).
58. Türkmen, S. et al. A BACH2-BCL2L1 fusion gene resulting from a t(6;20)(q15;q11.2) chromosomal translocation in the lymphoma cell line BLUE-1. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 389–396 (2011).
59. Jiang, Y., Soong, T. D., Wang, L., Melnick, A. M. & Elemento, O. Genome-wide detection of genes targeted by non-Ig somatic hypermutation in lymphoma. *PLoS ONE* **7**, e40332 (2012).
60. Gonda, H. et al. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* **198**, 1427–1437 (2003).
61. Wöhner, M. et al. Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *J. Exp. Med.* **213**, 1201–1221 (2016).
62. Gille, H. et al. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* **14**, 951–962 (1995).
63. Morris, J. F. et al. Elk-1 phosphorylated at threonine-417 is present in diverse cancers and correlates with differentiation grade of colonic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **44**, 766–776 (2013).
64. Livak, K. J. et al. Methods for qPCR gene expression profiling applied to 1440 lymphoblastoid single cells. *Methods* **59**, 71–79 (2013).
65. Cartharius, K. et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933–2942 (2005).
66. Tsunoda, T. & Takagi, T. Estimating transcription factor binding on DNA. *Bioinformatics* **15**, 622–630 (1999).
67. Messegue, X. et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**, 333–334 (2002).



68. Loots, G. G. & Ovcharenko, I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* **32**, W217–W221 (2004).
69. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137 (2008).
70. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
71. Heinz, S. et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* **38**, 576–589 (2010).
72. Wang, S. et al. Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. *Nat. Protoc.* **8**, 2502–2515 (2013).

### Acknowledgements

We thank L. Deleurne (Flow Cytometry facility, Biosit, University of Rennes 1) for cell sorting. The bioinformatic core facility IFB Grand Ouest (Genouest) provided computing resources. The study was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée), INSERM (Prime d'installation to C.D.), Rennes Metropole (Allocation d'installation Scientifiques to C.D.), Fondation Française pour la recherche contre le Myélome et les Gammopathies (FFRMG), and internal grant from the Haematology laboratory CHU de Rennes. H.S. and N.H. were PhD fellows from the LabEx IGO program (ANR-11-LABX-0016-01) funded by the French Government program (Investissements d'Avenir). H.S. was supported by fellowship from the French Society of haematology (SFH). C.P. was supported by a Master-fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). We are grateful to S. Nutt (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia) and M. Cogné (Université de Limoges, France) for critical reading of the manuscript.

### Author contributions

Conceptualization T.F. and C.D.; Methodology N.H., G.C. and C.D.; investigation H.S., N.H., C.P., C.M. and C.D.; Analysis H.S., N.H., C.P. and C.D.; Supervision T.F. and C.D.; Writing-original draft C.D.; Review and editing H.S., N.H., K.T., T.F. and C.D.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at doi:10.1038/s41467-017-01475-7.

**Competing interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

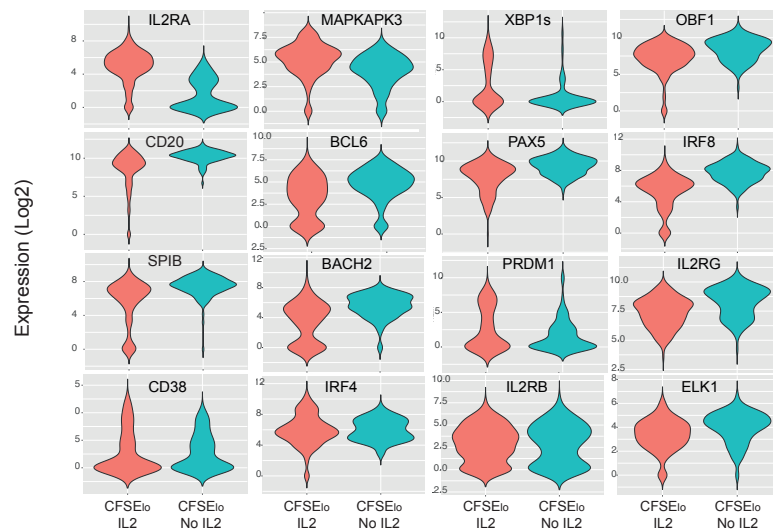
**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

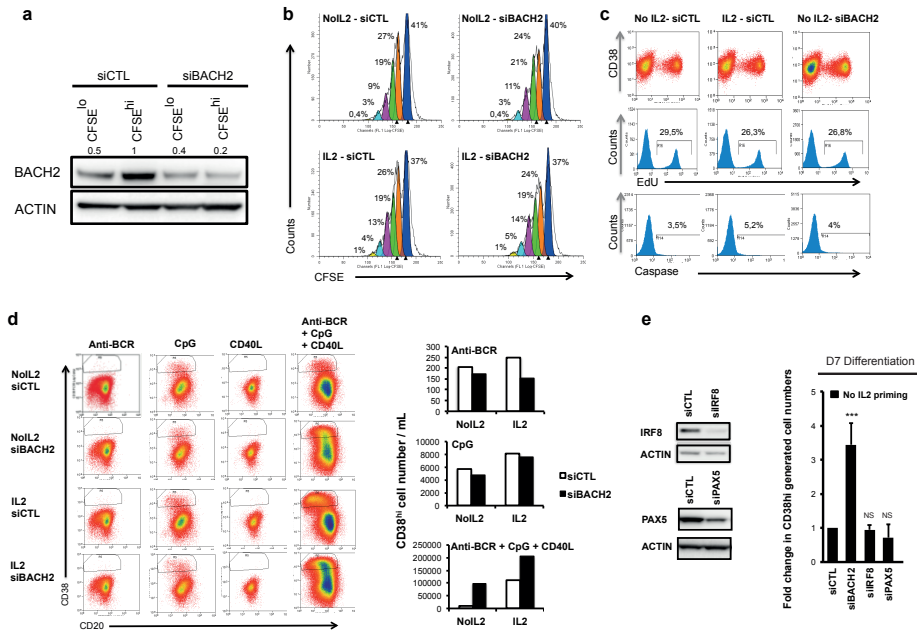
© The Author(s) 2017

## Figures supplémentaires



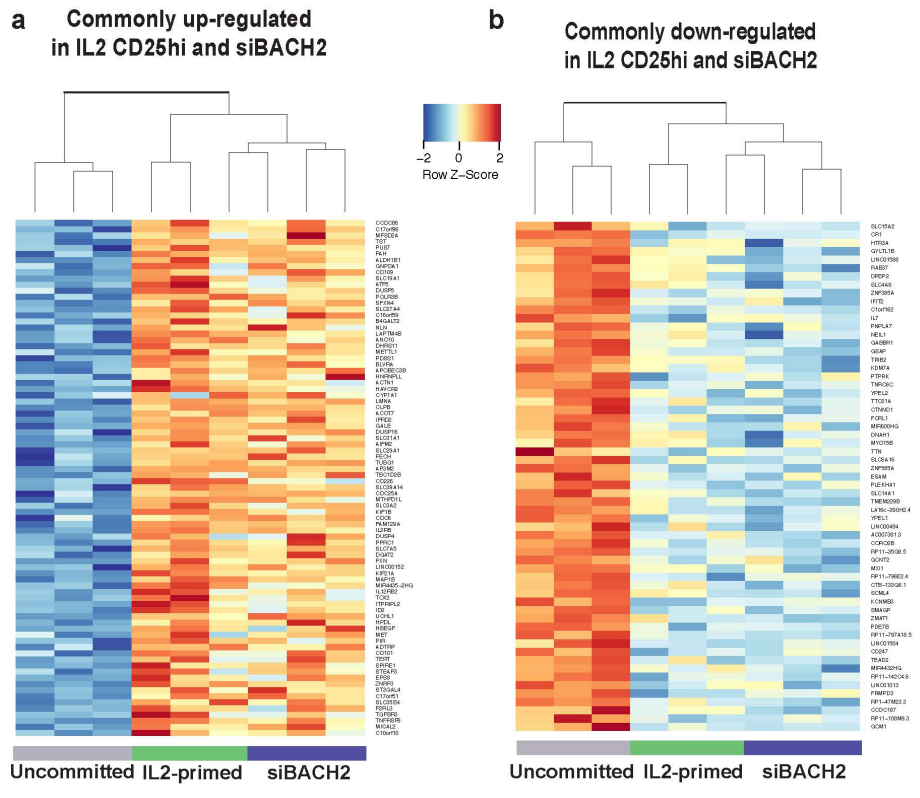
**Supplementary Figure 1: Comparison of gene expression levels analysed by single-cell QRT-PCR between D4 CFSE<sup>lo</sup> cells when primed or not with IL-2.**

Violin plots of gene expression: in blue the D4 CFSE<sup>lo</sup> cells (CFSE<sup>lo</sup> No IL2, n=110), and in red the IL-2-primed counterpart (CFSE<sup>lo</sup> IL2, n=175). Expression (vertical axis) is the log2-transformed fold change over median gene expression level for each condition. Width of the violin indicates frequency at the expression level. Genes are ranked by their ANOVA p-value calculated with PRISM: *IL2RA*, *XBP1s*, *OBF1*, *CD20*, *BCL6*, *IRF8*, *SPIB*, *PAX5*, *MAPKAPK3*, *BACH2*  $p < 10^{-4}$ ; *PRDM1*  $p < 10^{-3}$ ; *IL2RG*  $p < 0.005$ ; *CD38*, *IRF4*, *IL2RB*, *ELK1* non-significant (ANOVA).



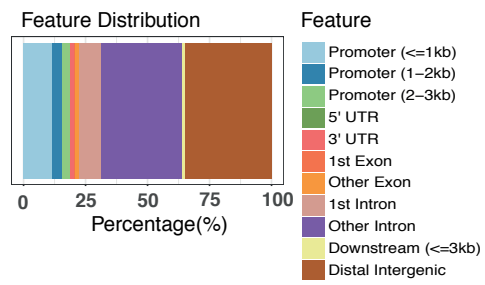
**Supplementary Figure 2: Plasma cell differentiation mechanism triggered by BACH2 inhibition is independent of a proliferation or precocious differentiation effect and remains dependent of the combined BCR, TLR9 and CD40 signaling activation.**

(a) The efficiency of BACH2 inhibition with siRNA (siBACH2) was monitored at D4, 48h after cell electroporation in sorted populations based on CFSE dilution. Non-targeting siRNA (siCTL) was used as control. Values are the average fold changes in the expression levels of *BACH2* normalized to  $\beta$ -ACTIN levels for two independent experiments. (b) Naive B cells were CFSE stained and activated for 2 days before electroporation with siBACH2 or a negative control (siCTL), then stimulated with or without IL-2. CFSE dilution was assessed at D4 by flow cytometry and analysed with ModFit. One experiment representative of three is shown. (c) Flow cytometry analyses of D4-activated B cells that were stimulated or not with IL-2 and electroporated with siBACH2 or siCTL at D2. Proliferation was assessed by EdU staining and survival by active caspase 3 staining. CD38 staining does not reveal premature differentiation of B cells deficient for BACH2. (d) D7 flow cytometry analysis of CD38<sup>hi</sup> up regulation by B cells that were activated with anti-BCR alone, CpG or CD40L (conditions that do not enable B cell proliferation) or the cocktail of the three stimuli sufficient to trigger proliferation. At D2, cells were electroporated with siBACH2 or siCTL and stimulated with or without IL-2 (No IL2). Absolute CD38<sup>hi</sup> cell number generated at D7 depending on the activation cocktail (anti-BCR or CpG or anti-BCR+CpG+CD40L), the IL-2 priming, and BACH2 inhibition (siBACH2) is shown for one experiment representative of two. (e) Efficiency of IRF8 and PAX5 inhibition on protein expression levels at D4, 48h after electroporation, analysed by immunoblotting.  $\beta$ -Actin was used as loading control and levels of protein expression in siCTL electroporated cells were used as references. Plasma cell differentiation induced by siRNA electroporation of activated B cells at D2 and monitored by flow cytometry at D7. Data are normalized to CD38<sup>hi</sup> cell number generated by the control cells (siCTL). siIRF8 (n=4), siPAX5 (n=3), siBACH2 (n=7). Significant differences compared with CD38<sup>hi</sup> cell number in the reference condition (IL2-siCTL) are shown, \*\*\*p<0.001, NS: No significant differences (t-test).



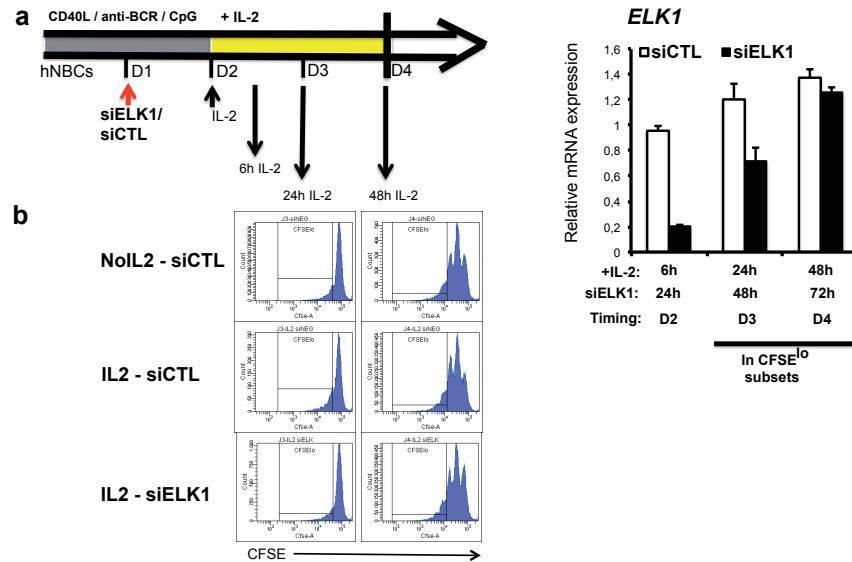
**Supplementary Figure 3: Transcriptomic analysis reveals a common signature shared between IL-2 committed cells and siBACH2 committed cells.**

(a) Expression profile of the 84 up-regulated genes shared between D4 CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells (IL2-primed) and D4 CFSE<sup>lo</sup> siBACH2 cells (siBACH2) compared with D4 CFSE<sup>lo</sup> control cells (uncommitted), FC>1.4 and p<0.05 (Wald test), n=3 for each condition. (b) Expression profile of the 61 down-regulated genes shared between D4 CFSE<sup>lo</sup> CD25<sup>hi</sup> cells (IL2-primed) and D4 CFSE<sup>lo</sup> siBACH2 cells (siBACH2) compared with D4 CFSE<sup>lo</sup> control cells (uncommitted), FC>1.4 and p<0.05 (Wald test), n=3 for each condition.



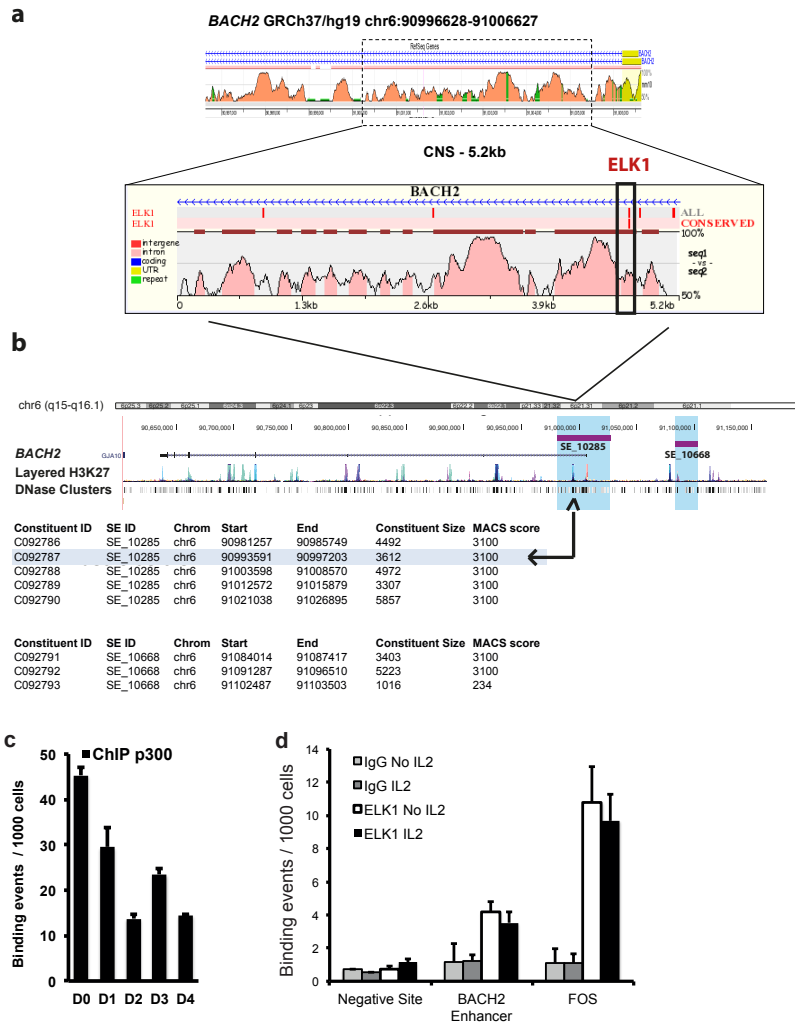
**Supplementary Figure 4: BACH2 ChIP-seq analysis.**

Relationship of genome-wide BACH2 binding sites to annotated genes in D3 activated B cells in absence of IL-2.



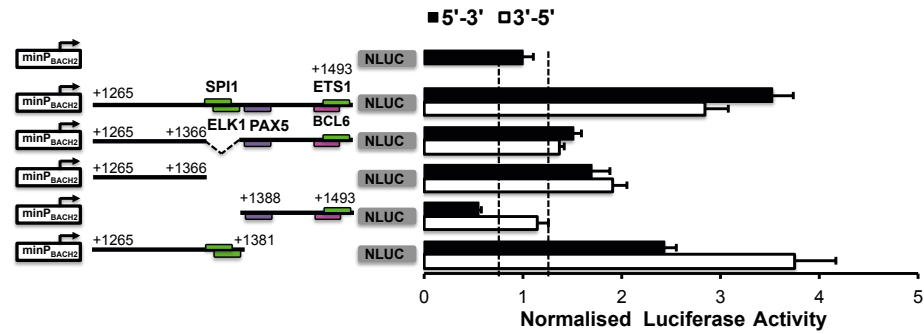
**Supplementary Figure 5: ELK1 inhibition does not affect cell proliferation.**

(a) Expression level of *ELK1* analysed by QRT-PCR at different time points of the activation process of naive B cells (hNBCs) electroporated at D1 by siELK1 or the non-targeting control siRNA (siCTL). One experiment representative of three, the s.d. is shown. Further *BACH2* expression analysis was performed 48h after siELK1 electroporation (related to Fig. 7b). (b) Effect of ELK1 inhibition on CFSE dilution analysed by flow cytometry at D3 and D4. Naive B cells were electroporated at D1 with siELK1 or the negative control siCTL. One representative experiment out of 4 is shown.



**Supplementary Figure 6: Characterisation of an active regulatory region within the *BACH2* super-enhancer.**

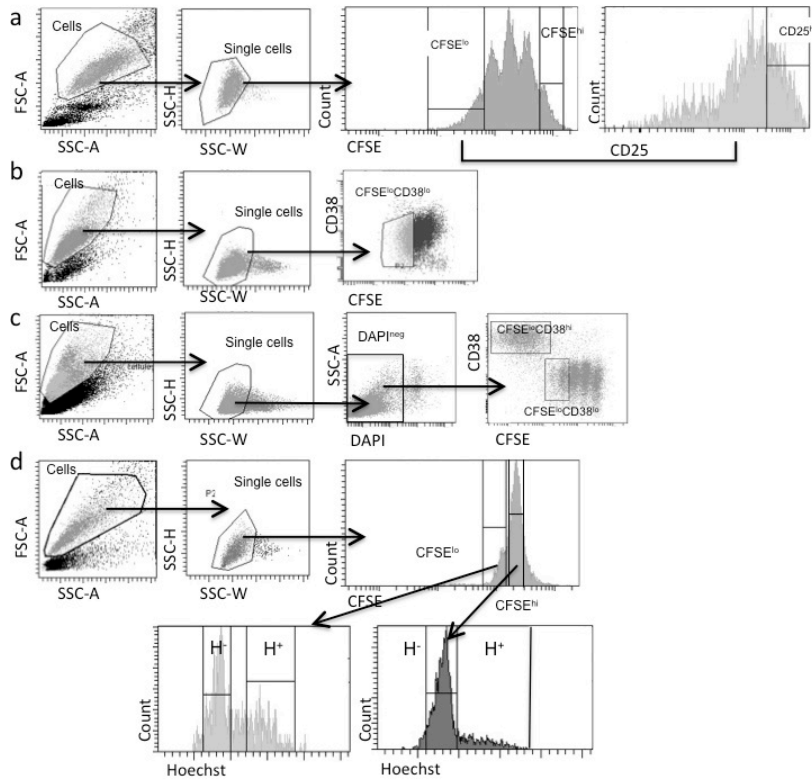
**(a)** VISTA plot of conserved non-coding sequences (CNSs) adjacent to the *BACH2* transcription start site. A 5.2kb CNS within intron 1 is conserved between human and mice *BACH2* locus. Out of the 5 putative ELK-1 binding sites identified using Transfac only the site of interest is conserved with mice (rVISTA) as shown by the 10bp sequence alignment (Jalview). **(b)** Alignments showing mapped *BACH2* super enhancer (SE), H3K27ac from 7 cell lines from ENCODE and clusters of DNase I hypersensitivity (from 125 lines ENCODE). Arrows indicate the localisation of the conserved ELK1 binding site. Super-enhancer positions were obtained using CD19 primary data from *Hnisz D. et al., Cell 2013*, and analysed with dbSUPER. **(c)** ChIP analysis of p300 binding on *BACH2* enhancer during activation of naive B cells *in vitro*. One representative experiment is shown with the s.d. (n=3). **(d)** ChIP assay of the *in vivo* binding of ELK1 in D3 B cells primed or not with IL-2. DNA immunoprecipitated by total ELK1 antibody or isotype control (IgG) was amplified by real time PCR using primers flanking the putative ELK1 binding site in *BACH2* intron 1 (*BACH2* enhancer), the known ELK1 binding regions in *FOS* gene and negative control primers as a reference (negative site). Average with the s.d. of three independent experiments is shown.



**Supplementary Figure 7: Regulatory elements analysis in the 228nt enhancer sequence.**

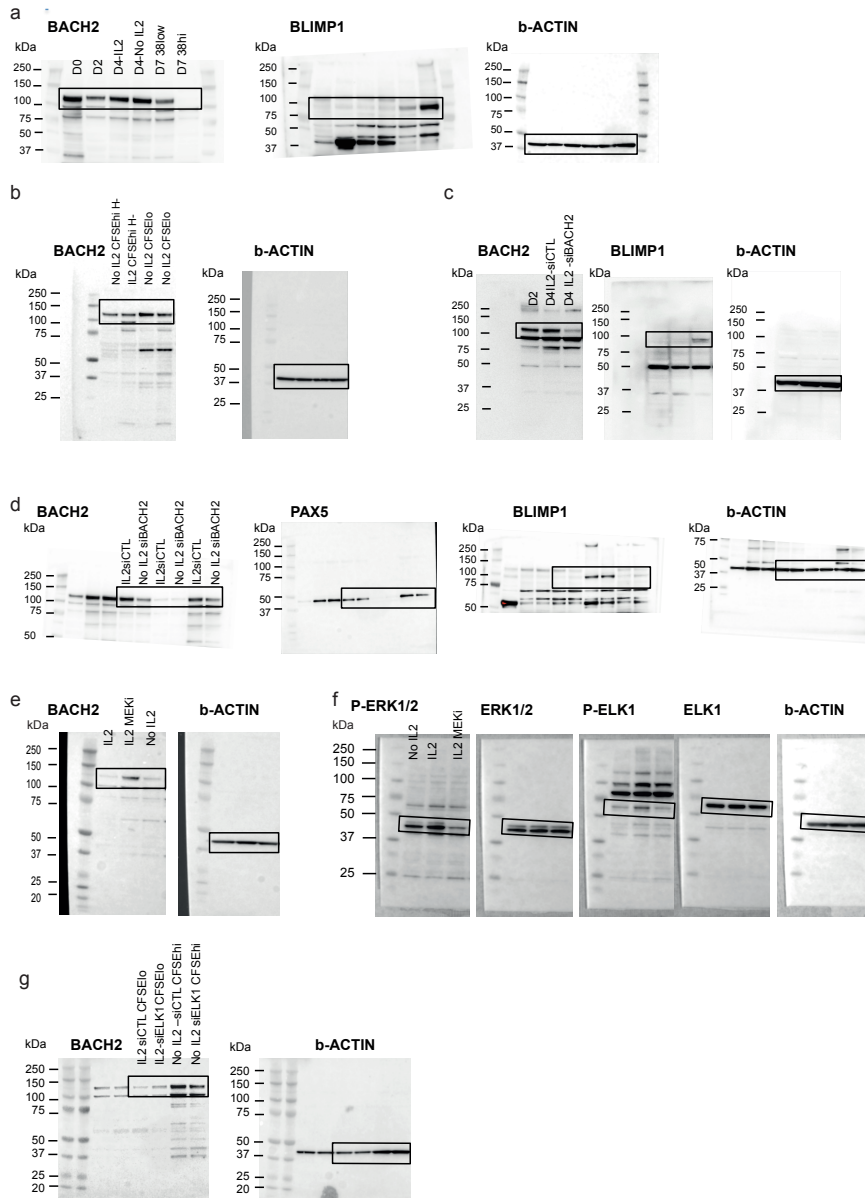
Candidate binding motifs predicted by MATINSPECTOR in the enhancer sequence are shown (green boxes: ETS1 family members; purple box: PAX5; pink box: BCL6). Luciferase activity of the *BACH2* promoter alone (line 1), full-length enhancer sequence (line 2), and ELK1 deleted fragments with deletions from the 5' end or 3' end. Numbers adjacent to diagrams indicate positions relative to the transcription start site. Fragments were systematically cloned in both orientations (5'-3' and 3'-5') in the luciferase reporter plasmids, downstream from the proximal *BACH2* promoter (minP<sub>BACH2</sub>). Activated B cells were electroporated with the reporter constructs on D2 and cultured 24h in presence of IL-2. Luciferase activity (mean +/- s.e.m. from 2 to 12 independent experiments) is presented relative to *BACH2* promoter activity alone (line 1). Statistically significant cutoff values (dotted lines) were obtained by adding 2 standard deviations to the mean value obtained for the promoter activity. Deletion of the ELK1 binding motif (positions +1367 to +1387, line 3) resulted in diminished luciferase activity almost equal to that of the minP<sub>BACH2</sub>. In support of a positive role of ELK1 motif, other constructs with deletions of the ELK1 binding motif (+1265 ; +1366, line 4) and (+1388 ; +1493, line 5) also resulted in lower transcriptional activity, while the truncated enhancer sequence which carries the ELK1 motif (+1265 ; +1381, line 6) recapitulated activity of the full-length enhancer. In summary, the ELK1 motif appeared to be a major positive regulatory element at this time point of human B cell activation. Other minor regulatory elements, activator (+1265 ; +1366) or repressor (+1388 ;+1493), could be involved in the enhancer function.





**Supplementary Figure 8: Gating strategies for flow cytometry analyses and cell sorting.**

Naive B cells were stained with CFSE at D0 and activated *in vitro*. (a) Gating strategy to sort CFSE<sup>hi</sup> activated B cells at D4 (related to Fig. 9g and Fig.10b), the CFSE<sup>lo</sup> population related to Fig. 1c, Fig. 2a and Fig.10b, and CFSE<sup>lo</sup>CD25<sup>hi</sup> cells related to Fig. 1d-e. (b) Gating strategy to sort D5 CFSE<sup>lo</sup>CD38<sup>lo</sup> population related to Fig. 2a. (c) Gating strategy to sort D7 CFSE<sup>lo</sup>CD38<sup>hi</sup> and CFSE<sup>lo</sup>CD38<sup>lo</sup> populations related to Fig. 2a-b and Fig. 3c-e. (d) Gating strategy to sort D3 CFSE<sup>hi</sup>Hoechst<sup>neg</sup>, CFSE<sup>lo</sup>Hoechst<sup>+</sup> and CFSE<sup>lo</sup>Hoechst<sup>neg</sup> populations related to Fig. 3c and Fig. 9f.



**Supplementary Figure 9: Uncropped original images of immunoblots.**

(a) Immunoblot data corresponding to Fig. 2b. (b) Immunoblot data corresponding to Fig. 2c. (c) Immunoblot data corresponding to Fig. 2d. (d) Immunoblot data corresponding to Fig. 3e. (e) Immunoblot data corresponding to Fig. 4a. (f) Immunoblot data corresponding to Fig. 7a. (g) Immunoblot data corresponding to Fig. 10b. Data cropped from the image are cycled in rectangles.

**Supplementary Table 1: List of antibodies used for the flow cytometry analysis.**

Antibody	Clone	Isotype	Source	Dilution
CD27-PE	1A4CD27	Mouse IgG1	Beckman Coulter	7/100
CD19-FITC	J3-119	Mouse IgG1	Beckman Coulter	7/100
CD20-FITC	B9E9	Mouse IgG2a	Beckman Coulter	7/100
CD38-PC5.5	LS198-4-5	Mouse IgG1	Beckman Coulter	3/100
CD138-PE	B-A38	Mouse IgG1	Beckman Coulter	1/11
IgM-FITC	G20-127	Mouse IgG1	BD Biosciences	1/11
IgG-PE	G18-145	Mouse IgG1	BD Biosciences	1/11
STAT5 PY694	47	Mouse IgG1	BD Biosciences	1/11
PAX5	REA140	REA control1	Miltenyi Biotec	1/11
IRF8	REA516	REA control1	Miltenyi Biotec	1/11
IRF4	REA201	REA control1	Miltenyi Biotec	1/11
BLIMP1	IC36081A	Mouse IgG1	R&D Systems	1/11

**Supplementary Table 2: List of TaqMan primers used for QRT-PCR.**

TaqMan Primer	Reference
<i>SOCS2</i>	<i>Hs00919620_m1</i>
<i>CISH</i>	<i>Hs00367082_g1</i>
<i>MAPKAPK3</i>	<i>Hs00177957_m1</i>
<i>IL2RA</i>	<i>Hs00907779_m1</i>
<i>IL2RB</i>	<i>Hs00168402_m1</i>
<i>IL2RG</i>	<i>Hs00953624_m1</i>
<i>IRF8</i>	<i>Hs00175238_m1</i>
<i>BACH2</i>	<i>Hs00222364_m1</i>
<i>XBP1s</i>	<i>Hs03929085_g1</i>
<i>PRDM1</i>	<i>Hs00153357_m1</i>
<i>IRF4</i>	<i>Hs00180031_m1</i>
<i>BCL6</i>	<i>Hs00153368_m1</i>
<i>PAX5</i>	<i>Hs00277134_m1</i>
<i>SPIB</i>	<i>Hs00162150_m1</i>
<i>ELK-1</i>	<i>Hs00901847_m1</i>
<i>MYD88</i>	<i>Hs01573837_g1</i>
<i>CD19</i>	<i>Hs00174333_m1</i>
<i>CD20 (MS4A1)</i>	<i>Hs00544819_m1</i>
<i>CD27</i>	<i>Hs00386811_m1</i>
<i>CD38</i>	<i>Hs01120071_m1</i>
<i>CD138 (SDC1)</i>	<i>Hs00896423_m1</i>
<i>HPRT1</i>	<i>Hs02800695_m1</i>

**Supplementary Table 3: List of antibodies used for western blotting.**

Antibody	Clone	Isotype	Source	Dilution
IRF8	D20D8	Rabbit IgG	Cell Signaling	1/1000
BACH2	Polyclonal	Rabbit	Abcam	1/1000
PAX5	3852-1	Rabbit IgG	Abcam	1/1000
BCL6	EP529Y	Rabbit IgG	Abcam	1/1000
p44/42	137F5	Rabbit IgG	Cell Signaling	1/1000
Phospho-p44/42 (T202/Y204)	D13.14.4E	Rabbit IgG	Cell Signaling	1/1000
ELK-1	E277	Rabbit IgG	Abcam	1/1000
Phospho-ELK-1(S383)	B-4	Mouse IgG	Santa Cruz	1/1000
STAT5	89	IgG2b	Biosciences	1/1000
Phospho-STAT5(PY694)	47	Mouse IgG1	BD Biosciences	1/1000
GAPDH	14C10	Rabbit IgG	Cell Signaling	1/2000
$\beta$ -Actin	AC15	Mouse IgG1	SIGMA	1/2000

**Supplementary Table 4: List of primers used for ChIP-QPCR.**

Gene locus	Forward Sequence (5'->3')	Reverse Sequence (5'->3')
<i>BACH2</i> promoter	GAAAACGCTAGCTAACCCTGG	CATAGCAGGGTGAGAGTAGTGG
<i>BACH2</i> enhancer	ATCCCCAGCACTCTCCCGCG	CAGCGGCCGCGCCGGAATTC
<i>MCL1</i>	AGTCCCCAACTATGCCCTCT	CTCTGTGCTTCCCTGAGACC
<i>MYD88</i>	GCCGAGGCTCTAATTCCTCT	CCCCGCATGTCTGTAATAATC
<i>FOS</i>	GAGCAGTTCCCGTCAATCC	GCATTCGCAGTTCCTGTCT

**Supplementary Table 5: List of siRNAs.**

siRNA	Source	Reference
siELK-1	Thermo Scientific	L-003885-00
siBACH2	Thermo Scientific	L-009787-00
siBCL6	Thermo Scientific	L-011591-01
siPAX5	Thermo Scientific	L-012241-00
siIRF8	Thermo Scientific	L-011699-00
siCTL	Thermo Scientific	D-001810-10

**Supplementary Table 6: List of cloning and sequencing primers used for luciferase reporter construction.**

<b>Fragment Name</b>	<b>Forward Sequence (5'→3')</b>	<b>Reverse Sequence (5'→3')</b>
minP <sub>BACH2</sub> (-725; +146)	GTGGAGCATCTTTTCTTGCCCTT	CTCGCTCGAGAACTTTGCGTCCTTTT
Enh (+1265; +1493)	ATACTCGAGGAGTGAGTGTGTGAAGGGGT	TTTCTCGAGGTCCCTCTCGTTTCCTGGAG
Enh80 (+1265/+1366)	ATACTCGAGGAGTGAGTGTGTGAAGGGGT	CGCGCTCGAGAAGTTACCAAACCTCGCCTACG
Enh115 (+1265/+1381)	ATACTCGAGGAGTGAGTGTGTGAAGGGGT	TTTCTCGAGCCGGAACCTCCCTCAAGTTA
Enh122 (+1388/+1493)	CGGCTCGAGCTGCCGGGGTGGTTTG	TTTCTCGAGGTCCCTCTCGTTTCCTGGAG
Mut-PU1bs	GTAAC TTGAGaaaGTTCCGGCGCG	CAAAC TCGCCTACGCGCG
Mut-ELK1bs	TTGAGGGAAGttttGGCGCGGCGG	GTTACCAAAC TCGCCTACGC

## Perspectives de cette étude

- **Défauts de maturation des plasmocytes générés par le siBACH2**

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons observé que la répression forcée de BACH2, par siRNA, dans les cellules B activées issues de donneurs sains, induit la différenciation en PC en l'absence d'interleukine-2 (Fig2.f du Nature Comm.). Cependant une analyse plus poussée de ces cellules différenciées générées avec le siBACH2 montre un défaut de maturation des PC générés (Figure 1 ci-dessous). Ces PC sont CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>low</sup>, secrètent une grande quantité d'IgM et conservent l'expression de facteurs identitaires B malgré l'expression des facteurs plasmocytaires.

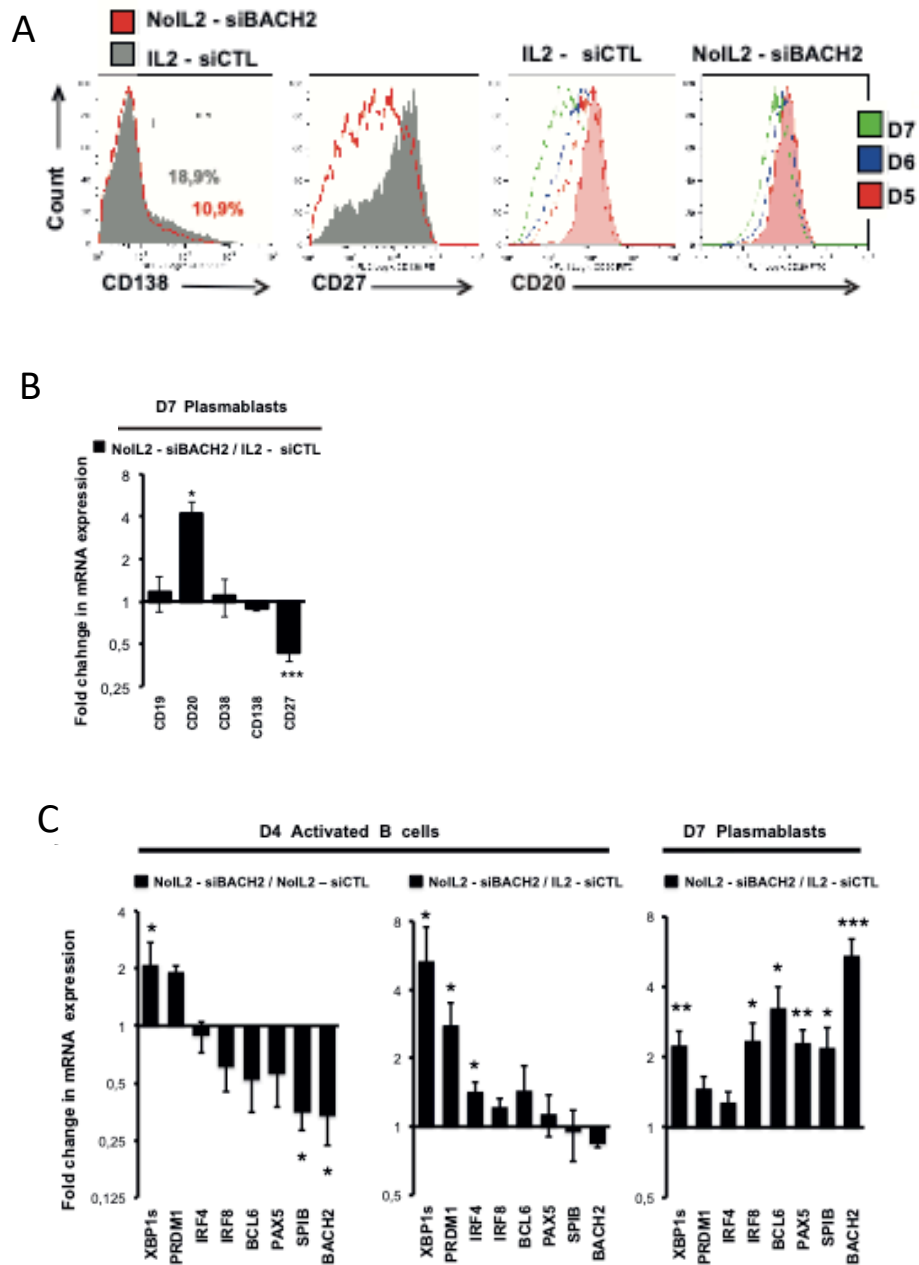
Il semble donc que l'IL-2, au-delà de la régulation de BACH2, soit le garant d'une différenciation plasmocytaire complète. Nous nous sommes donc attachés à caractériser les différences transcriptomiques entre les progéniteurs des plasmocytes générés avec le siBACH2 et ceux générés par l'intégration du signal IL-2 (Figure 2 ci-dessous). Ainsi nous avons identifié que le mécanisme de régulation négative de la voie STAT5 par CISH et SOCS2 mis en place par le priming IL-2 est nécessaire à la maturation plasmocytaire.

Enfin nous avons réalisé l'analyse transcriptomique par RNAseq des cellules différenciées générées par le siBACH2 et des cellules différenciées (CD38<sup>hi</sup>) générées par l'intégration du signal IL-2. L'analyse des gènes différentiellement exprimés entre ses deux conditions (D7 IL-2 siNeg vs D7 siBACH2, 345 gènes log<sub>2</sub>FC > 2 ou < 0.5) sera intégrée avec l'analyse des gènes cibles de BACH2 identifiés par le CHIPseq de BACH2 et dont la répression n'est levée que tardivement dans le processus de différenciation (cf. [Projet 2](#)). L'analyse comparative avec les gènes différentiellement exprimés dans les cellules de patients WM, issues de la moelle ou poussées en différenciation *in vitro* (cf. [Projet 3](#)), permettra d'apporter des arguments pour un éventuel rôle de BACH2 dans le mécanisme avorté de différenciation dans cette pathologie.

### Figure 1. BACH2 transient repression induces aborted plasma cell differentiation

Consistent with the proposed IL-2/BACH2 axis and the temporal regulation of the enhancer activity, the enforced inhibition of BACH2 at D2 was sufficient to trigger PC differentiation without IL-2 input. Next, we asked whether the temporal inhibition of BACH2 was sufficient to induce the whole program of PC differentiation. Only a few plasmablasts emerged from siBACH2 cells at D5. The maximum rate was obtained at D6 and maintained at D7. We thus choose to compare D7 plasmablasts generated by siBACH2 with the IL-2-driven plasmablasts (Figure 1A). Transient inhibition of *BACH2* was able to drive a small percentage of B cells up to the PC stage indicated by CD138 expression (9% +/-1.2; n=5). However, CD27 upregulation was altered in siBACH2-driven plasmablasts, and expression of the B-cell marker CD20 was not extinguished with time suggesting a defect in completing the terminal PC differentiation program. These results were confirmed at the mRNA levels by comparing expression of these B-cell fate markers in the sorted CD38<sup>hi</sup> cells (Figure 1B). QRT-PCR analysis demonstrated a fourfold increase in *CD20* expression and more than a twofold reduction in *CD27* expression compared to IL-2 driven plasmablasts. In contrast, *CD38* and *CD138* PC-genes expression mimicked that of control plasmablasts.

To further understand the mechanism by which BACH2 dynamic expression governed the gene regulatory network involved in PC differentiation we profiled D4 cells and D7 plasmablasts for main transcription factor expression (Figure 1C). At D4, marked overexpression of PC transcription factors *PRDM1* and *XBP1s* was observed in BACH2-deficient cells compared to both no IL-2 and IL-2-primed cells. Meanwhile B-cell transcription factors recapitulated the level of expression in IL-2-primed cells (Figure 1C, left and middle panels). The significant *SPIB* repression observed in siBACH2 cells compared to uncommitted cells may result from the unimpeded BLIMP1 expression. In contrast, in siBACH2-driven plasmablasts, a two- to sixfold overexpression of the B-cell transcription factors was observed (Figure 1C, right panel). Meanwhile PC transcription factors were expressed at normal to slightly higher levels. *BACH2* was one of the B-cell specific transcription factors whose expression was the most highly overexpressed in differentiated cells driven by siBACH2. Thus siRNA-mediated *BACH2* inhibition was restricted to only a few days during B-cell activation. Collectively these results suggest a mechanism similar to a “hit and run” scenario where BACH2 repression at a crucial time point of early B-cell activation is sufficient to commit the cells towards PC differentiation, however cells developed through incomplete differentiation as plasmablasts expressed both B-cell and PC markers while secreting high amount of IgM.



**Figure 1. Inhibition of BACH2 expression induces aborted plasma cell differentiation**

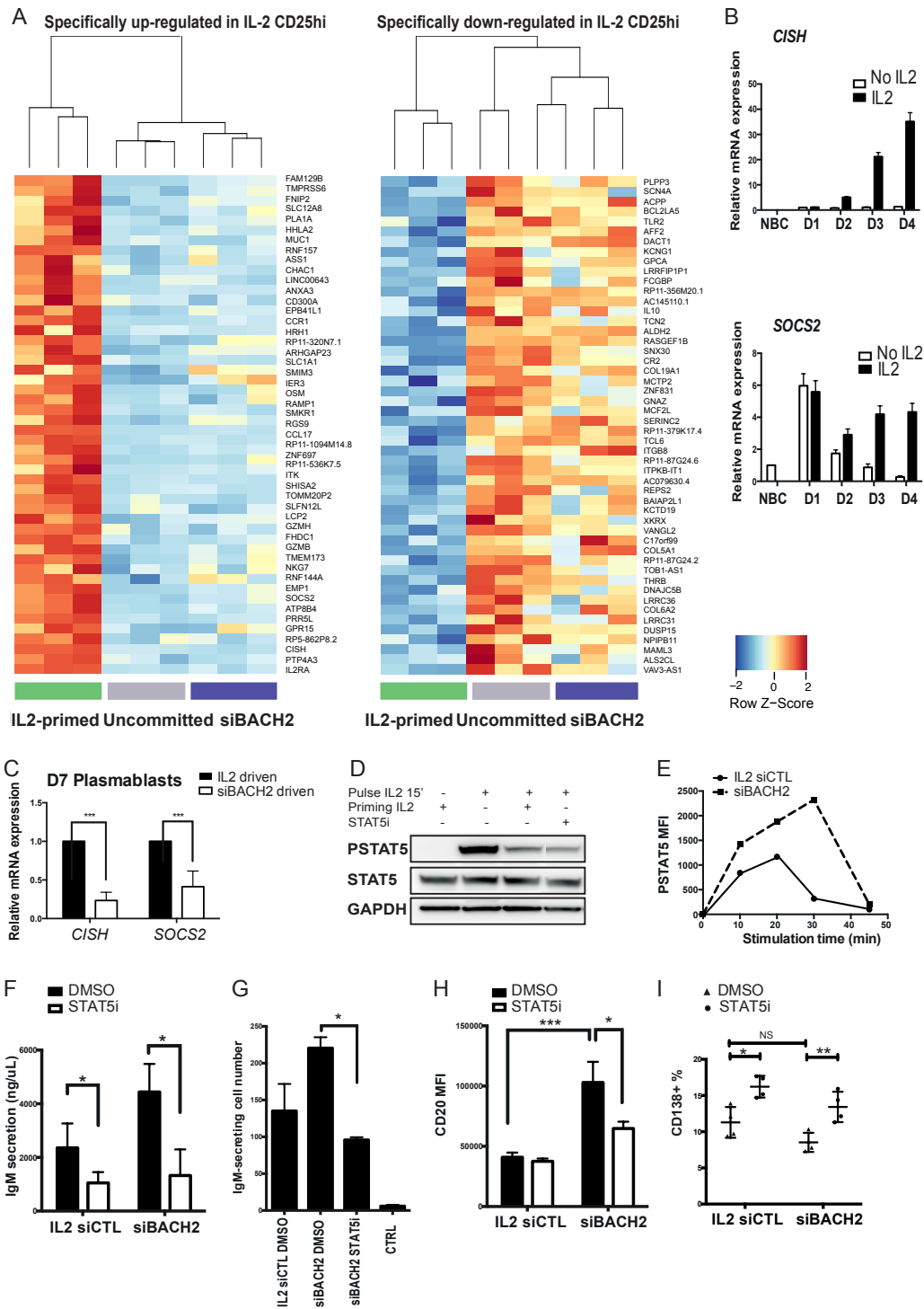
- A. Expression of the PC markers (CD27 & CD138) at D7 and dynamic expression of the CD20 B-cell marker within the differentiated CD38<sup>hi</sup> compartment analyzed by flow cytometry generated from IL-2 primed NBCs (IL2 - siCTL) or NBCs deficient for BACH2 (NoIL2 – siBACH2). A representative experiment from 4 independent experiments is shown.
- B. Gene expression levels of B cell and PC markers analyzed by QRT-PCR in D7-cell sorted plasmablasts (CD38<sup>hi</sup> cells) generated from NBCs deficient for BACH2 (NoIL2 – siBACH2). Data are normalized to the expression in the control cells generated from IL-2-primed NBCs (IL2 - siCTL). Significant differences compared to the control cells are shown, n>3, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001
- C. Gene expression levels of B and PC transcription factors analyzed in D4-activated B cells and D7 plasmablasts (CD38<sup>hi</sup> cell sorted population) generated from BACH2 deficient NBCs (NoIL2 – siBACH2). Data presented are fold change in gene expression levels compared to the non-targeting siRNA electroporated cells (siCTL) that were not primed with IL-2 (left panel) or primed with IL-2 (the 2 right panels). Significant differences are shown, n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005.



## Figure 2. IL-2 initiates a distinct transcriptional program beyond BACH2, required for PC maturation

Although IL-2 and siBACH2-committed populations shared gene expression program sufficient for PC fate commitment, genes whose expression was selective for IL-2 signature were also of interest as cells transiently repressed for BACH2 developed an incomplete program of PC differentiation. We thus focused our analysis on the unique molecular signature that distinguished the IL-2-committed cells from siBACH2-committed cells (Figure 2.A). As expected, increase in gene expression related to JAK/STAT5 signaling such as *IL2RA* (CD25) and ERK signaling such as *MAPKAPK3* was observed. Genes including *AICDA* (AID), *CXCR4*, *ELL2*, *IRF4* required for GC development, organization and function, were found up-regulated, while the B-cell transcription factors *IRF8* was down-regulated. Among the top-10 list of genes that achieved the highest fold change we identified *CISH* (CIS) and *SOCS2* that are part of the suppressors of cytokine signaling (SOCS) and thus important players of the feedback loop mechanism to inhibit the JAK/STAT5 signaling pathway. Previously, CIS has been shown to interact with IL2RB for its degradation<sup>65-67</sup> and SOCS2 has been involved in T cell-dependent differentiation of mouse B cells<sup>68</sup>. Expression of these two genes was further studied by QRT-PCR from D0 to D4 in presence or absence of IL-2, demonstrating IL-2-dependent *CISH* and *SOCS2* upregulation between D2 and D4 (Figure 2B). Both of them were still significantly up-regulated at D7 in plasmablasts generated from T cell-dependent activation compared with the siBACH2 condition (Figure 2C). Therefore we hypothesized that CIS and SOCS2 might play a role in the completion of the PC differentiation program or the control of Ig secretion by repressing the STAT5 pathway. Indeed, STAT5 activation has been involved in B cell differentiation<sup>69</sup> as well as in Ig hyper-secretion in pathological condition<sup>70</sup>. We demonstrated a reduced STAT5 activation in D4 IL-2-primed cells in comparison with cells stimulated with IL-2 for the first time (Figure 2D); a result that cannot account for the expression level of IL-2 receptors as we have shown earlier the upregulation of the high affinity IL-2 receptor in IL-2-primed committed cells. We next assessed STAT5 activation by phospho-flow cytometry to compare IL-2 responses in D4 siBACH2-committed cells with the control IL-2-primed cells. In agreement with previous results, siBACH2-committed cells responded much more efficiently to IL-2-induced STAT5 activation suggesting an effective feedback regulatory loop in IL-2-primed cells that tempers STAT5 pathway (Figure 2E). We therefore explored the relationship between STAT5 activity and PC maturation during the terminal differentiation step (from D4 to D7). We partially inhibited STAT5 activation with a chemical inhibitor (STAT5i) to get a response similar to the one for IL-2-primed cells (Figure 2D). Under this condition the capacity of both IL-2 and siBACH2-driven plasmablasts to secrete IgM decreased significantly (Figure 2F, G), in agreement with a role of STAT5 in the regulation of Ig secretion<sup>70</sup>. In addition, by restricting STAT5 response in siBACH2-generated plasmablasts, the expression of the B-cell marker CD20 declined (Figure 2H), while the propensity to generate mature CD138<sup>+</sup> PCs increased (Figure 2I). These results demonstrated that STAT5 pathway restriction by CIS and SOCS2 feedback loop contributes to PC maturation.

Collectively these results imply that BACH2 repression must be precisely orchestrated by T-cell cytokines that coordinate ERK and STAT5 activation and regulation, to initiate and control the transition and progression from early activated-NBCs to PCs.



**Figure 2. IL-2 priming induces a specific transcriptional program that encompasses SOCS feedback loop mechanism to temper STAT5 signaling and favor PC maturation**

- Expression profile of the top-50 differentially expressed genes specifically in D4 IL2 CD25<sup>hi</sup> cells (IL2-primed) compared with control cells (uncommitted) and siBACH2 electroporated cells.
- Temporal expression of *CISH* and *SOCS2* during NBCs activation in the presence (IL2) or absence of IL-2 (NoIL2) studied by QRT-PCR. One representative experiment is shown.
- Relative expression of *CISH* and *SOCS2* expression in D7 sorted plasmablasts generated through BACH2 inhibition (siBACH2 driven) in comparison with those generated with IL-2 priming (means +/- SEM, n=4, p<0.001).

- D. Western-blot analysis of STAT5 phosphorylation (PSTAT5) in response to IL-2 stimulation (15 min pulse) in D4-activated B cells that were primed with IL-2 at D2 or not, and in the presence of STAT5 inhibitor (STAT5i). GAPDH was used as loading control.
- E. Dynamic of PSTAT5 response to IL-2 stimulation at D4 by IL-2-primed cells (IL2 siCTL) and BACH2 deficient cells (siBACH2) determined by phosphoflow cytometry analysis. Average MFI of two experiments were normalized to starved cells.
- F. Immunoglobulin M secretion by sorted CD38<sup>hi</sup> cells at D6 that were treated with STAT5 inhibitor (STAT5i) or the diluent (DMSO) and measured by ELISA in D7 supernatants (means +/- SEM; n=3; p<0.05).
- G. Quantification of IgM secreting CD38<sup>hi</sup> cells by ELISPOT at D7. One experiment is shown.
- H. Assessment of CD20 expression by flow cytometry in CD38<sup>hi</sup> cells at D7 generated from NBCs deficient fro BACH2 (NoIL2 – siBACH2) or cells that were primed with IL-2 (IL2 – siCTL). Means +/- SEM of three independent experiments. Significant differences are shown, \*p<0.05, \*\*\*p< 0.001.
- I. Percentage of CD138 positive PC at D7 within CD38<sup>hi</sup> cells generated in the presence of STAT5 inhibitor (STAT5i) or the diluent (DMSO) added at D4 (n=4; \*p<0.05 \*\*p<0.01).

## Projet 2 : Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices

Nicolas Hipp, Laurent Deleurme, Céline Monvoisin, Karin Tarte, Thierry Fest, Céline Delaloy

---

### Contexte de l'étude :

La différenciation plasmocytaire est régie par un réseau de gènes identitaires. Les techniques d'étude de l'expression génique à bas débit ont souvent restreint l'analyse de l'identité cellulaire B à une dizaine de facteurs de transcription. Le génome humain étant composé de plus de 20 000 gènes codants et près de 22 000 gènes non codants (GRCh38.p12) il devient nécessaire de mieux caractériser les sous-populations lymphocytaires grâce à des approches à haut débit. Bien qu'une cartographie de sous-populations lymphocytaires B par RNAseq ait été effectuée chez la souris <sup>376</sup>, la contrepartie chez l'homme est manquante. Nous avons utilisé notre modèle *in vitro* afin de générer une cartographie des stades transitoires de la différenciation plasmocytaire humaine. Afin d'avoir une vision dynamique de ce processus, nous avons réalisé des séquençages du transcriptome des sous-populations contenant les progéniteurs des cellules différenciées triés à différents temps de culture. Une approche populationnelle (méthode de référence) et une approche sur cellule unique nous permet d'avoir accès à la dynamique d'expression des gènes au cours de la différenciation *in vitro*. Cette base de connaissance nous servira pour mieux comprendre le processus de différenciation plasmocytaire, identifier des candidats impliqués dans la régulation du processus de différenciation, et pour comprendre la différenciation avortée retrouvée dans la pathologie de Waldenström (voir [Projet 3](#)).

L'étude de l'expression génique de cellules uniques est une technique apparue dans les années 1990<sup>377</sup>. Dans ces premières études, les cellules étaient isolées manuellement et l'étude de l'expression était restreinte à quelques gènes cibles bien définis. La nécessité d'augmenter le nombre de transcrits détectés a engendré l'émergence de nouvelles méthodes applicables à l'étude de l'expression génique à haut débit sur cellules uniques: puce d'expression en 2006<sup>378</sup>, puis séquençage du transcriptome en 2009<sup>379</sup>. Afin de monitorer

l'expression génique par séquençage, différentes chimies ont été mises au point pour générer les bibliothèques. Les premières études séquençaient toute la longueur du transcrite permettant d'avoir accès, en plus du niveau d'expression, aux événements d'épissage alternatif. Cette technologie nécessitant une profondeur de séquençage importante, 100 000 - 4 000 000 reads par cellule selon les études, les coûts liés au séquençage d'un grand nombre de cellules sont très importants. Pour pallier à cette limite, une chimie et un séquençage permettant de monitorer uniquement une extrémité de l'ADNc ont été mis en place. Contrairement à la stratégie précédente, cette technologie permet de générer des tables de comptes des transcrits capturés, à partir d'un nombre de reads par cellule beaucoup plus faible mais suffisant pour couvrir entièrement la bibliothèque générée. Ces améliorations techniques ont été suivies d'une augmentation du débit d'isolement des cellules, passant d'un isolement par tri cellulaire (fonction autoclone de la technologie de cytométrie en flux) à des automates permettant d'isoler un nombre croissant de cellules (de 96 cellules en 8h en 2013 avec l'automate C1 proposé par Fluidigm, à près de près de 300 000 cellules en 8 minutes de nos jours avec le système Chromium de 10X Genomics basé sur la technologie d'émulsion GemCode).

Ces avancées technologiques rapides représentent un challenge important pour l'évolution des méthodes d'analyses des données générées. En effet, bien que les protocoles d'analyses soient maintenant robustes pour des analyses populationnelles, l'étude de l'expression génique sur cellule unique est conditionnée par de nombreux paramètres à prendre en compte.

Dans un premier temps, il est facilement compréhensible que la quantité d'ARN présente dans une cellule unique est bien plus faible que la quantité d'ARN extraite à partir d'une population de cellules. La génération des bibliothèques de séquençage nécessitant des étapes d'amplification par PCR des cDNA générés, l'amplification préférentielle d'un transcrite dans une bibliothèque peu diverse en ARN est plus probable. Ainsi, cela a entraîné un biais dans l'analyse des premières études, étant donné que la sur-amplification de certaines molécules n'était pas distinguable d'une expression forte de ce gène.

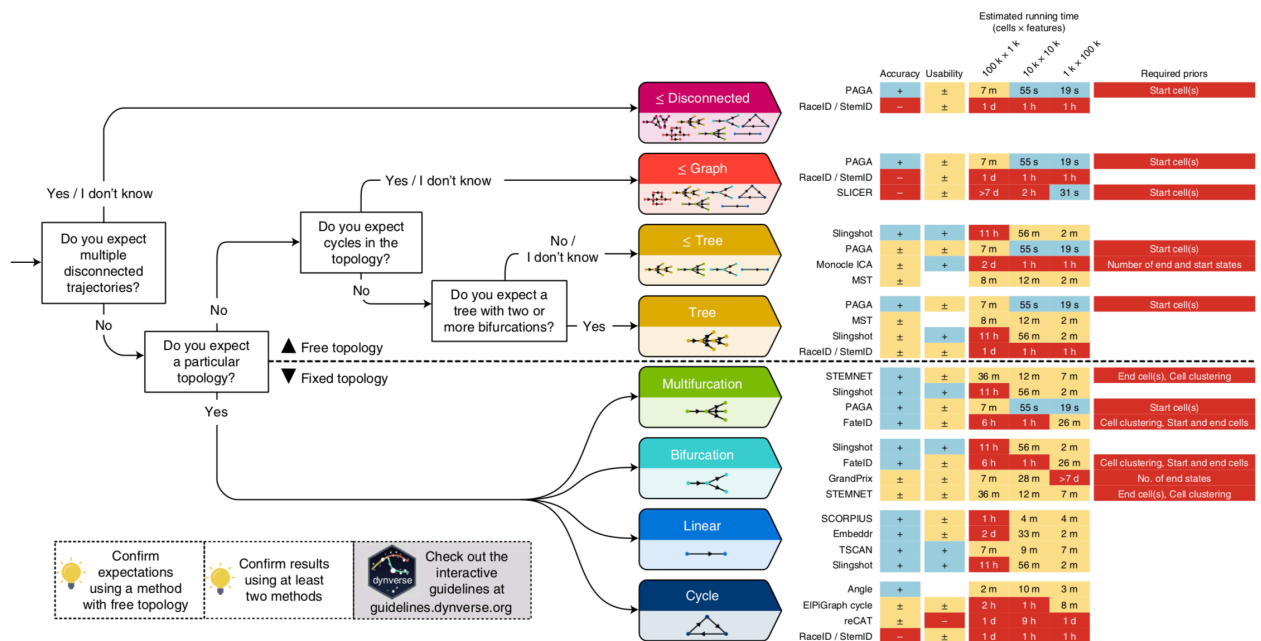
Cette limite a rapidement été corrigée grâce à l'utilisation de petites molécules permettant de marquer de manière unique chaque cDNA au début de la génération de la bibliothèque (Unique Molecular Identifier UMI). Ainsi, si l'UMI est retrouvé plus d'une fois, c'est qu'il est issu d'une

amplification. Cette méthode permet d'éliminer facilement les duplicats de PCR et donc d'avoir un compte des transcrits beaucoup plus fiable.

Dans un second temps, certaines méthodes d'analyse de référence, utilisées dans des approches populationnelles, ont dues être adaptées à la taille des échantillons (nombre de cellules). L'hétérogénéité cellulaire au sein d'un échantillon entraîne un moyennage de l'expression génique à l'échelle populationnelle. C'est la mise en évidence de cette hétérogénéité cellulaire qui est recherchée dans les approches sur cellules uniques. Cela a donc nécessité l'utilisation de méthodes de visualisation permettant de créer des regroupements de cellules partageant un profil d'expression commun au sein de la population. Parmi ces méthodes, il existe des méthodes d'analyse linéaire comme l'analyse en composante principale. Cette méthode permet de réduire dans un espace factoriel de faible dimension (généralement 2, 3 composantes principales) une grande partie de la variance globale du jeu de données. Dans le cas de l'analyse de l'expression génique, cette variance correspond aux variations de l'expression génique de chacun des gènes. Ainsi, cela permet de représenter facilement les cellules proches sur la base de leurs profils d'expression. Malgré cela, cette visualisation représente qu'une partie de la variance présente dans le jeu de données. En effet, l'utilisation de 2 voir 3 composantes principales ne prend pas en compte la variance représentée par les composantes principales suivantes. Pour pallier à cela, des représentations non-linéaires (tSNE<sup>380</sup>, DDRTree<sup>381</sup> par exemple) ont été développées. Elles permettent de réduire, dans un faible nombre de dimensions (2 par exemple), un plus grand nombre de composantes principales. Ainsi, de nombreux algorithmes permettent de classifier les sous-types de cellules ayant des profils d'expression similaires au sein d'une population, dans des espaces de visualisation de faible complexité. Dans le cadre des processus de différenciation cellulaire, la réduction des dimensions grâce à l'algorithme DDRTree permet de trouver le chemin le plus court permettant de connecter l'ensemble des échantillons dans un espace factoriel linéaire.

Les algorithmes permettant d'inférer des trajectoires à partir d'un jeu de données omiques de plusieurs milliers de cellules uniques sont très nombreux (>70). Une étude publiée récemment dans *Nature Biotechnology*<sup>382</sup> évalue la capacité d'ordonner les cellules en fonction de la topologie de la trajectoire, la flexibilité et la complémentarité de 45 méthodes testées, permettant d'adapter le choix de l'algorithme en fonction du jeu de données. Afin de

choisir l’algorithme le plus adapté, les auteurs de cette étude ont réalisé l’arbre de décision ci-dessous qui met en avant l'importance de la topologie de la trajectoire sur la performance de la méthode.



**Comparatif des méthodes d'inférence de trajectoires cellulaires.** Saelens et al. démontrent que la performance d'une méthode dépend énormément de la topologie de la trajectoire. Le choix de la méthode dépendra donc de la connaissance ou des hypothèses formulées sur la topologie de la trajectoire attendue. Les méthodes sont classées à droite en fonction de leur performance pour une topologie donnée. Les auteurs évaluent l'exactitude des méthodes testées sur un même jeu de données, la facilité d'utilisation de ces méthodes, les temps d'analyses et les informations requises en amont de l'analyse. (Figure extraite de Saelens et al. Nature Biotechnology 2019).

Ainsi, le choix de l’algorithme va dans une grande majorité des cas nécessiter des connaissances biologiques du processus étudié, comme par exemple la présence de deux trajectoires de différenciation dans un même jeu de données, les caractéristiques d’une trajectoire comme la présence de voies de bifurcation, le caractère cyclique du processus... Certains algorithmes imposeront aussi la nécessité de connaître le point de départ et le point d’arrivée de la trajectoire, ou bien encore un nombre limité de cellules pour pouvoir fonctionner.

## Matériel et méthodes

### Culture cellulaire

En fonction des études, les LB ont été obtenus à partir de concentrés leuco-plaquettaires (EFS Bretagne) ou d'amygdales provenant de la clinique La Sagesse Rennes ou de moelle osseuse provenant du CHU Pontchaillou. Les lymphocytes B naïfs ont été isolés par déplétion négative (Miltenyi Naive B cell isolation kit + anti-CD10). Par la suite les cellules ont été triées sur la base de l'exclusion du Mitotracker (Thermofisher). Les LB ont été marqués au CellTrace Violet (Thermofisher) ou au Carboxyfluorescein succinimidyl ester afin de suivre la prolifération des cellules. Le protocole de différenciation *in vitro* est identique à celui utilisé dans la première étude. Les LB naïfs ont été cultivés pendant 4 jours en milieu constitué de RPMI (Invitrogen), 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest), ainsi que de 1% de Pénicilline et Streptomycine (Invitrogen). Ce milieu a été complété d'anticorps anti-BCR (2,4µg/mL) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), de CD40L (50ng/mL) (R&D systems) et de CpG (5µg/mL) (Invivogen) et avec de l'IL-2 (50U/mL) (Proleukin). Au 4ème jour de la culture, les cellules ont été lavées (2 lavages au tampon phosphate salin (PBS 1X Lonza)) et remises en culture (0.4 millions/mL) dans un milieu contenant de l'IL-2 (50U/mL), de l'IL-4 (5ng/mL), et de l'IL-10 (10ng/mL) (R&D Systems).

### Tri Cellulaire :

Les populations cellulaires enrichies en progéniteurs des plasmablastes à J7 ont été triées à différents temps de la différenciation. J0 (Mitotracker – 100nM Thermofisher), J2FSC<sup>hi</sup> Hoescht<sup>-</sup> / FSC<sup>hi</sup> Hoescht<sup>+</sup>, J3 (CFSE<sup>low</sup>), J4 (CFSE<sup>low</sup> CD25<sup>hi</sup>), J5 (CFSE<sup>Low</sup> CD38<sup>hi</sup>) J7 (CFSE<sup>low</sup> CD38<sup>hi</sup> CD138<sup>-</sup> / CFSE<sup>Low</sup> CD38<sup>hi</sup> CD138<sup>+</sup>). Les plasmablastes d'amygdales ont été isolés suite à une étape d'enrichissement cellulaire à l'aide du Pan B cell isolation kit (Miltenyi) suivi d'un tri au FACs sur la base du CD38<sup>hi</sup>. Le même protocole a été utilisé pour les plasmocytes de moelle (étape d'enrichissement Pan B cell isolation kit Miltenyi, suivi d'un tri CD38<sup>hi</sup>).

### RNAsequencing

Dans le cadre de l'analyse populationnelle, l'ARN a été extrait (Nucleospin RNA XS Macherey Nagel). Les bibliothèques ont été réalisées grâce au kit TruSeq Stranded (Illumina) en suivant les



recommandations de la compagnie. Dans le cadre de l'analyse sur cellule unique, les cellules ont été isolées grâce au C1 (Fluidigm) et les librairies ont été réalisées en utilisant le kit « SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA » (Takara) en suivant les recommandations de la compagnie. Les librairies ont été séquencées en 2X75pb sur Hiseq4000 (CNRGH-Evry).

### **Analyses bioinformatiques**

Après vérifications des séquences (FastQC-0.11.7-MultiQC-1.4.dev), elles ont été nettoyées (Trimmomatic-0.33/BBMap\_38.05) puis alignées sur Hg38 (Annotation GRCh38.91) grâce à l'aligneur STAR (2.5.3a). Les tables de compte ont été générées grâce à featureCounts (subread-1.6.0). La fréquence des clones représentée dans l'approche populationnelle a été estimée grâce à MiXCR<sup>383</sup> (v2.1.10) suivant les recommandations d'utilisation. Le détail des versions des packages utilisés sous R sont disponibles à la fin de ce manuscrit. L'enrichissement des voies de signalisation, tout comme la prévision des régulateurs de l'expression des gènes ont été réalisés à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway (Qiagen). Concernant l'analyse des données d'expression génique sur cellule unique, le package Seurat a été utilisé pour filtrer les données. Les cellules exprimant moins de 1000 gènes et dont les reads mitochondriaux représentent plus de 20% de la librairie ont été éliminées de l'analyse. Les gènes exprimés dans moins de 3 cellules, et dont la moyenne d'expression sur l'ensemble du jeu de données n'a pas été détectée à hauteur de 20 reads ont été éliminés. Ces données filtrées ont par la suite été utilisées pour établir la trajectoire sous monocle V2. Pour cela, les gènes ayant servi à établir la trajectoire ont été déterminés grâce à la méthode « Dpfeature » en comparant les gènes différemment exprimés entre les clusters déterminés grâce à la réduction des 7 dimensions de PCA (déterminée visuellement lorsque la variance expliquée par l'ajout de la dimension suivante n'apporte plus d'explication importante de la variance). Les 2000 gènes ayant la p-value ajustée la plus faible ont été sélectionnés pour établir la trajectoire. La réduction finale du jeu de données permettant d'inférer la trajectoire a été réalisée grâce à l'algorithme « DDRTree ».

## Résultats

### **La différenciation plasmocytaire correspond à un remodelage important du transcriptome.**

La réponse des LB aux signaux d'activation et de différenciation est un processus hétérogène, y compris dans notre modèle contrôlé de différenciation plasmocytaire *in vitro* décrit dans nos études précédentes puisque seule une petite fraction de cellules atteint le stade PC<sup>133,162</sup>. Ici nous avons suivi la dynamique du processus de différenciation *in vitro* de LB naïfs issus de 3 donneurs sains de l'EFS. Pour cela, nous avons trié différentes sous-populations lymphocytaires B contenant les progéniteurs des PC à différents temps de culture, puis nous les avons remis en culture pour évaluer leurs capacités de différenciation et confirmer l'enrichissement en cellules ayant intégré les signaux de différenciation (données non montrées).

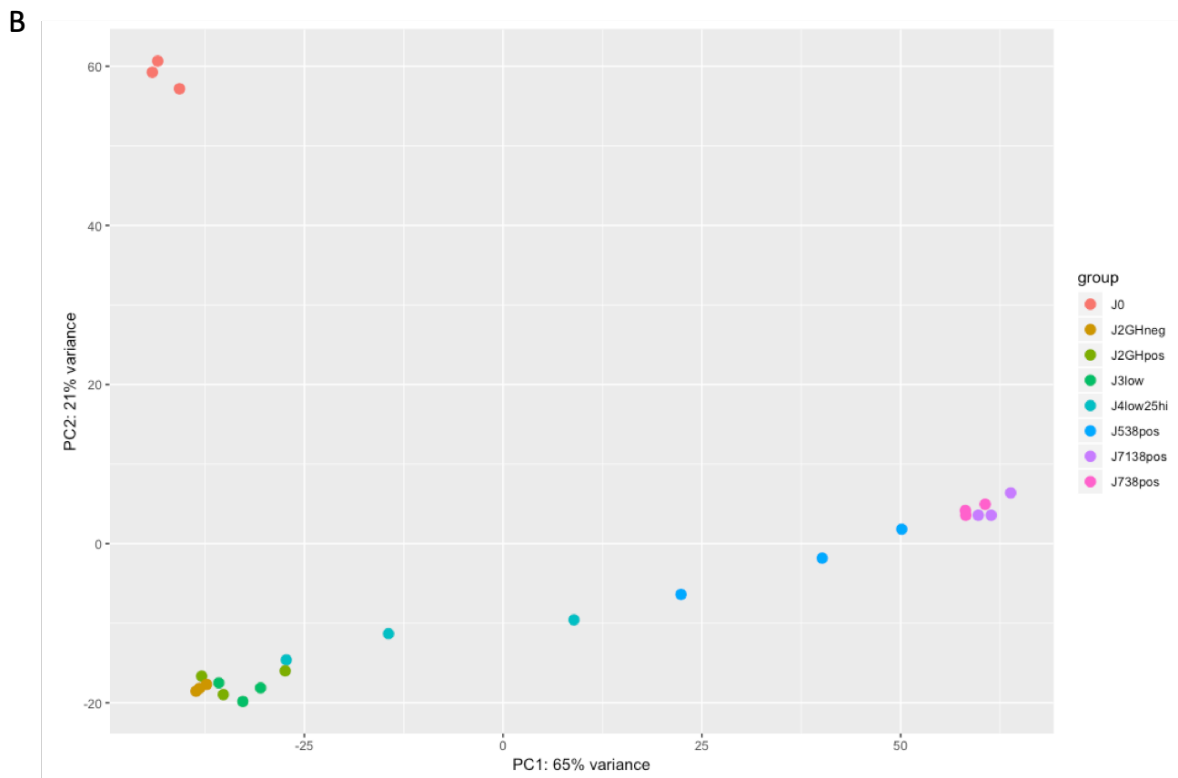
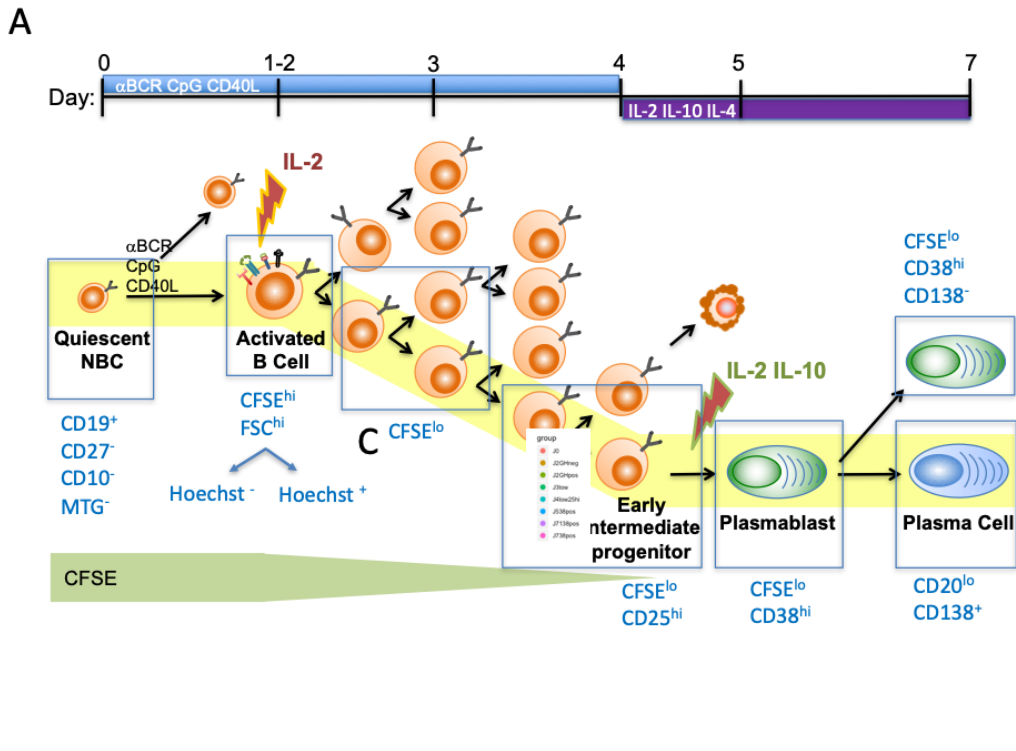
A J0, les cellules B naïves sont triées sur la base du Mitotracker (MioTracker Green MTG) après purification des LB CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Nous avons dans un premier temps mis en évidence que l'expression de l'IgM membranaire sur ces LB était hétérogène. Cela ne représente pas pour autant un avantage compétitif entre les cellules pour la différenciation. En effet lors du tri des IgM<sup>hi</sup> et des IgM<sup>low</sup>, les deux populations se différencient au même ratio (données non montrées). N'ayant pas mis en évidence d'autres marqueurs extra-cellulaires permettant de trier une sous population de LB naïfs plus enclin à se différencier, nous avons séquencé l'ensemble des MTG<sup>-</sup>. Dans un second temps, la prolifération étant nécessaire à la différenciation plasmocytaire, nous avons trié à J2 les cellules activées (FSC<sup>hi</sup>) en fonction du cycle (marquage Hoechst), et à J3 les cellules ayant effectuées au moins une division (VDP<sup>low</sup> ou CFSE<sup>low</sup>). Ces cellules remises en culture génèrent plus de plasmablastes que les cellules totales, démontrant l'enrichissement en cellules possédant un potentiel de différenciation et confirmant des données publiées montrant que la taille des LB activés et leur capacité à entrer en cycle précocement détermine leur devenir plasmocytaire<sup>384,385,386</sup>. Comme mis en évidence dans notre étude précédente<sup>162</sup>, les cellules CFSE<sup>low</sup> CD25<sup>hi</sup> à J4 contiennent les progéniteurs des plasmablastes. Enfin, nous avons trié différentes populations de cellules différenciées à J5 CFSE<sup>low</sup>CD38<sup>hi</sup> et J7 CFSE<sup>low</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>-</sup> / CFSE<sup>low</sup>CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>+</sup> représentant différents stades de maturation des plasmablastes (Figure 1.A). Lors de l'analyse du transcriptome de ces sous-populations, nous avons mis en évidence que de nombreux changements

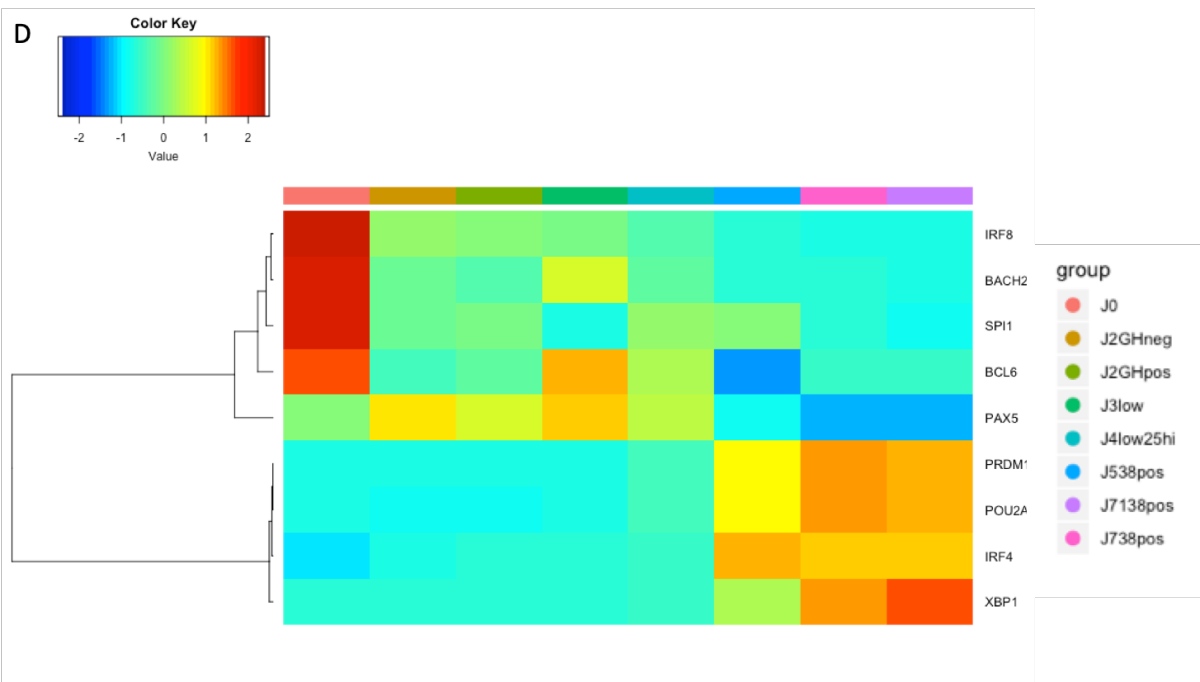
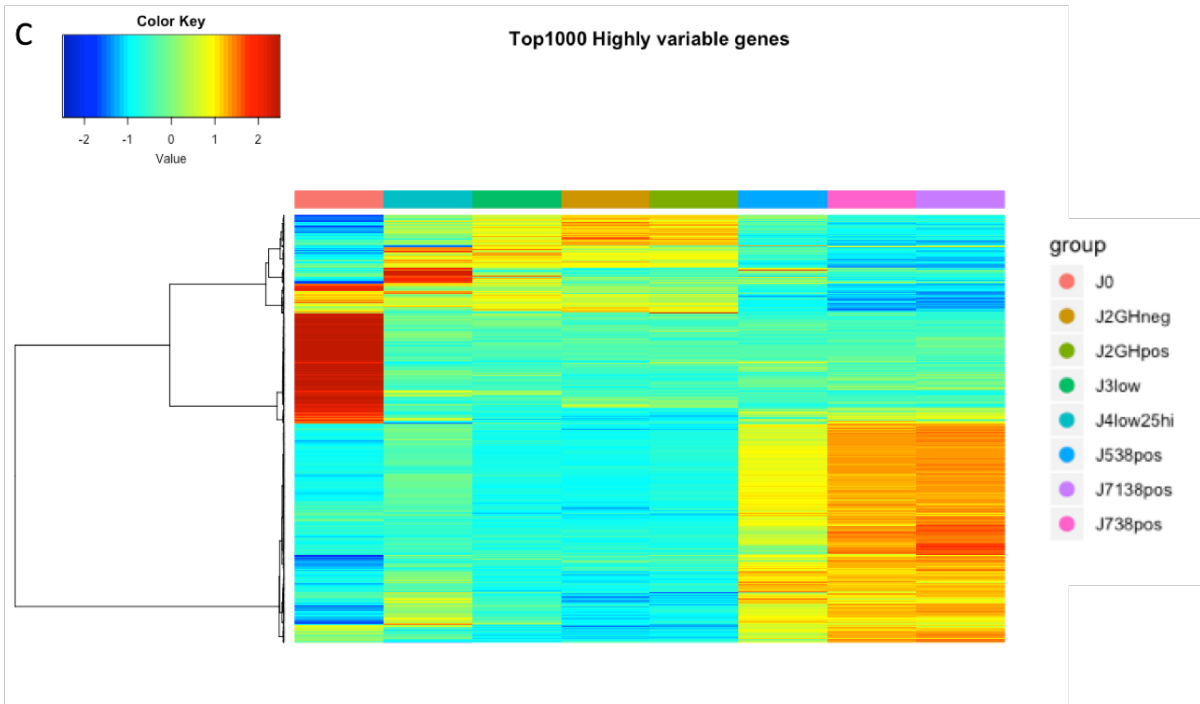
transcriptomiques s'effectuent au cours de cette différenciation. L'activation des cellules sépare les cellules naïves des cellules activées (J2/J3) grâce à l'axe 2 qui représente 21% de la variance totale de l'analyse en composante principale effectuée sur les 500 gènes les plus variables (Deseq2 ; Figure 1.B). Ensuite, on observe une différenciation des cellules le long de l'axe 1 représentant 65% de la variance totale. De manière intéressante, bien que les échantillons à J2/J3 et pour les 3 donneurs sains soient regroupés ensemble, l'avancement dans la différenciation (J3/J4/J5) est très variable d'un donneur à l'autre, en effet un continuum dans la répartition des échantillons est visible le long de l'axe 1 pour ces temps de culture reflétant le caractère asynchrone de la culture et le moyennage de l'expression dans cette approche populationnelle.

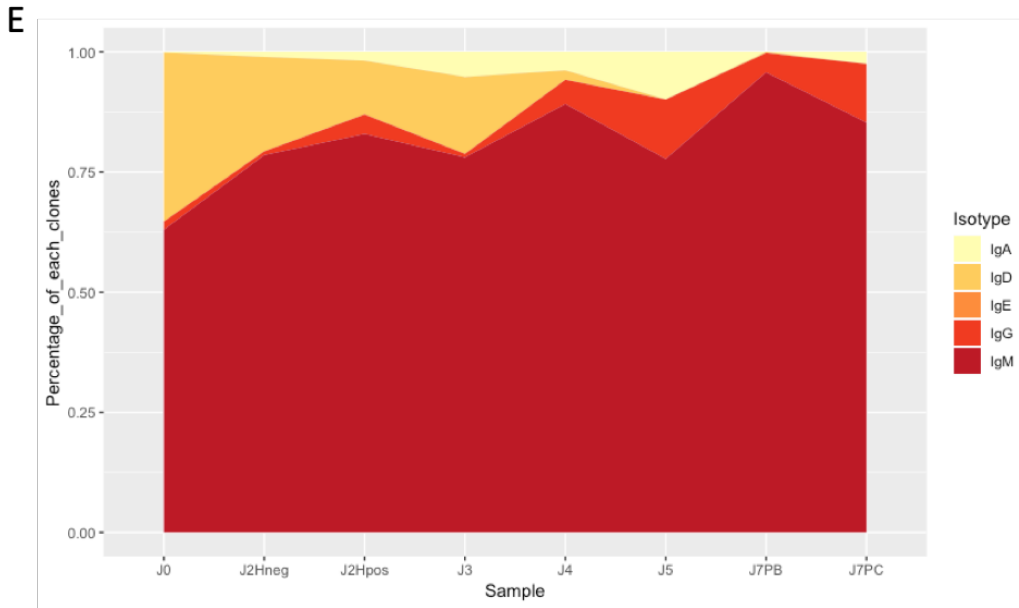
Cette différenciation est caractérisée par de nombreux changements transcriptomiques survenant tout au long du processus. Sur la carte de chaleur des 1000 gènes les plus différentiellement exprimés au cours du processus de différenciation, les échantillons s'ordonnent selon leur temps passé en culture indiquant un continuum de différenciation (Figure 1C). De plus, le modèle de différenciation *in vitro* résume bien les variations des facteurs de transcription décrits pour gouverner la différenciation avec l'extinction progressive des gènes identitaires B et l'expression des gènes plasmocytaires dès le stade plasmablastique (J5 CD38<sup>hi</sup>, Figure 1.D).

Comme décrit précédemment, la commutation de classe vers la production d'IgG et d'IgA se produit dans ce modèle de différenciation, même si une grande partie des cellules analysées conservent l'expression de l'IgM (Figure 1.E).

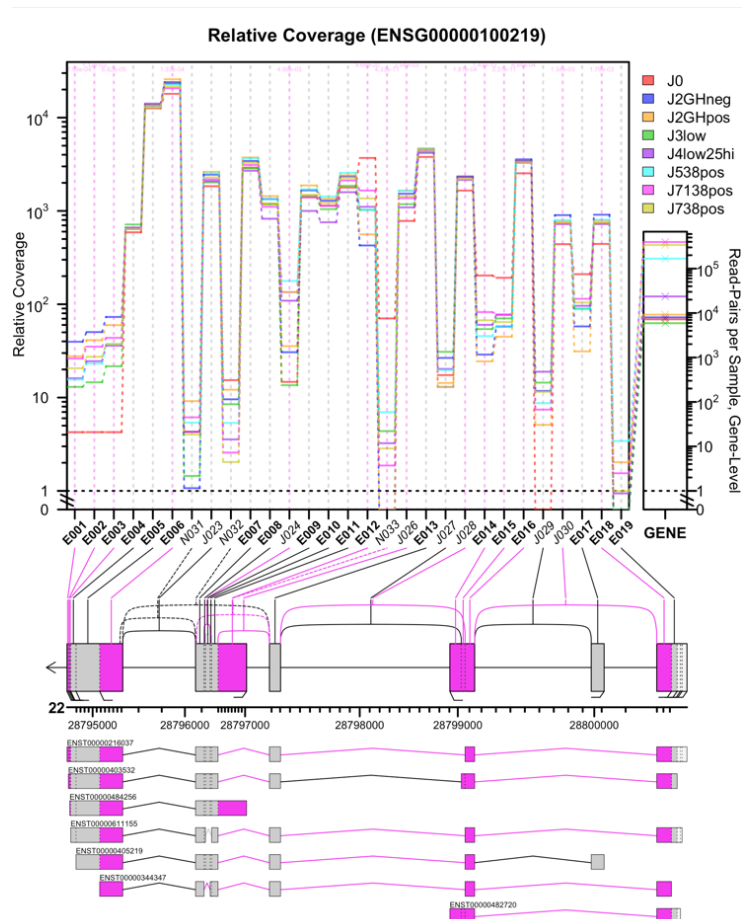
Ces données nous ont aussi permis d'évaluer les événements d'épissages alternatifs produits au cours de la différenciation à l'aide du package R JunctionSeq. Comme décrit dans de nombreuses études, la différenciation terminale est caractérisée par la production d'une forme fonctionnelle, épissée, de XBP1 (XBP1s) facilitant le bon fonctionnement du réticulum endoplasmique lors de la sécrétion massive d'Ig par la cellule différenciée. L'utilisation de la jonction J024 permettant l'épissage alternatif de *XBP1* est utilisée par les cellules différenciées. (Figure 1F, 1G). Ainsi, nous disposons de l'analyse de l'expression différentielle des transcrits de l'ensemble des gènes exprimés au cours du processus de différenciation ce qui permettra d'évaluer l'importance de ces modifications post-transcriptionnelles dans de futurs projets.

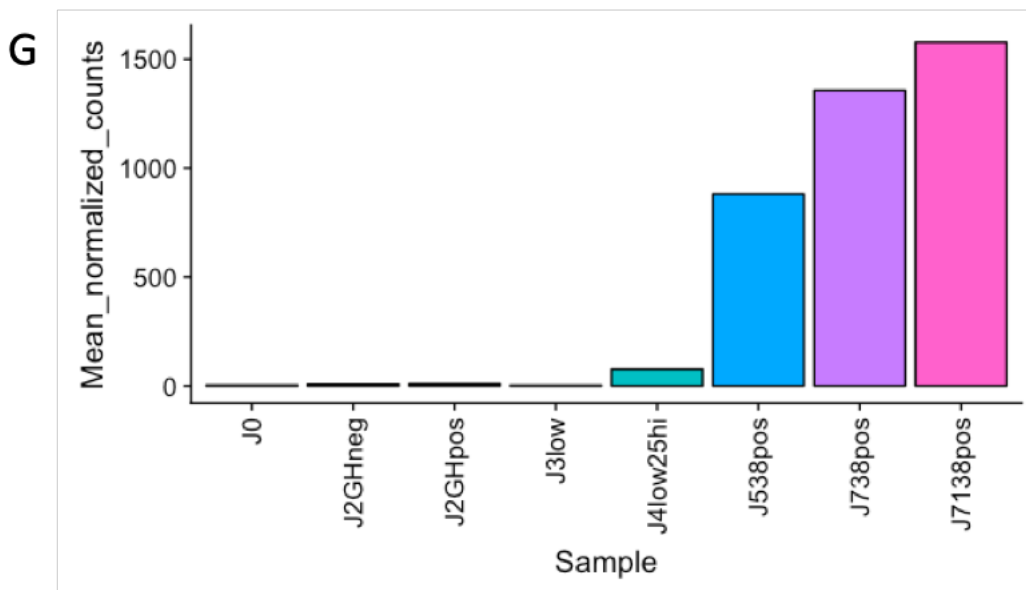






**F**



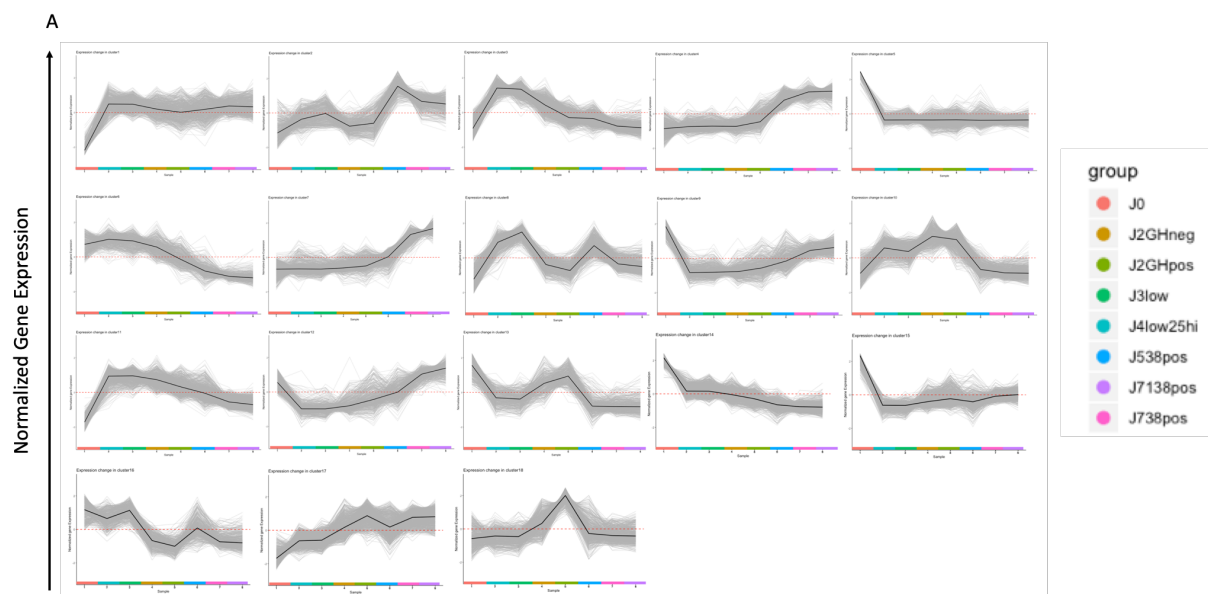


**Figure 1 : Étude de la dynamique transcriptionnelle de la différenciation plasmocytaire de LB naïfs humains *in vitro* par une analyse RNAseq de populations triées au cours du temps.** (A). Protocole de différenciation *in vitro* des LB naïfs humains et schéma récapitulatif des stratégies de tris cellulaires des 8 sous-populations contenant les progéniteurs des plasmablastes, au cours du temps en culture : J0 (LB naïfs), J2GHneg ( J2 CFSE<sup>hi</sup> FSC<sup>hi</sup> Hoechst<sup>-</sup>), J2GHpos (J2 CFSE<sup>hi</sup> FSC<sup>hi</sup> Hoechst<sup>+</sup>), J3low (J3 CFSE<sup>lo</sup>), J4low25hi (J4 CFSE<sup>lo</sup> CD25<sup>hi</sup>), J5 38pos (plasmablasts CFSE<sup>lo</sup> CD38<sup>hi</sup>), J7 38pos (plasmablasts CFSE<sup>lo</sup> CD38<sup>hi</sup> CD138<sup>-</sup>), J7 138pos (plasmocytes CFSE<sup>lo</sup> CD38<sup>hi</sup> CD138<sup>+</sup>). (B) Analyse en composante principale du RNAseq de 24 échantillons (suivi de la différenciation *in vitro* de LB naïfs issues de 3 donneurs sains et 8 sous-populations par culture) en fonction des 500 gènes les plus variables (DEseq2). (C) Heatmap représentant les 1000 gènes les plus variés des 8 sous-populations référencées par le code couleur. (D) Évolution de l'expression des gènes identitaires de la différenciation dans les 8 sous-populations cellulaires référencées par le code couleur. Gènes codant les FT de l'identité B (*PAX5*, *BACH2*, *IRF8*, *BCL6*, *SPI1*) et les FT plasmocytaires (*PRM1*, *IRF4*, *XBP1*, *POU2AF1*) (E) Répartition des clonotypes présents au cours de la différenciation pour les 8 sous-populations cellulaires référencées par leur temps de culture J0 à J7 (analyse MiXCR). (F) Représentation de l'utilisation des jonctions des ARN de *XBP1* au cours de la différenciation (analyse JunctionSeq). L'utilisation des exons (E) et des jonctions d'épissages (J) est représentée pour chacune des populations référencées par le code couleur. Le niveau d'expression de l'ensemble des transcrits du gène *XBP1* est visualisé dans le cadre de droite (GENE). (G) Utilisation de la jonction J024 traduisant l'épissage alternatif de *XBP1* en *XBP1s* au cours de la différenciation

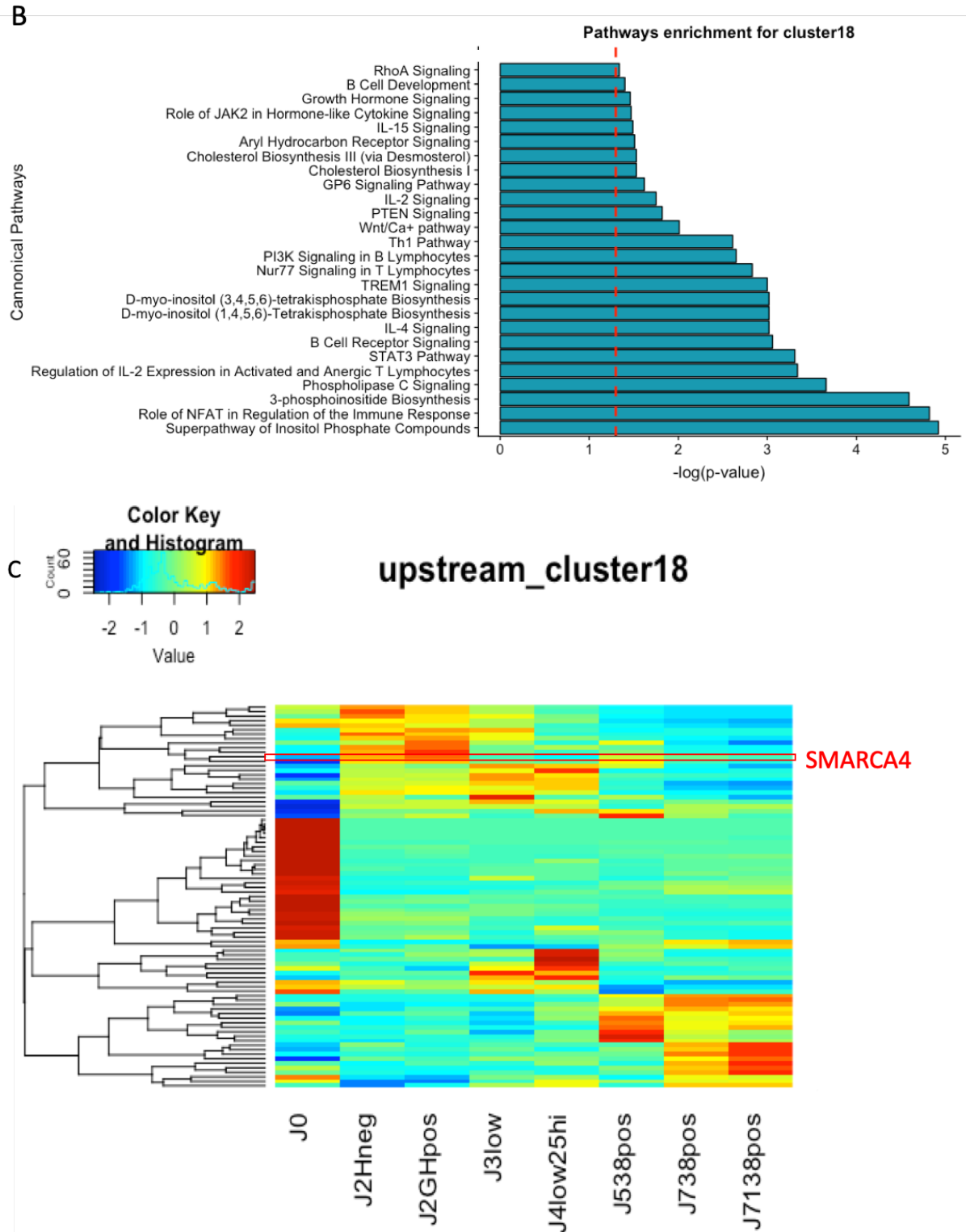
### Les profils d'expression génique au cours de la différenciation.

Devant le nombre important de gènes différentiellement exprimés au cours de la différenciation *in vitro* des cellules B (près de 15 000 gènes, LRT test padj<0.05), nous avons décidé de regrouper les gènes possédant des profils d'expression similaire. Afin de n'introduire aucun biais dans la répartition des gènes, le nombre de clusters de profil d'expression a été déterminé de manière non supervisée (gap-statistic<sup>387</sup>). Les valeurs normalisées par rapport à la moyenne de l'expression du gène ont été utilisées pour déterminer ces 18 clusters (Figure 2.A). Afin de ne pas surcharger cette section, l'analyse d'un seul cluster a été représenté ici. Les gènes du cluster 18 sont fortement exprimés dans les cellules au 4ème jour de la culture (cellules triées sur la base de la dilution du CFSE et de l'expression du CD25). Les voies de signalisation, les processus cellulaires, les signatures biologiques enrichies dans le cluster 18 ont été mis en évidence grâce à une analyse Ingenuity

Pathway. Les gènes retrouvés dans ce cluster sont caractérisés comme étant liés au développement du LB, à la signalisation BCR, à l'activation des voies de signalisation PI3K notamment (Figure 2.B). Comme décrit dans l'étude du [Projet 1](#), ces cellules possèdent une forte signature d'intégration de l'IL-2 et une signature d'engagement dans la différenciation plasmocytaire. L'analyse des facteurs de transcription ayant un lien de régulation avec les gènes formant le cluster 18 met en évidence 83 facteurs. L'étude de l'expression génique au cours du temps de ces 83 facteurs permet de réduire le nombre de facteurs pouvant expliquer ce profil d'expression (Figure 2.C). En effet, l'expression forte et transitoire d'un facteur de transcription à J0 (gènes des clusters 5 et 15 par exemple) a peu de chance d'avoir une régulation directe avec des gènes exprimés au 4<sup>ème</sup> jours de la différenciation. De manière intéressante, le gène *SMARCA4* (cluster 8) est l'un des 83 facteurs. Son profil d'expression est en miroir du cluster 18, suggérant une activité de répression de la transcription des gènes du cluster 18, ce qui est compatible avec son mode d'action. Ce membre du complexe SWI/SNF a été démontré comme important pour réguler l'identité et la croissance des cellules B dans la moelle<sup>388</sup> et est retrouvé dérégulé dans certains lymphomes comme le DLBCL<sup>389</sup>. Il va être intéressant d'inhiber son expression par siRNA dans notre modèle pour évaluer si il possède un rôle dans l'activation ou la transition d'une cellule activée vers une cellule effectrice.







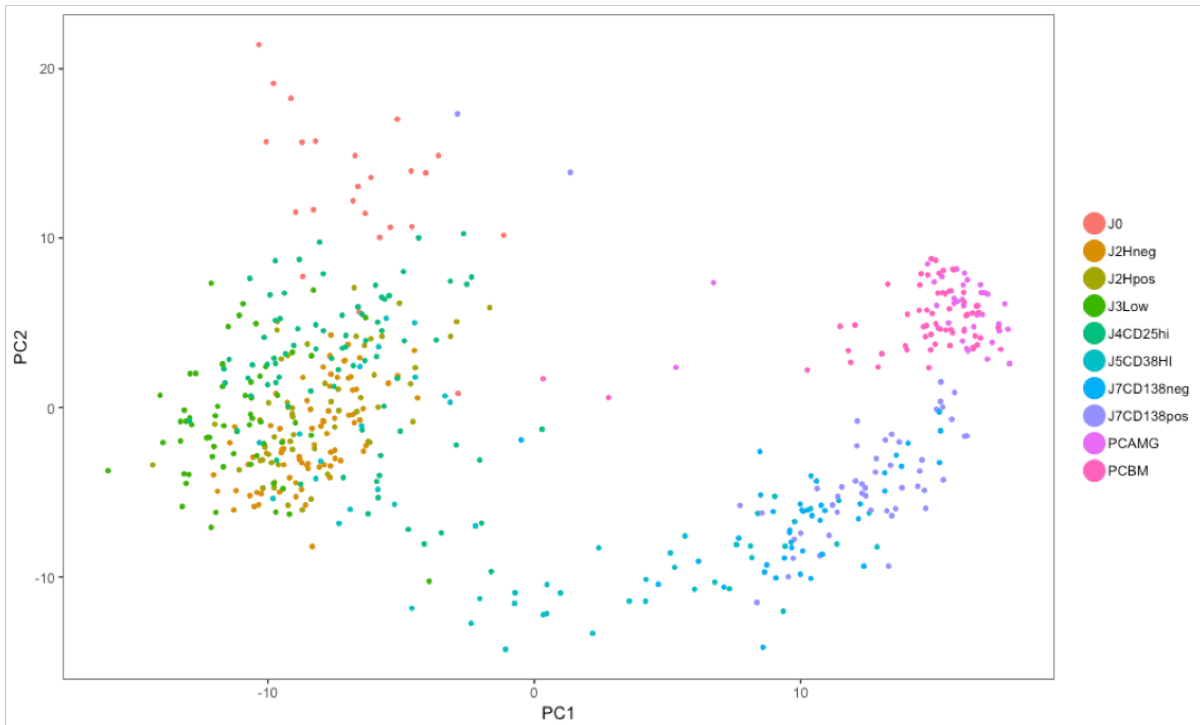
**Figure 2 : Profils d'expression génique au cours de la différenciation.** (A). Le nombre de clusters représentant l'expression des gènes au cours de la différenciation (des LB naifs, J0, à gauche, aux plasmocytes à J7 à droite) a été déterminé de manière non supervisée (Medoid distance). Ce nombre de clusters a été déterminé sur les valeurs normalisées de l'expression des gènes (normalisation en fonction de la moyenne d'expression du gène Row-Z-Score). Le nombre de clusters représentant au mieux la répartition des profils d'expression de l'ensemble des gènes exprimés a été déterminé à 18. (B) Voies de signalisations enrichies par les gènes possédant le profil d'expression du cluster 18 (analyse IPA). (C) Heatmap des FT ayant un lien de régulation selon l'analyse IPA avec les gènes retrouvés dans le cluster 18.

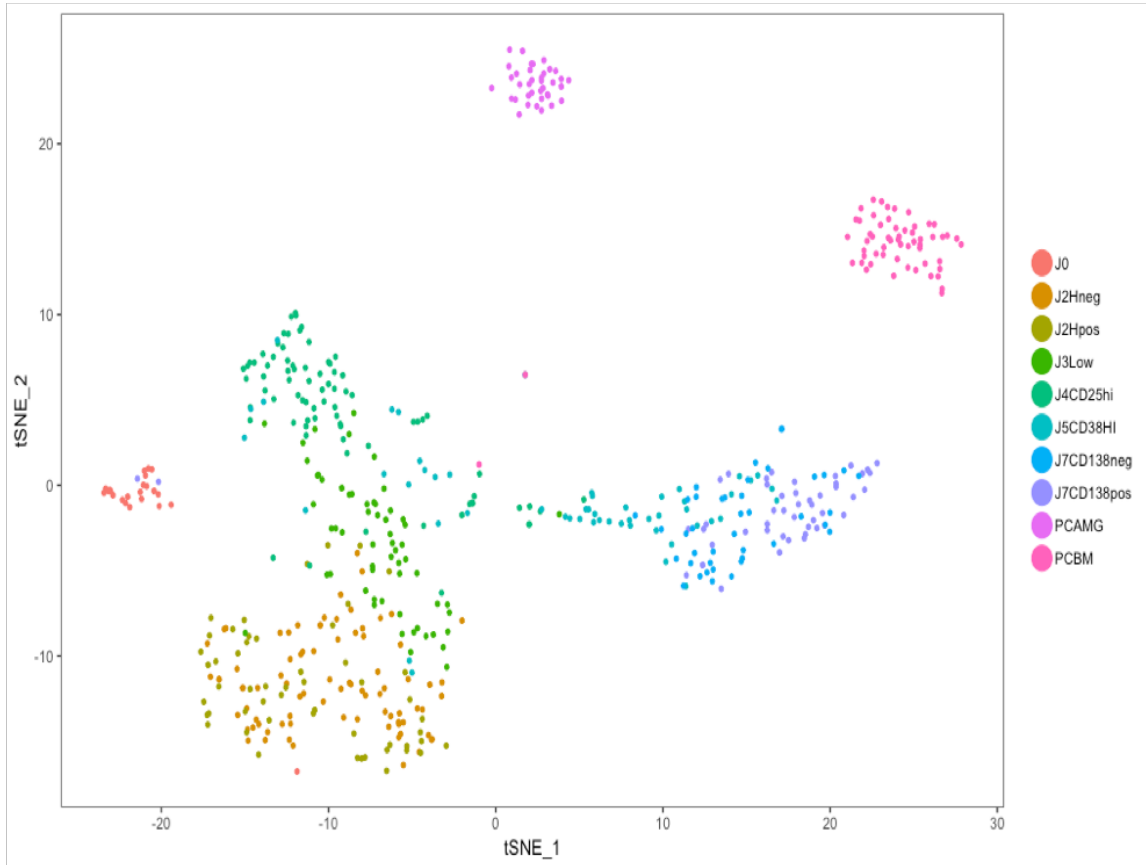
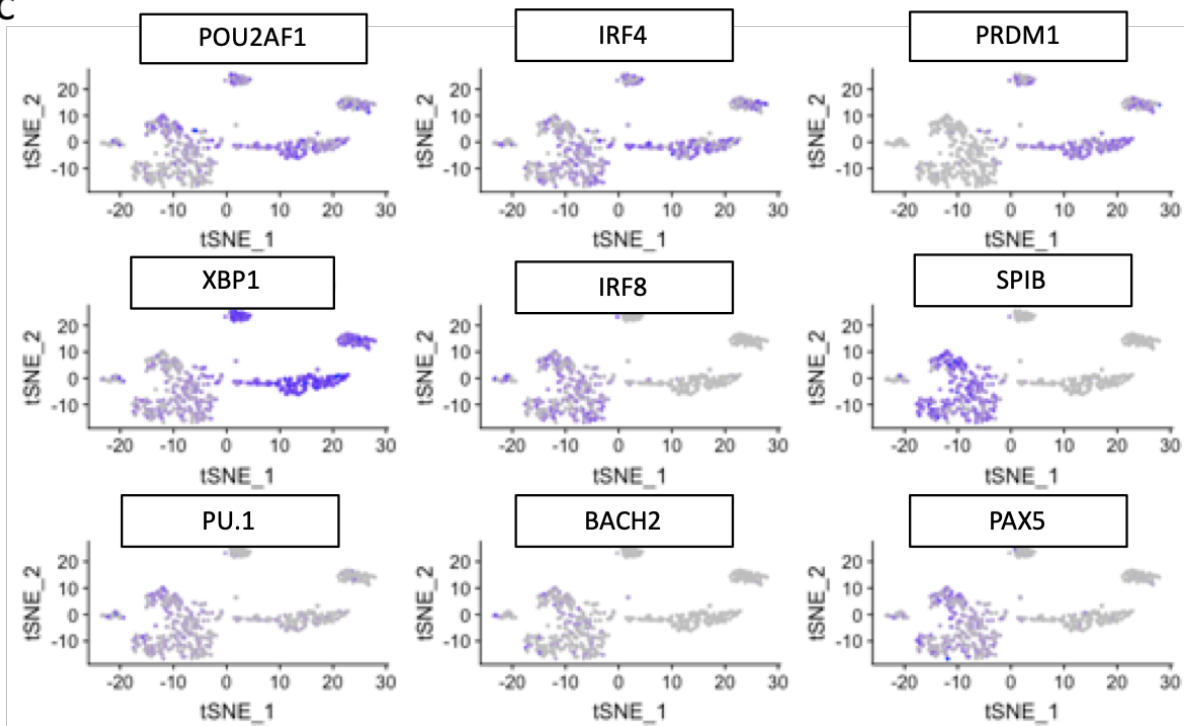
## **L'expression génique sur cellule unique permet une plus grande précision de la dynamique d'expression des gènes.**

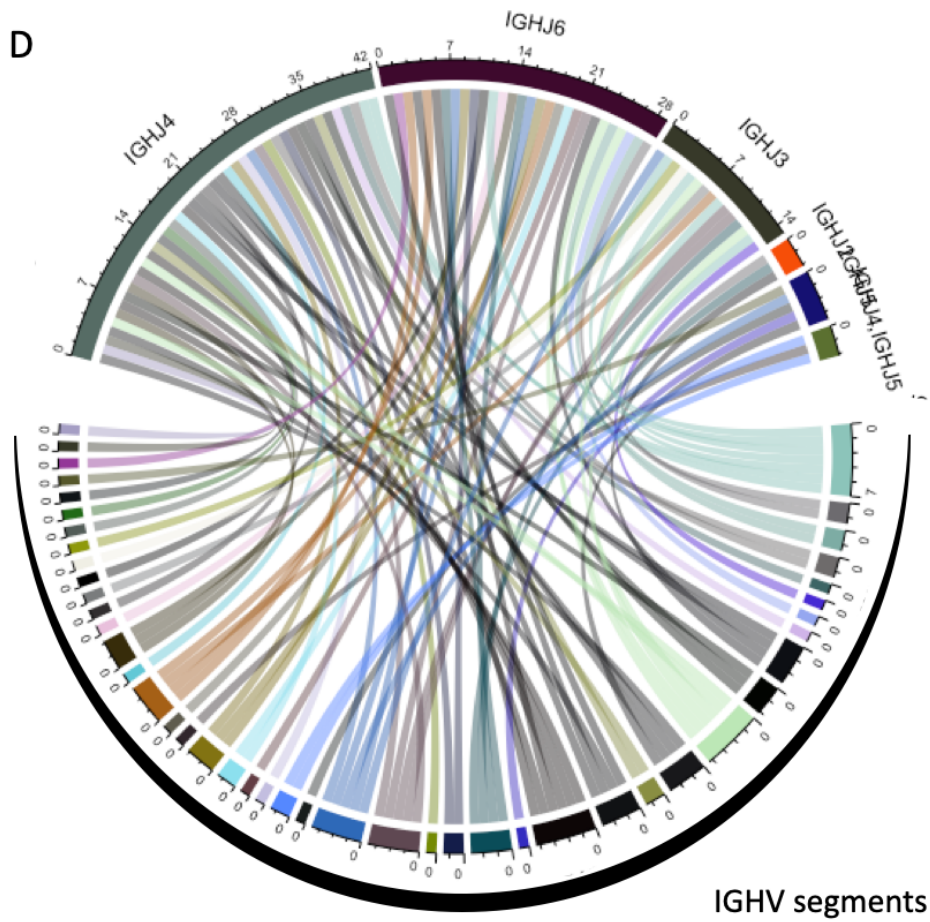
L'approche populationnelle (RNAseq de populations triées) permet une sensibilité importante de l'expression de gènes, ainsi près de 15 000 gènes différentiellement exprimés ont été mis en évidence (LRT test  $p_{adj} < 0.05$ ). Néanmoins, cette approche reflète une moyenne de l'expression de l'ensemble des cellules prélevées à un temps donné de culture. La différenciation *in vitro* n'étant pas un processus synchrone, cette approche ne permet pas d'appréhender finement les variations d'expression et donc la hiérarchie d'expression des gènes. Pour pallier à cette hétérogénéité cellulaire au sein des populations triées, nous avons utilisé le séquençage du transcriptome de cellules uniques (Full-length single cell mRNAseq). Cette étude comporte 539 cellules isolées et analysées par la technologie C1 de Fluidigm, la chimie SMARTseq v4 et séquençage Illumina (HiSeq 4000). La stratégie d'enrichissement en progéniteurs des PCs pour chaque temps de culture (Figure 1A), validée par l'analyse RNAseq populationnelle (continuum de différenciation), a été utilisée pour isoler ces cellules parmi les 8 sous-populations. Des plasmablastes d'amygdales et des PC matures isolées de la moelle ont été ajoutés pour avoir la contrepartie physiologique des cellules différenciées *in vitro*. Après les contrôles qualités (Seurat : gènes exprimés (>50 reads) dans au moins 3 cellules, cellules exprimant au moins 1000 gènes, et ayant un pourcentage de gènes mitochondriaux <20%), l'expression de 16297 gènes est détectée, avec une moyenne de 6000 gènes par cellule et plus de 2000 gènes différentiellement exprimés au cours du processus de différenciation (Seurat ::FindVariableGene Emean.function = ExpMean, dispersion.function = LogVMR, x.low.cutoff = 0.2, y.cutoff = 0.5) . La projection linéaire de ces cellules dans une analyse en composante principale (Figure 3.A) démontre deux grands clusters de cellules. Le premier est composé des cellules naïves (J0) et activées, isolées aux temps de culture J2, J3 et J4, et un deuxième cluster comprend les cellules en différenciation terminale (J5, J7, Plasmablastes d'amygdale et PC de moelle). La projection grâce à l'algorithme du t-SNE permet de séparer les groupes de manière plus précise (dû à la non-linéarité des relations mises en place) (Figure 3.B). Cette représentation est utile pour évaluer l'expression des gènes de la différenciation. Ainsi, comme décrit dans la littérature, les gènes de l'identité B s'éteignent progressivement pour laisser place à l'expression des gènes de l'identité plasmocytaire (Figure 3.C). De manière intéressante, pour *IRF8* par exemple, l'hétérogénéité cellulaire est très grande, le niveau d'expression varie d'une cellule à l'autre alors même que celles-ci sont prélevées le même

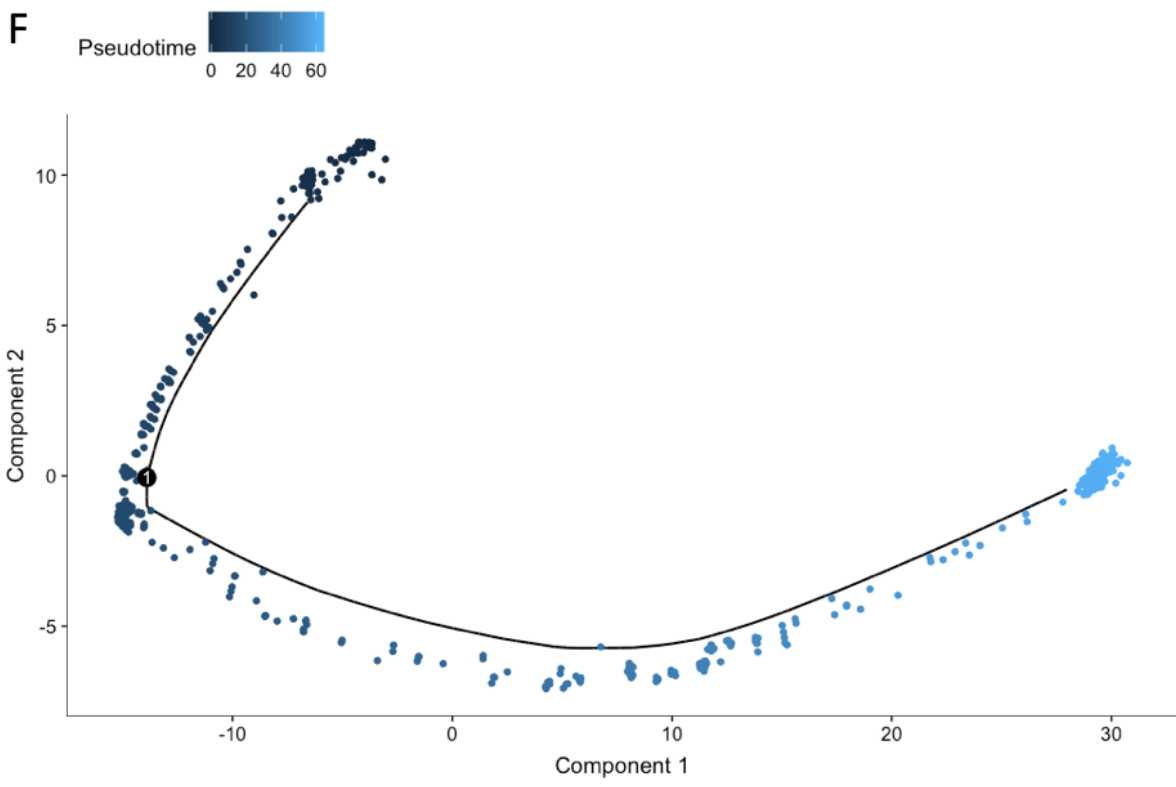
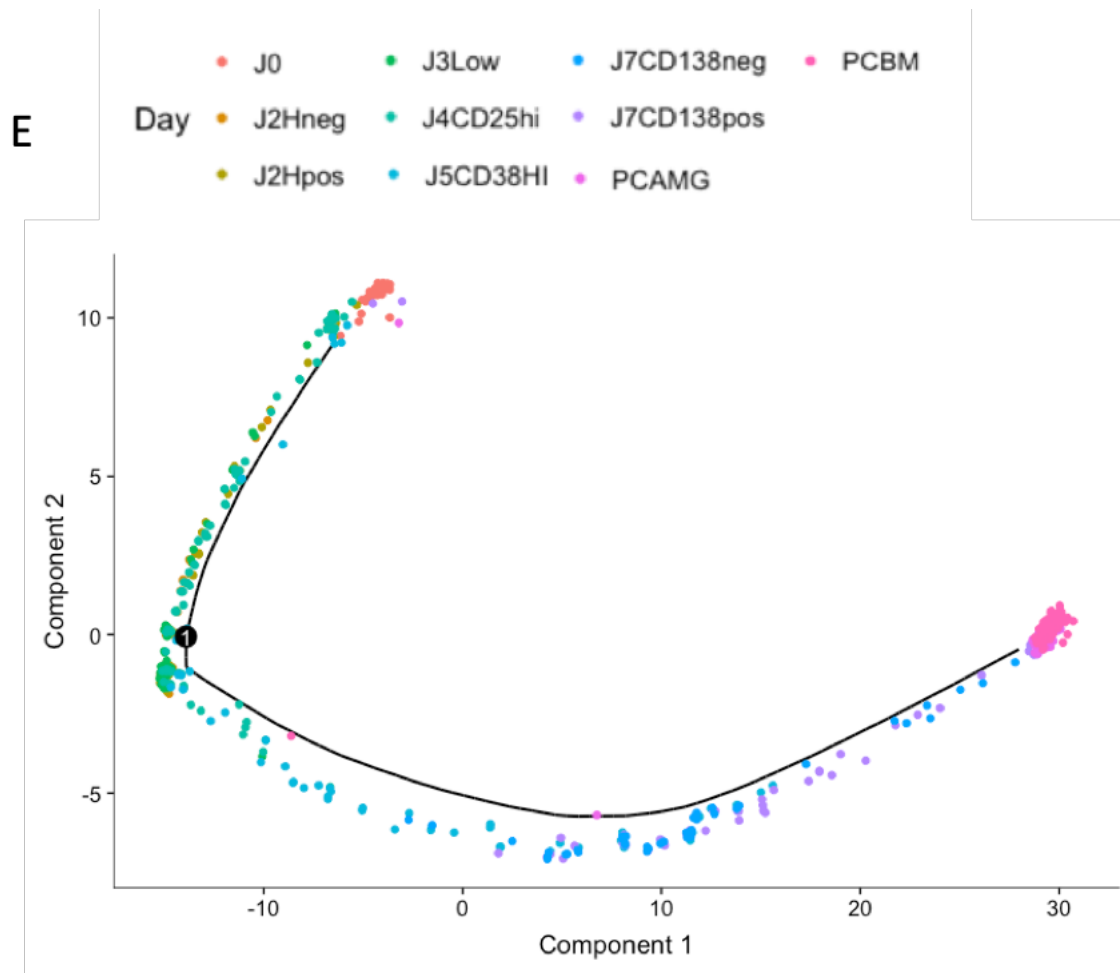
jour. Cela conforte l'utilisation de l'étude de l'expression des gènes sur cellule unique pour disséquer les variations fines de l'expression des gènes. Cette approche permet aussi de reconstruire les séquences du BCR des cellules mises en culture. Ainsi, une grande hétérogénéité des jonctions V-J des chaînes lourdes des LB naïfs et des cellules différenciées est retrouvée (Figure 3.D). Cela exclut la différenciation d'une sous-population clonale provenant d'un avantage sélectif. De nombreux algorithmes ont été proposés pour reconstruire les trajectoires de différenciation lorsque l'on dispose de données de single cell RNAseq. Ces algorithmes permettent de classer les cellules en fonction des similitudes qui existent entre leurs transcriptomes plutôt qu'en fonction du moment où elles ont été prélevées de la culture. Nous avons utilisé l'algorithme Monocle V2 pour reconstruit la trajectoire menant un LB naïf vers une cellule différenciée (Figure 3.E). Pour cette analyse, les 2000 gènes les plus différemment exprimés ont été utilisés (DpFeature, Monocle V2). Cette trajectoire est linéaire potentiellement dû au manque d'hétérogénéité des sous-populations triées.

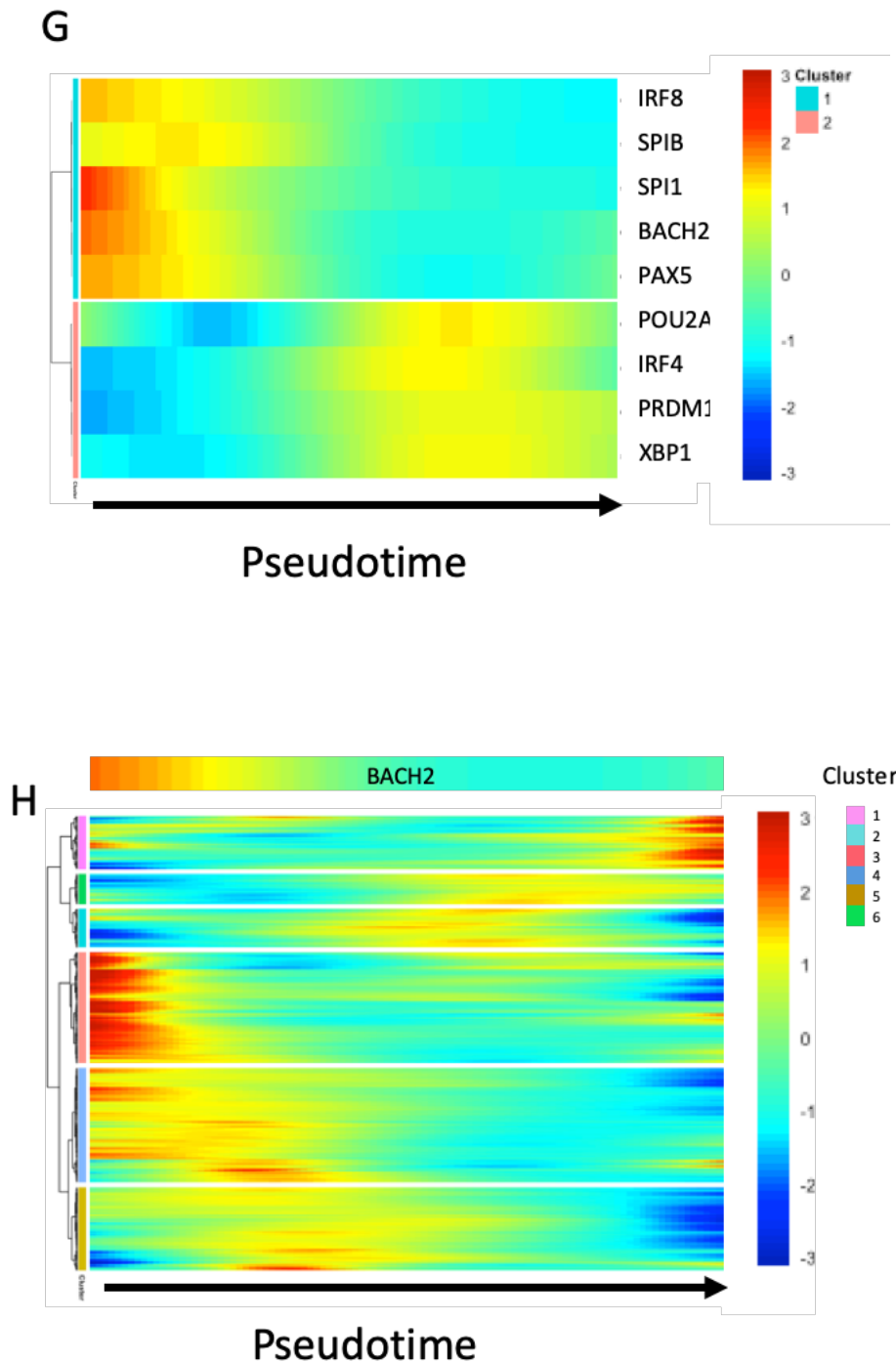
A



**B****C**







**Figure 3 : Analyse single cell RNAseq de la différenciation plasmocytaire *in vitro*.** Analyse en composantes principales (A) et t-SNE (B) des données de séquençage "full length" nettoyées sous Seurat, correspondant aux ARN de 539 cellules uniques isolées à l'aide du C1 (Fluidigm) à partir des 8 sous-populations cellulaires décrites Figure 1A, des plasmablastes d'amygdales (PC AMG) et des plasmocytes de moelle (PC BM). Chaque point représente une cellule dont le code couleur permet d'identifier la sous-population cellulaire d'origine (C). Expressions des gènes identitaires détectés au cours de la différenciation. L'intensité de bleu reflète le niveau d'expression du gène dans chacune des cellules représentées par un point et regroupées par analyse t-SNE. (D) Représentation circus des jonctions IGHV-IGHJ utilisées par les cellules naïves et les cellules différenciées à J5 et J7. Les réarrangements des chaînes lourdes du BCR ne mettent pas en évidence d'expansion clonale. (E) Trajectoire de la différenciation plasmocytaire (analyse Monocle V2). Chaque point correspond à une cellule dont le code couleur renvoie à la sous-population cellulaire d'origine définie Figure 1A. (F) Analyse en pseudo-time de la différenciation plasmocytaire (Monocle V2). (G) Heatmap de l'expression des gènes de la différenciation plasmocytaire en fonction du pseudotime en abscisse. (H) Expression des cibles directes de BACH2 identifiées par ChIPseq, en fonction du pseudotime.

En effet, la stratégie présentée Figure 1A exclue à chaque étape de l'activation des LB la grande majorité des cellules qui n'ont pas intégré les signaux d'activation, comme les petites cellules à J2, et les cellules qui ne prolifèrent pas à J3 et J4. A J4, >80% des cellules triées se différencieront en PC<sup>162</sup>, et à partir de J5 les cellules sont toutes engagées vers la différenciation plasmocytaire. Le faible nombre de cellules dont nous disposons peut aussi impacter sur la linéarité du processus. Nous avons testé la robustesse de cette trajectoire avec différents algorithmes. Cela a été réalisé grâce à Dynverse<sup>382</sup>, package permettant de recenser et de faciliter l'utilisation des packages dédiées à l'inférence de trajectoire (avec les données filtrées sous Seurat). Nous avons ainsi pu tester la trajectoire sur des algorithmes tels que Slingshot, Projected Slingshot<sup>390</sup>, paga\_tree<sup>391</sup>, SCorpius<sup>392</sup>, le Minimum Spanning Tree (similaire à Monocle V2),... L'inférence de trajectoire étant un problème de machine learning, toutes les trajectoires obtenues n'étaient pas biologiquement pertinentes. Dynverse ne permettant pas de faire varier finement les paramètres d'analyse, cela explique sûrement les trajectoires non pertinentes.

Néanmoins, sur l'ensemble des algorithmes testés 50% des trajectoires étaient similaires à celle obtenue par Monocle V2. L'une des fonctions de Monocle est de permettre de classifier ces cellules selon un pseudo-temps (Figure 3.F). Ce pseudo-temps (pseudotime) est une valeur calculée permettant de découper le processus de différenciation en de nombreux intervalles. Ainsi, l'ensemble du processus est divisé en sous parties temporelles. Ce classement permet d'évaluer l'expression des gènes au cours de la différenciation. On remarque le continuum d'expression des gènes B et plasmocytaires (Figure 3.G). La baisse d'expression des gènes de l'identité B précède bien l'acquisition de l'identité plasmocytaire. Le profil d'expression de *IRF8* et *IRF4* est tout à fait en accord avec leur répression mutuelle et l'hypothèse d'une balance de leur expression qui déterminerait l'identité B et PC<sup>393</sup>. L'expression de *SP1* est réduite de manière drastique. Ce TF participant à la promotion des gènes de l'identité B, semble être l'un des premiers acteurs à être réprimé parmi ceux visualisés sur cette heatmap. A noter, l'expression de *SPIB* qui est d'abord surexprimé alors que les autres facteurs B s'éteignent progressivement, avant de s'éteindre lui-même. Alors qu'une redondance fonctionnelle est suspectée entre les facteurs SPIB et PU1 codée par *SPI1*, la dynamique d'expression de leur gène suggère plutôt des rôles distincts. Concernant l'identité plasmocytaire, *IRF4* est le premier gène à être exprimé, confirmant les connaissances issues



de la littérature. *POU2AF1*, codant le FT OBF1, présente un pic d'expression alors même que l'expression d'*IRF4* commence à diminuer. Cette trajectoire retranscrit bien l'expression transitoire de *POU2AF1* au cours de la différenciation terminale.

La dynamique d'expression de *BACH2* est très similaire à celle de *PAX5* impliqué dans le maintien de l'expression de *BACH2*, ce qui ne permet pas d'établir de hiérarchie entre ces deux gènes.

Parmi les gènes cibles de *BACH2* que nous avons identifiés par ChIPseq dans notre précédente étude à partir d'un pool de LB activés *in vitro* au troisième jour de culture<sup>162</sup>, 988 gènes sont représentés dans les données de single cell RNAseq. Nous avons souhaité visualiser leur expression selon le pseudotime établie à partir de la trajectoire single cell (Figure 3.H). Concomitante à la baisse d'expression de *BACH2*, un certain nombre de gènes, regroupés dans des clusters de gènes partageant le même profil d'expression, ont une expression augmentée (Figure 3.H- clusters rose, vert, bleu, violet et kaki). Cette observation est cohérente avec la levée de la répression que *BACH2* exerce sur l'expression de ses gènes cibles. Cependant et de manière intéressante, les profils d'expression des gènes cibles de *BACH2* diffèrent selon les clusters. On note pour les clusters kaki et violet (Figure 3.H) une expression rapide mais transitoire des gènes cibles dans les LB activés, suggérant un rôle précoce de *BACH2* dans les destin cellulaire et l'engagement vers la différenciation plasmocytaire. Cela renforce le message de notre première étude sur *BACH2*<sup>162</sup>. D'autres gènes cibles regroupés dans les clusters bleu, vert et rose, sont exprimés plus tardivement et pour certains gènes leur expression se fait uniquement au stade terminal de la différenciation alors que l'expression de *BACH2* est éteinte bien en amont. Cette dynamique suggère l'intervention de potentiels FT activant la transcription de ces gènes et dont l'expression est plus tardive au cours de la différenciation. Ainsi, ce modèle est un outil puissant pour étudier la relation entre l'expression des FT et leurs gènes cibles.

### **Perspectives**

Notre modèle d'étude de la différenciation plasmocytaire à l'échelle de la cellule unique permet de suivre les étapes précoces et transitoires d'activation des LB humains dont l'étude *in vivo* est difficile contenu de leur faible représentativité dans le pool de LB.

Cet outil ouvre plusieurs perspectives d'études dont:

L'analyse des gènes co-régulés pour une meilleure compréhension des différentes étapes dans ce continuum de différenciation et de la causalité des événements.

L'analyse intégrée des cellules qui ne vont pas se différencier pour une meilleure compréhension des points de décisions vers le destin plasmocytaire. Ceci requiert d'avoir recours à une technologie haut débit, telle que l'approche Chromium développée par 10X Genomics. Nous avons donc entrepris de réaliser cette étude avec pour stratégie d'étudier 3000 cellules toutes les 24h de culture, en partant de LB naifs. Nous disposons des données de séquençage 5' RNAseq de plus de 12000 cellules correspondant au processus de différenciation *in vitro* de LB naifs d'un donneur sain. L'analyse est en cours afin de déterminer la trajectoire branchée.

L'analyse des cascades transcriptomiques impliquées dans la transformation tumorale et qui régulent l'arrêt du processus de différenciation dans les lymphomes et plus particulièrement de l'implication de BACH2 dans la maladie de WM (voir [Projet 3](#)).

## Projet 3 : Étude de la différenciation *in vitro* des cellules circulantes des patients atteints de la pathologie de Waldenström

Nicolas Hipp, Céline Pangault, Olivier Decaux, Vincent Launay, Robert Olazo, Jean-François Deleuze, Karin Tarte, Thierry Fest, Céline Delaloy

---

### Contexte de l'étude :

La pathologie de WM est un cancer hématologique non hodgkinien caractérisé par un infiltrat médullaire de cellules B tumorales hétérogènes. La proportion importante de cellules B dans la moelle couplée à leur capacité de sécrétion massive d'IgM entraîne l'apparition de symptômes chez le patient (hyperviscosité, troubles de la production des lignées hématologiques...). La cellule initiatrice semble être un lymphocyte B mémoire issu du centre germinatif. Cette cellule porte des mutations dans les chaînes variables des Ig sans pour autant avoir effectué la commutation de classe. Le clone malin porte de nombreuses altérations génétiques avec notamment des mutations fréquentes entraînant un gain de fonction de MYD88 et CXCR4. Ces mutations, en synergie avec les signaux trophiques apportés par un micro-environnement médullaire riche, vont promouvoir la prolifération et la survie des cellules tumorales<sup>299,394</sup>. De manière intéressante, chez ces cellules, la différenciation terminale en cellule effectrice semble être altérée. En effet, des dérégulations transcriptionnelles des gènes gouvernant la différenciation ont été rapportées<sup>341,346,364</sup>. Dans cette optique, nous souhaitons utiliser notre modèle de différenciation *in vitro* des LB humains pour comprendre les mécanismes de blocage survenant dans ce processus. Pour cela, nous avons mis en place deux approches pour étudier la différenciation des cellules circulantes de WM.

La première concerne l'étude du transcriptome des LB circulants d'un patient WM muté pour *MYD88* et de ces mêmes cellules différenciées *in vitro*. Pour cette partie, nous avons choisi d'utiliser le séquençage de l'ARNm pleine longueur de cellules uniques (full-length mRNAseq, C1 Fluidigm) afin d'avoir accès au statut mutationnel de *MYD88* et à la séquence VDJ du BCR pour suivre les cellules tumorales en culture.

Avec l'émergence de nouvelles technologies haut débit permettant l'analyse du transcriptome (5'end RNAseq) couplée à l'analyse des séquences VDJ du BCR (10X Genomics), nous avons

dans un second temps évalué la dynamique transcriptionnelle de ces cellules au cours de la différenciation. Le haut débit de la technologie 10X nous a permis d'inclure dans cette étude l'analyse de l'hétérogénéité des LB dans la moelle du même patient. Pour ces deux approches nous avons l'analyse de la contrepartie normale (LB de donneurs sains issues de PBMC et de moelle), générée avec la même technologie.

Fort de nos connaissances de la dynamique de la différenciation normale de LB humains *in vitro*, en réponse à des signaux minimaux et contrôlés, nous espérons que cette approche à l'échelle de la cellule apportera des éléments de réponses sur les mécanismes moléculaires à l'origine de la différenciation avortée des LB de WM.

## **Matériel et méthodes**

### **Échantillon biologique**

Les PBMC et les aspirats médullaires de patients nouvellement diagnostiqués ont été obtenus après signature d'un consentement, grâce à la collaboration des praticiens hospitalier du CHU de Rennes (O. Decaux, C. Pangault, CRBSanté) et le CHG de St Brieuc (V. Launay), en accord avec la réglementation française (accréditation NF S96-900 renouvelée en 2015). Les PBMC de volontaires sains ont été obtenus par l'EFS Bretagne sous l'accréditation du Ministère de l'Éducation et de la Recherche (AC-2014-2315). Les LB circulants du sang sont obtenus après centrifugation sur gradient de Ficoll (Eurobio) suivie d'une déplétion négative (Naive B cell isolation kit II ou B Cells Isolation Kit II en fonction des expériences, Miltenyi). Les LB médullaires sont obtenues après centrifugation sur gradient de Ficoll (Eurobio) suivie d'une sélection positive de l'expression du CD19 (CD19+ Microbeads, Miltenyi). La totalité des échantillons ont été analysés par cytométrie en flux (CytoFlex, Beckman Coulter) avant et après purification des cellules d'intérêts.

### **Culture cellulaire**

Les LB circulantes ont été cultivées pendant 4 jours en milieu constitué de RPMI (Invitrogen), 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Biowest), ainsi que de 1% de Pénicilline et Streptomycine (Invitrogen). Ce milieu a été complété d'anticorps anti-BCR (2,4µg/mL) (Jackson

ImmunoResearch Laboratories), de CD40L (50ng/mL) (R&D systems) et de CpG (5µg/mL) (Invivogen) et avec de l'IL-2 (50U/mL) (Proleukin). Au 4<sup>ème</sup> jour de la culture, les cellules ont été lavées (2 lavages en tampon phosphate salin (PBS 1X Lonza)) et remises en culture (0.4 millions/mL) dans un milieu contenant de l'IL-2 (50U/mL), de l'IL-4 (5ng/mL), et de l'IL-10 (10ng/mL) (R&D Systems).

### **RNAsequencing**

Dans le cadre de l'analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule, deux approches ont été utilisées. Afin d'avoir l'information sur la séquence entière des transcrits, les cellules ont été isolées grâce au système C1 (Fluidigm), basée sur une technologie microfluidique, et les librairies ont été réalisées en utilisant le kit SMART-Seq<sup>®</sup> v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA (Takara) en suivant les recommandations de la compagnie. Les librairies ont été séquencées en 2X75pb sur HiSeq4000 (Illumina), 4M de reads par cellule, dans le cadre de notre collaboration avec R. Olazo et JF. Deleuze (CNRGH, Evry).

La seconde partie de l'étude a été réalisée en utilisant le Chromium Controller de chez 10X Genomics (équipe A. Rolland, IRSET, Rennes) permettant d'isoler, de façon massive et parallèle, une cellule dans une gouttelette, et de préparer les librairies barcodées à partir des ARN contenus dans chaque gouttelette. L'isolement de cellules a été réalisé toutes les 24h de culture, et ce jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de la différenciation *in vitro*. Les échantillons (3000 cellules par hashtag) ont été multiplexés selon la technologie de CellHashing<sup>395</sup> avec un anticorps barcodé par couplage d'un oligonucleotide HTO-Biotine (Eurogentec) avec un anticorps streptavidine (Biolegend) à la fois pour diminuer le nombre de doublets cellulaires inclus dans l'analyse et les biais générés lors de la préparation des librairies. Les librairies 5'end RNAseq, VDJ et HTO, ont été réalisées suivant les recommandations du fabricant et séquencées comme recommandé par la compagnie.

### **Analyses bioinformatiques**

Après vérifications des séquences (FastQC-0.11.7-MultiQC-1.4.dev), celles-ci ont été nettoyées (Trimmomatic-0.33/BBMap\_38.05) puis alignées sur Hg38 (Annotation GRCh38.91) grâce à l'aligneur STAR (2.5.3a). Les tables de compte ont été générées grâce à featureCounts (subread-1.6.0). Les tables de comptes des données générées grâce à la technologie de chez 10Xgenomics ont été générées grâce à CellRanger 3.0. Les détails de la session R utilisée pour

les analyses sont présents à la fin de ce manuscrit. Grâce au package Seurat, les cellules exprimant moins de 200 gènes ont été éliminées de l'analyse. Les gènes exprimés dans moins de 3 cellules ont été éliminés. L'analyse des séquence VDJ a été réalisée grâce à CellRanger.

## Résultats :

### Différenciation *in vitro* des cellules WM circulantes

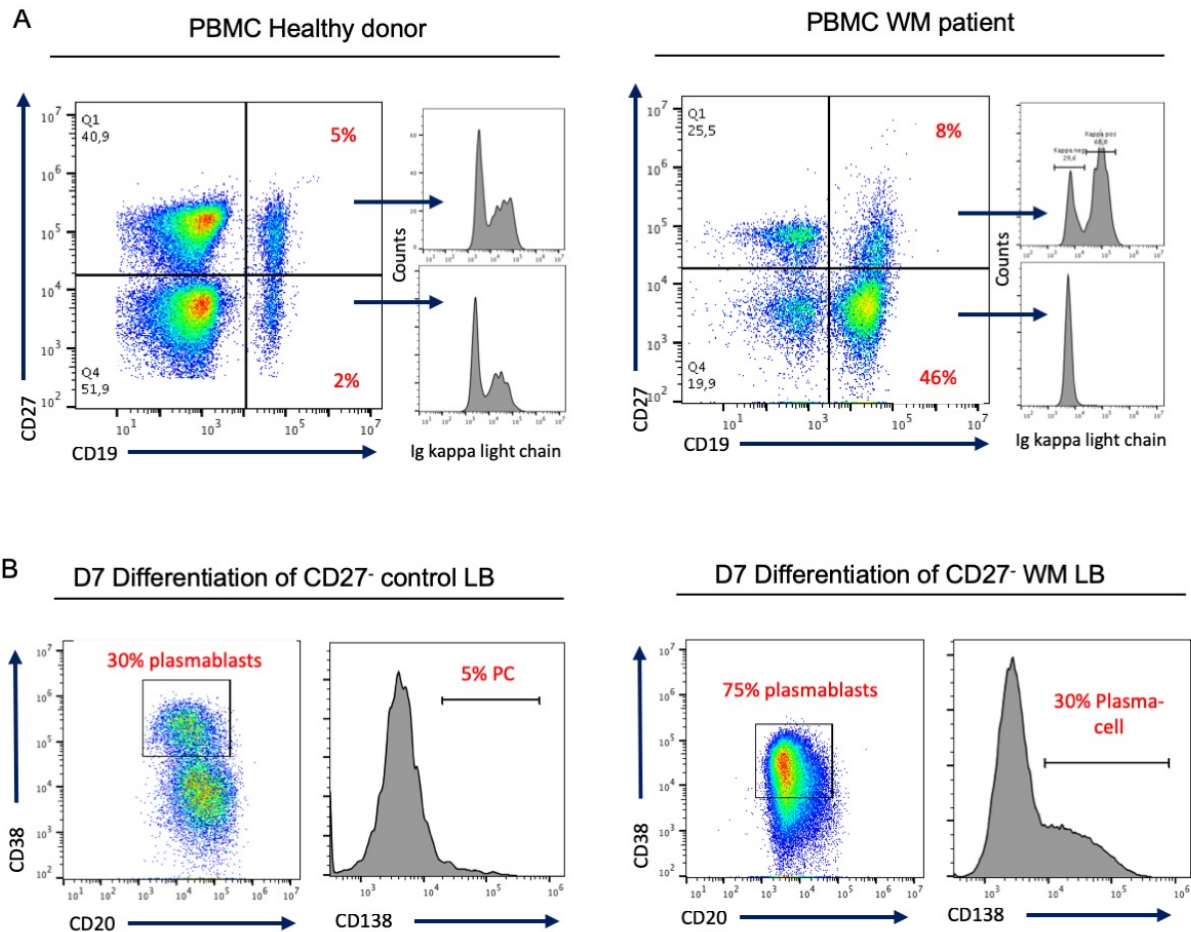
Nous disposons d'un modèle contrôlé de différenciation *in vitro* des LB naïfs humains en plasmocytes dans lequel les signaux minimaux nécessaires à l'activation des LB et à leur différenciation terminale (transduction des voies de signalisations BCR, TLR9, CD40, IL-2, IL-10) ont été étudiés seuls et combinés, et leurs effets sur la prolifération versus différenciation analysés par des tests fonctionnels d'activation, prolifération, différenciation, sécrétion, commutation isotypique et maturation d'affinité des immunoglobulines produites<sup>133,396,162</sup>.

Ici, nous avons isolé les LB circulants de patients WM porteurs de la mutation gain de fonction du gène *MYD88* (Figure 1.A), cellules clonales de petites tailles et non-sécrétantes (évalué par Elispot et ELISA), caractérisés par une analyse de cytométrie en flux comme étant CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD38<sup>lo</sup> CD138<sup>-</sup> CD24<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup> CD5<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> CD23<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> IgK<sup>ou-</sup>.

Après purification des cellules CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> à partir des PBMC de patients WM, nous avons démontré leur capacité accrue de différenciation *in vitro*, par rapport à la contrepartie normale, et en réponse aux signaux de différenciation (antiBCR, CpG, CD40L, IL-2 les 4 premiers jours puis IL-2 IL-4 IL-10; Figure 1.B). Les LB de WM se différencient *in vitro* en cellules sécrétrices d'immunoglobulines M qui expriment le marqueur plasmocytaire CD138 mais maintiennent l'expression du CD20, facteur identitaire B, et présentent une expression intermédiaire de CD38.

Une étude en cours vise à déterminer les signaux minimaux qui permettent l'activation et/ou prolifération et/ou différenciation terminale des LB circulants en relation avec leur statut mutationnel et leur capacité intrinsèque à produire de l'IL-10, IL-6, et à activer les voies de signalisations qui soutiennent la survie et/ou prolifération des cellules tumorales. Nos résultats suggèrent une dépendance des cellules de WM, mutées pour *MYD88*, à la signalisation BCR pour acquérir la capacité de différenciation, en accord avec le rôle supposé de la signalisation BCR dans l'expansion et la prolifération tumorale (Figure 2).

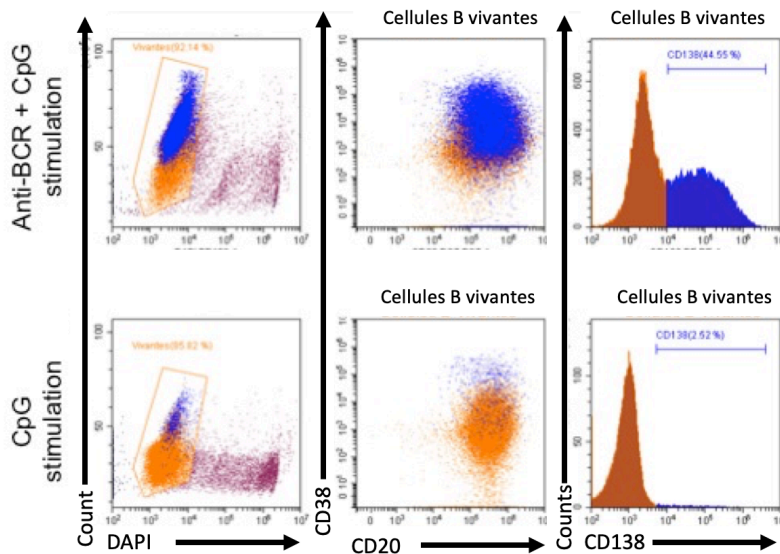
Dans la suite de l'étude, le cocktail de stimulation utilisé pour la différenciation plasmocytaire des LB de patients est le même que celui utilisé pour la différenciation terminale des LB de donneurs sains (stimulation des voies BCR, CD40, TLR9 et IL-2 les quatre premiers jours de culture puis signaux IL-2 IL-4 IL-10).



**Figure 1. Capacité de différenciation in vitro des LB tumoraux circulants**

A. Analyse en cytométrie de flux de PBMC de donneurs sains (panels de gauche) et de patient WM (panels de droite). Caractérisation d'une infiltration sanguine majeure d'un patient WM porteur de la mutation gain de fonction du gène MYD88, par un clone lambda de LB CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> (et par ailleurs CD24<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup> CD38lo CD138<sup>-</sup> CD23<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup>).

B. Analyse en cytométrie de flux des LB purifiés (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) différenciées in vitro après 7 jours de culture (stimulations antiBCR, CD40L, CpG, IL-2 les 4 premiers jours suivie de la stimulation IL-2 IL-4 et IL-10 pendant 3 jours). L'expression du CD38 et du CD138 permet d'identifier la génération de plasmablastes et Plasmocytes (PC) qui répriment l'expression du CD20, à partir de LB naïfs de PBMC contrôles (control LB from Healthy donor; panels de gauche). Les LB CD27<sup>-</sup> d'un patient WM présentent une grande capacité de différenciation analysée par le % de cellules CD138<sup>+</sup> à J7 (panel de droite).



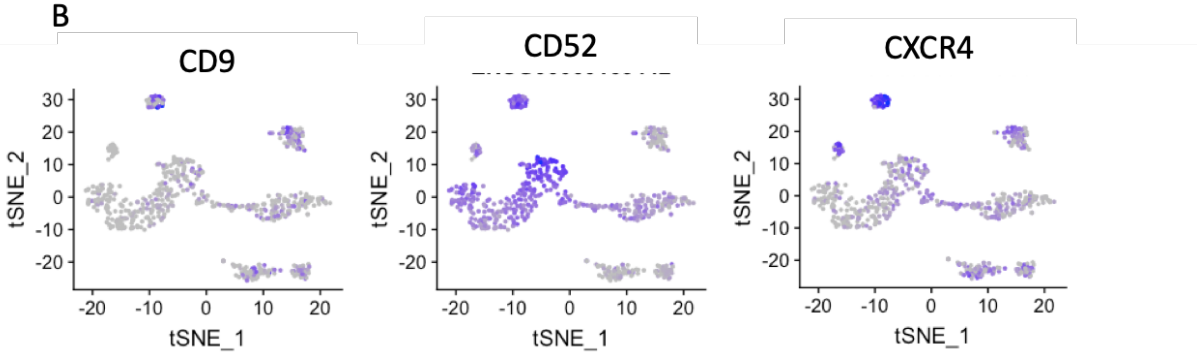
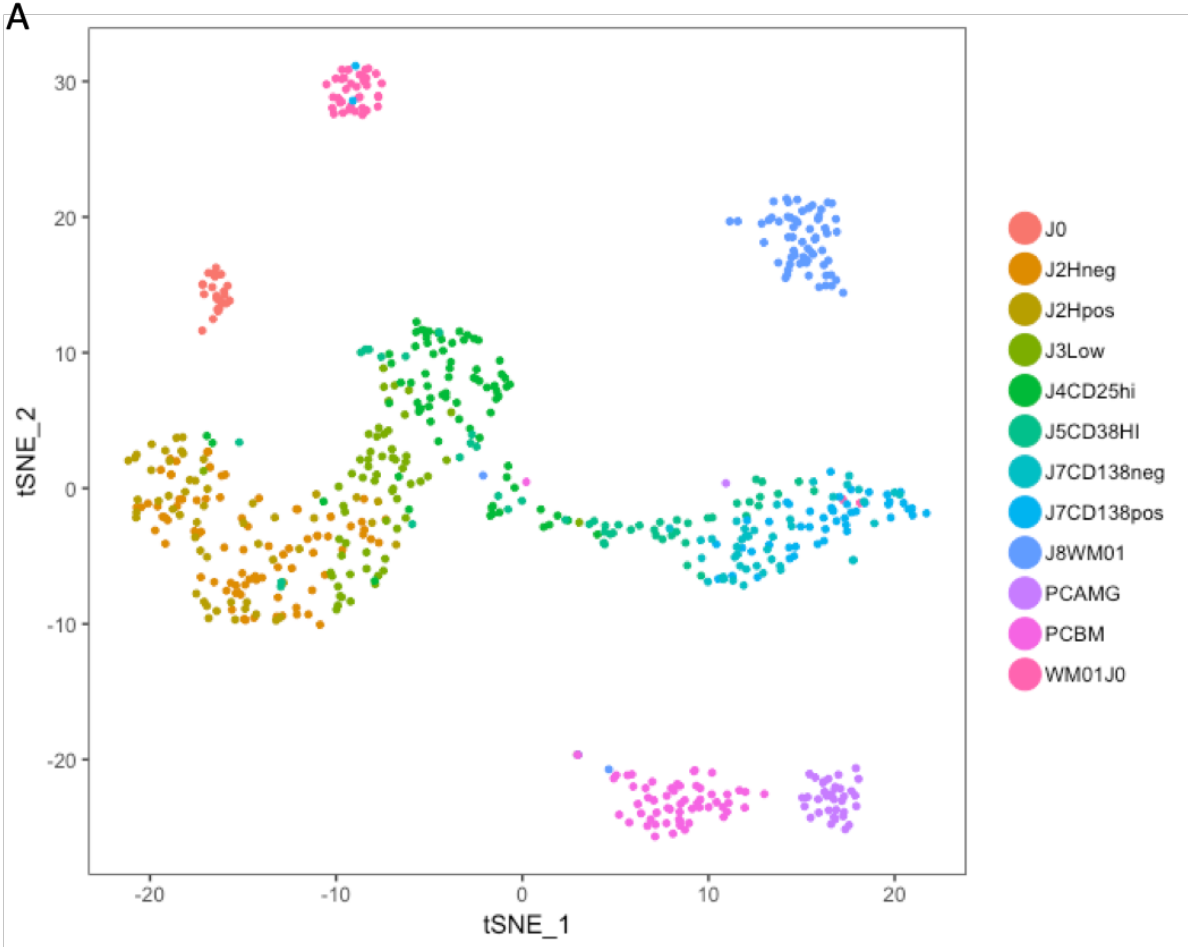
**Figure 2. Réponse des cellules WM circulantes aux signaux d'activation.** Différenciation plasmocytaire de cellules monoclonales CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD38<sup>lo</sup> CD138<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD23<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> IgK<sup>+</sup> isolées dans le sang d'un patient WM porteur de la mutation gain de fonction MYD88. Les cellules plasmocytaires générées avec la stimulation anti-BCR et CpG et analysées par cytométrie en flux expriment le CD138 mais ne répriment pas le CD20 (panels du haut). Très peu de cellules différenciées sont obtenues avec une activation par le CpG seule suivie d'IL-10 (profils cytométriques du bas).

**Le séquençage complet des transcrits à l'échelle de la cellule unique permet la caractérisation précise de l'infiltrat sanguin d'un patient WM et de l'altération du processus de différenciation terminale.**

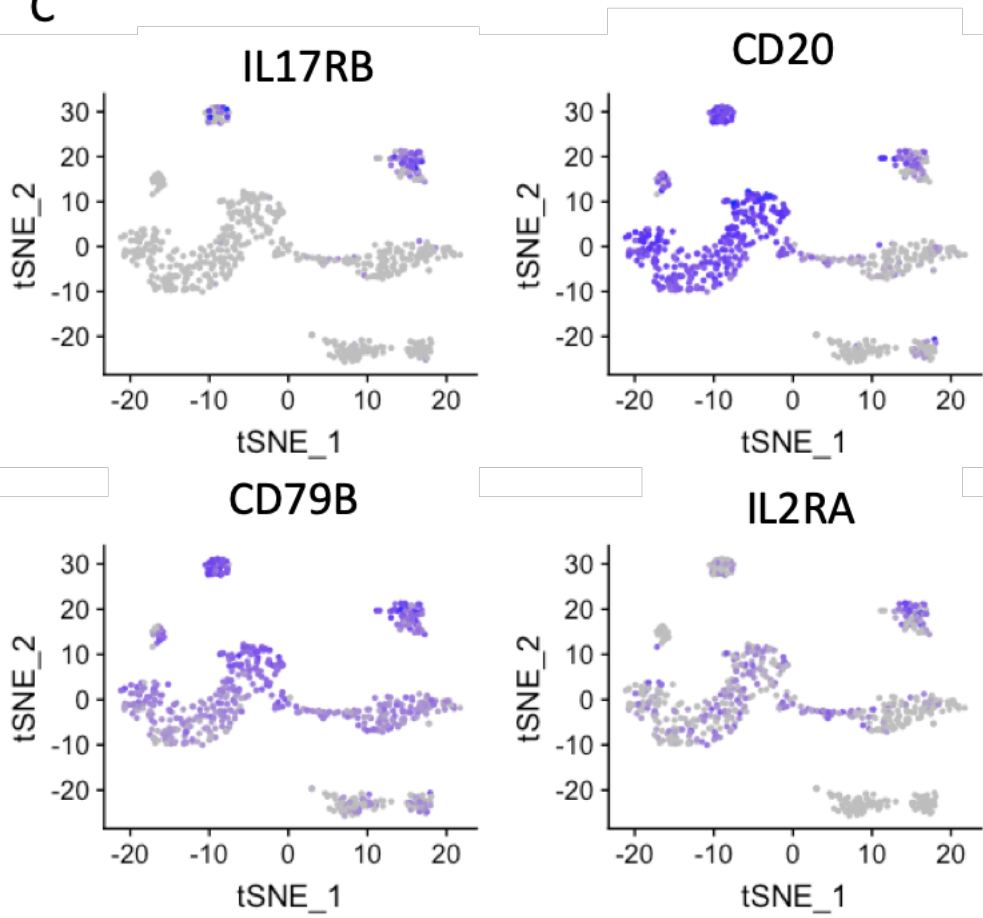
Compte tenu de l'hétérogénéité cellulaire décrite dans la maladie de WM (petites cellules, lymphoplasmocytes, PC), nous avons entrepris de caractériser sur le plan moléculaire les cellules circulantes de patients WM et leur différenciation *in vitro*, par une analyse de leur transcriptome à l'échelle de la cellule unique. Les résultats présentés ici ont été générés en parallèle de l'analyse de la différenciation normale sur cellule unique grâce au système C1 de chez Fluidigm (analyse présentée dans le [Projet 2](#) de ce manuscrit de thèse). Ce schéma expérimental nous permet donc d'avoir accès aux contreparties normales des cellules en différenciation générées avec la même technologie. Dans un premier temps, nous avons généré les profils d'expression génique des LB circulants d'un patient WM (WM01 J0) et des cellules différenciées *in vitro* triées sur la base de leur expression du CD138 à J8 (J8 WM01). La comparaison des profils généraux, par une analyse t-SNE, distingue les cellules issues du patient et celles issues du donneur sain (Figure 3.A). Parmi les gènes différenciellement exprimés (64 gènes,  $p_{adj} < 0.05$ ) entre les LB CD27<sup>-</sup> circulants du patient (WM01 J0, cluster de cellules représentées par les points roses) et les LB naïfs du donneur sain (J0, cluster de cellules représentés par les points de couleur saumon), on retrouve notamment les gènes *CD9*, *CD52* et une expression forte de *CXCR4* (alors que le patient n'est pas porteur de la mutation gain de fonction de ce récepteur) (Figure 3.B). Ces résultats sont concordants avec les données de



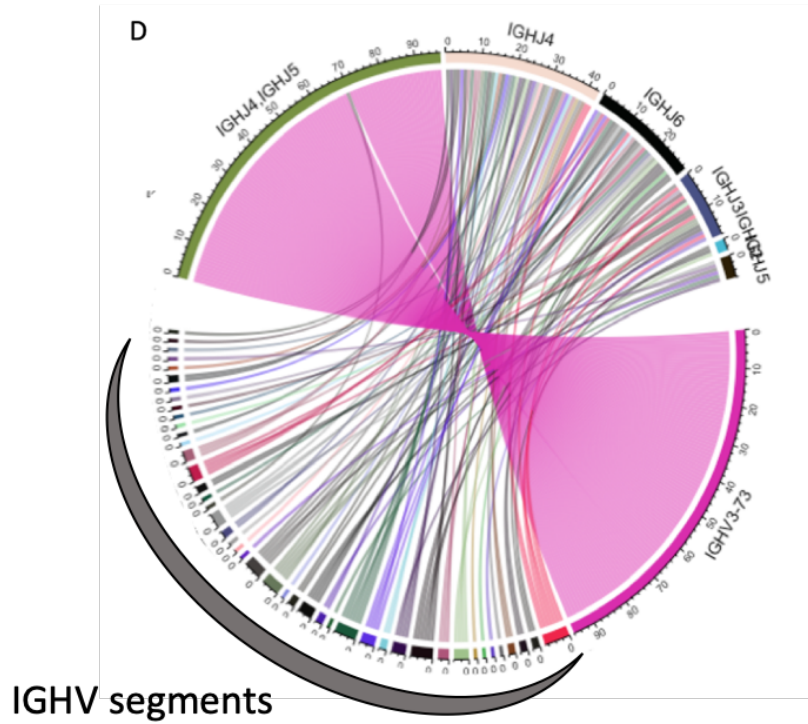
la littérature. La présence du CD9 à la surface des cellules tumorales circulantes a été rapportée dans une précédente étude{Citation}<sup>397</sup>. L'expression du CD52 par les cellules tumorales a été mis en évidence par Owen et ses collaborateurs<sup>398</sup>. L'utilisation du Alemtuzumab (anti-CD52) a provoqué la régression du clone tumorale dans 4 des 5 patients analysés dans cette étude. Enfin une hyperactivation de la voie CXCR4 est observée dans cette pathologie même en l'absence de détection de la mutation du gène<sup>341</sup>.

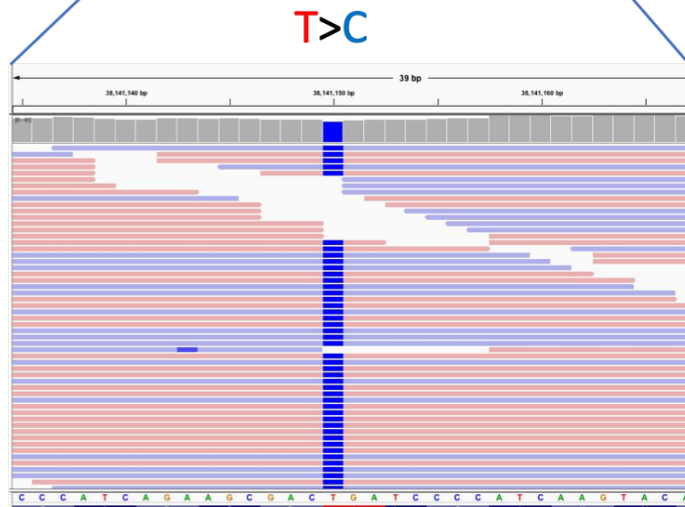
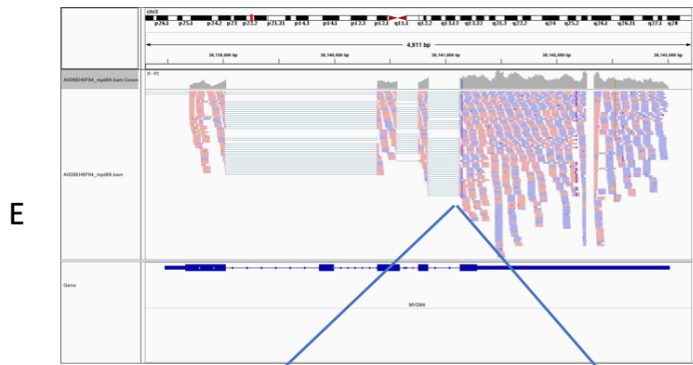


C

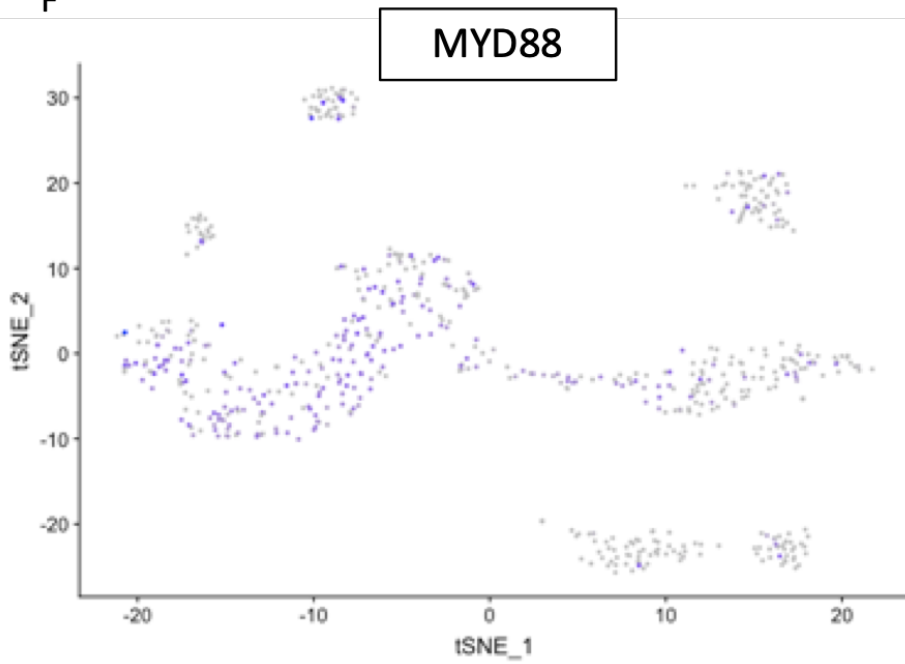


D





F



**Figure 3 : L'analyse du transcriptome à l'échelle de la cellule permet une distinction fine des cellules saines et tumorale.** A. tSNE des différentes populations lymphocytaires B analysées en Single-cell full-length mRNAseq (C1 Fluidigm). Chaque point représente le transcriptome d'une cellule. Le code couleur fait référence à la population d'origine (J0 à J7 du processus normal de différenciation *in vitro*, cf Partie 2 figure 1A pour la description des échantillons ; WM01 J0 correspond aux cellules circulantes du patient WM - cluster rose- et J8 WM01 correspond aux cellules du même patient différenciées *in vitro* et triées sur la base de l'expression du CD138 - cluster bleu foncé-). B-C. Exemple de gènes différenciellement exprimés entre les LB circulantes de WM, cluster rose sur la figure A (B) et les mêmes cellules différenciées, cluster bleu foncé de la figure A (C) entre un patient WM et un donneur sain. L'intensité de la coloration bleue du point reflète le niveau d'expression du gène dans la cellule. D. Représentation circus de l'utilisation des jonctions V-J par les cellules circulantes et différenciées *in vitro* du patient WM ou du donneur sain. E. Visualisation à l'aide du logiciel IGV de la mutation MYD88<sup>L265P</sup> d'une cellule du patient WM grâce au séquençage de la pleine longueur des transcrits *MYD88*. F. Expression de *MYD88* dans les différentes populations B analysées.

La comparaison des gènes différenciellement exprimés entre les cellules différenciées contrôles et de WM (WM01 J8) (856 gènes  $\text{padj} < 0.05$ ) démontre une expression forte de gènes tels que *IL17RB*, *CD20*, *CD79B* et de *IL2RA* par les cellules différenciées du patient WM (Figure 3.C). La présence d'un taux sérique élevé d'IL-17 chez les patients<sup>399</sup> couplée à cette augmentation de l'expression de cette sous-unité du récepteur permet d'émettre l'hypothèse que ce signal renforce l'activation de NFκB chez les cellules tumorales (l'activation de la voie NFκB par l'IL-17 a été démontré dans de nombreux modèles<sup>400, 401</sup>). Les cellules différenciées de WM (WM01 J8) maintiennent aussi des marqueurs de l'identité B normalement réprimés au cours du processus de différenciation, comme le *CD20* et le *CD79B*. L'expression forte de *IL2RA* par les cellules différenciées de WM, couplée à un taux sérique important de l'IL-2 décrit dans la littérature, permet de supposer que cette cytokine renforce l'activation de la voie STAT5 dans ces cellules et participe à la sécrétion massive d'IgM<sup>399,358</sup>.

L'utilisation du séquençage pleine longueur de l'ensemble des transcrits d'une cellule permet d'avoir accès à la clonalité des LB. L'analyse des séquences VJ des cellules circulantes du patient WM01, différenciées ou non *in vitro*, et de leur contrepartie normale révèle l'utilisation massive de la jonction IGHV3-73-IGHJ4/5 par les cellules du patient (Figure 3.D). L'assignation du clonotype révèle que les cellules circulantes du patient WM, et les cellules différenciées à partir de ces cellules circulantes, sont clonales.

L'évaluation du statut mutationnel de *MYD88* est soumise à la limitation de l'expression de l'ARNm de ce gène. En effet, bien que l'expression soit détectable pour certaines cellules circulantes ou différenciées, elle reste très faible (Figure 3.F). Ainsi, si la cellule exprime l'ARNm de *MYD88* à un niveau suffisant pour qu'il soit séquencé, il est alors possible de détecter la mutation dans les cellules de WM circulantes (Figure 3.E). Nous n'avons pu effectuer cette validation sur l'ensemble des cellules analysées, par manque de sensibilité de

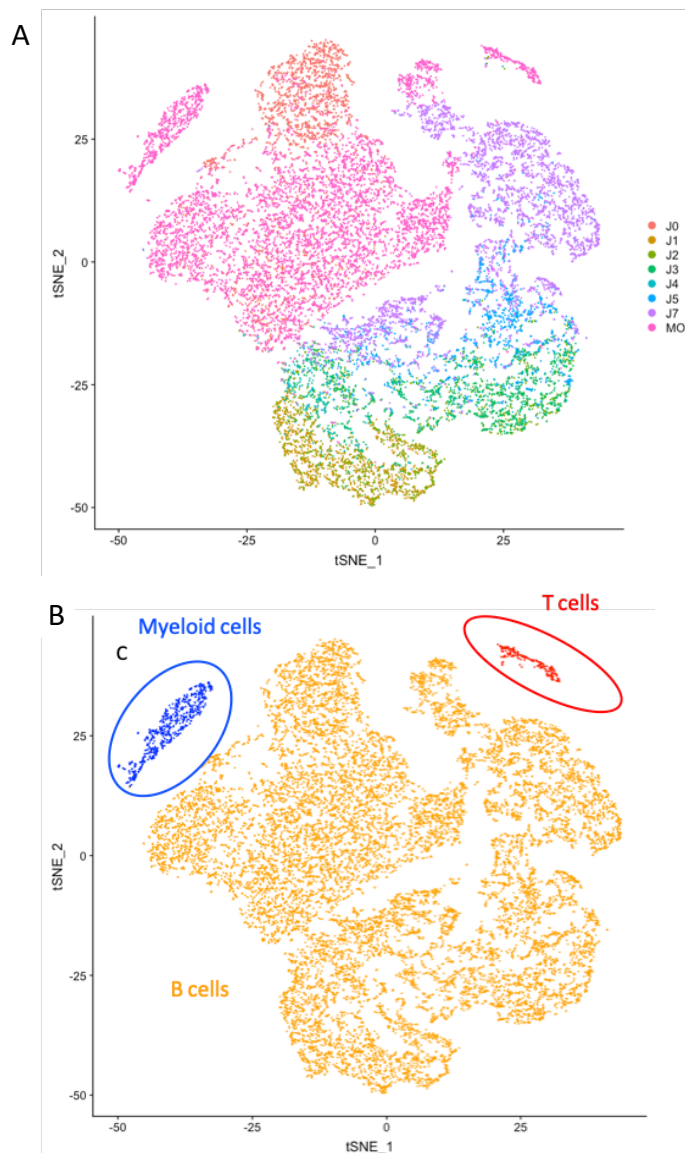
la technique, ou l'absence d'expression des transcrits *MYD88* par les cellules (Figure 3.F). Néanmoins, il est fort probable que l'ensemble des cellules clonales portent la mutation *MYD88*<sup>L265</sup> étant donné la détection dans certaines d'entre-elles. Cette technologie apporte donc une définition précise des cellules tumorales, mais a pour inconvénient un débit faible qui ne permet pas dans notre cas d'évaluer les points de décisions engageant ou non la cellule vers la différenciation.

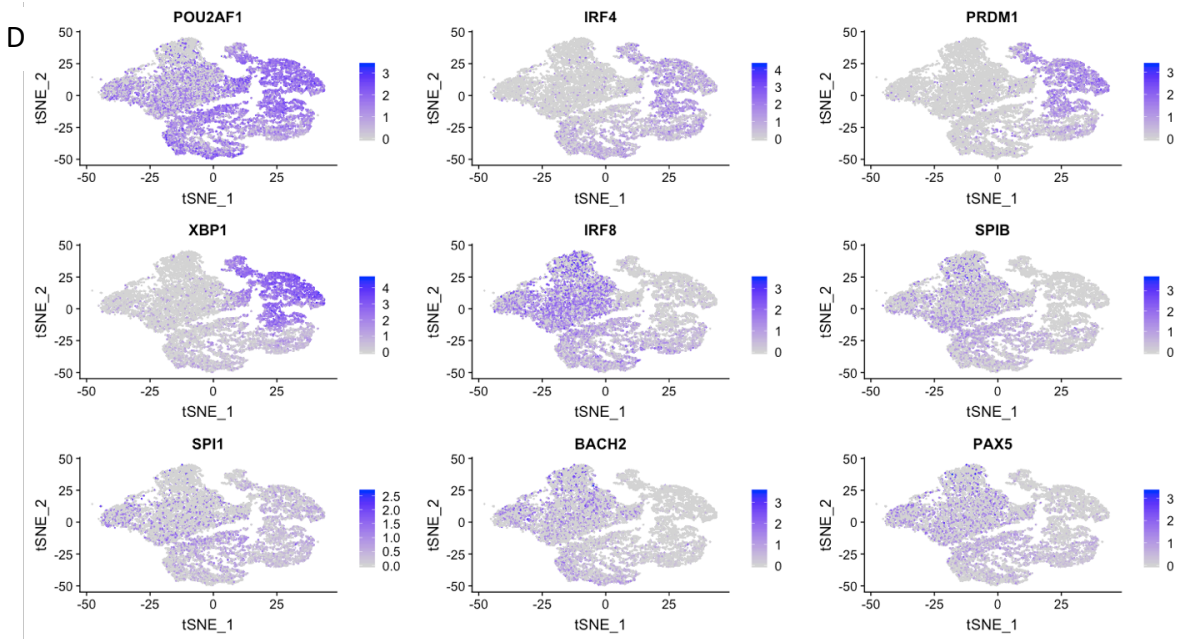
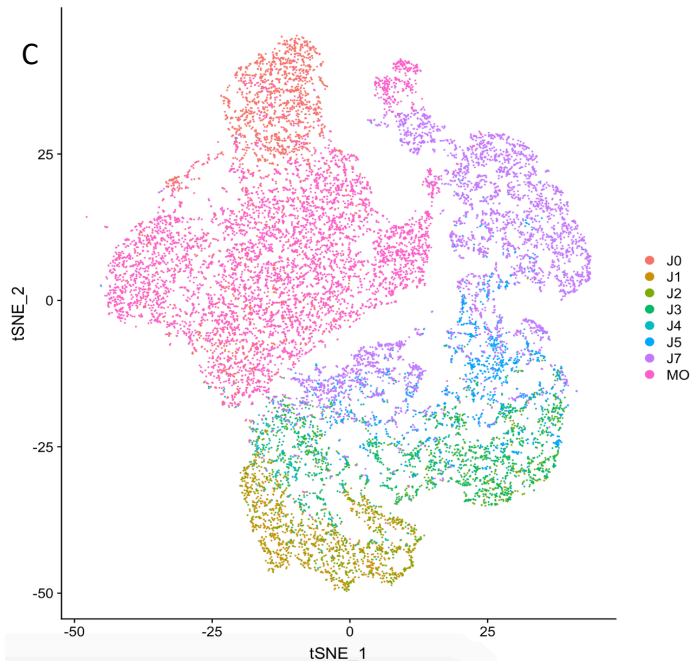
**Etude dynamique du processus de différenciation *in vitro* des LB circulants d'un patient WM couplée à l'analyse de la diversité des LB dans la niche médullaire du même patient par une approche RNAseq haut débit à l'échelle de la cellule.**

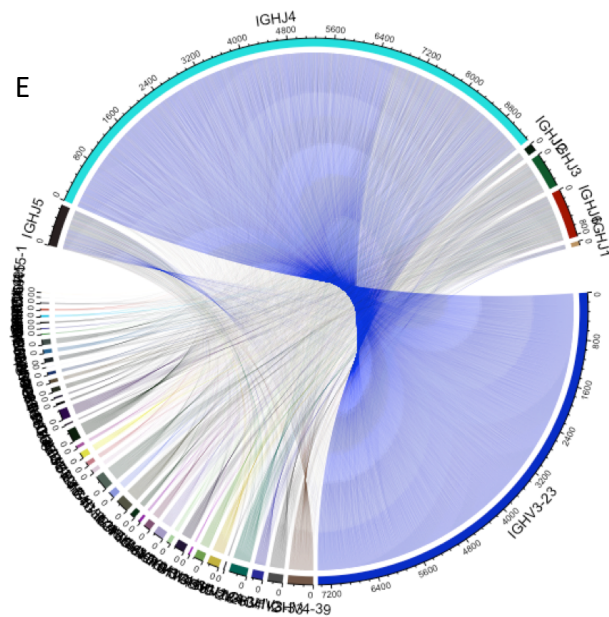
Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé le Chromium de chez 10x Genomics pour isoler les cellules. Cette technologie possède un débit suffisant pour nous permettre d'étudier la dynamique de différenciation terminale des LB de WM. Nous avons utilisé les échantillons de sang et de moelle prélevés le même jour sur un patient nouvellement diagnostiqué (WM02), caractérisés par une analyse en cytométrie en flux (données non montrées). Ici, près de 18 000 cellules du patient ont été analysées au cours du processus de différenciation *in vitro* des LB circulants. Elles ont été collectées à différents jours de la culture (J0/1/2/3/4/5/7) et l'analyse a été couplée avec celle des cellules de moelle osseuse du même patient, triées sur la base du CD19 (près de 9000 cellules). La projection des données sur un tSNE permet d'évaluer les rapprochements des cellules ayant un profil d'expression similaire (Figure 4.A). De manière intéressante, la sélection CD19<sup>+</sup> des cellules de la moelle n'est pas parfaite, on retrouve des cellules T, ainsi que des cellules myéloïdes (Figure 4.B). Après exclusion de ces cellules, la projection des cellules B sur un tSNE permet de mettre en évidence l'hétérogénéité des cellules B en culture, et des cellules B médullaires (Figure 4.C). On remarque que des LB circulants (J0, points rouges) ségrégent avec des LB de la moelle osseuse (MO, points roses). L'expression des gènes codant les FT plasmocytaires (*PRDM1*, *IRF4*, *XBP1*) est retrouvée dans les cellules analysées à J5 et J7 de la culture *in vitro*, et dans une proportion de cellules de la moelle (Figure 4.D). Cela démontre donc la capacité des cellules à augmenter l'expression des marqueurs de l'identité PC lorsqu'elles sont stimulés *in vitro* par les signaux de différenciation. Une partie des LB de la moelle, tout comme les LB du sang au cours des premiers stades d'activation *in vitro* (J1 à J4), expriment les marqueurs de l'identité B (*IRF8*, *BACH2*, *PAX5*, *SPIB*...) (Figure 4.D). Ces observations démontrent bien (1) l'hétérogénéité de l'identité des LB au sein de la moelle de ce patient WM, (2) l'identité B des cellules présentes dans le sang de

ce patient (3) la capacité de différenciation des ces cellules circulantes par l'intégration de signaux d'activation. Il va être intéressant d'étudier les gènes différentiellement exprimés qui caractérisent ces différents états cellulaires et de comparer la trajectoire de différenciation avec une trajectoire de cellules contrôles analysées de la même façon (données générées mais non analysées).

Comme décrit précédemment dans la littérature, le séquençage de la région VDJ du BCR, réalisé en parallèle du séquençage 5'RNAseq sur ces mêmes cellules, montre qu'une grande partie des cellules B circulantes et des cellules B présentes dans la moelle sont clonales avec une utilisation massive de la jonction IGJ4-IGHV3-23 pour ce patient. (Figure 2.E).







**Figure 4 : Hétérogénéité au sein de la population lymphocytaire B d'un patient WM révélée par une analyse single cell RNAseq du compartiment sanguin et médullaire.** A. Représentation des 8 populations analysées grâce à l'algorithme du tSNE. Chaque point correspond à une cellule. Le code couleur correspond aux populations cellulaires étudiées: J0 (LB du sang), J1 à J7 correspondent aux temps de prélèvement de la culture *in vitro* des LB de sang. B. Les cellules analysées contiennent des cellules T et des cellules myéloïdes isolées lors de la sélection CD19+ des LB de la moelle. C. Représentation (tSNE) des LB présents dans cette analyse. D. Expression des marqueurs identitaires de la différenciation lymphocytaire B. Le code couleur reflète le niveau d'expression des gènes. E. Représentation circulaire de l'utilisation des jonctions V-J des cellules circulantes et des cellules médullaires du patient.

## Perspectives

Une mutation présente chez plus de 90% des patients et touchant le gène MYD88 est à l'origine de l'activation constitutive d'une voie de signalisation expliquant la survie et la prolifération des lymphocytes B tumoraux. Cependant la grande hétérogénéité cellulaire et l'absence de modèle d'étude ont limité jusqu'à aujourd'hui l'étude fine des mécanismes à l'origine de la lymphomagenèse et du défaut de différenciation plasmocytaire. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de traiter plus efficacement cette maladie qui reste incurable de nos jours.

Les résultats préliminaires présentés ici ouvrent de nombreuses perspectives d'études. L'analyse rapide des données générées tout récemment permet de valider notre modèle



d'étude et la puissance de la technologie rendant possible l'étude du transcriptome de cellules uniques, isolées de manière massive et parallèle.

## sessionInfo()

R version 3.5.1 (2018-07-02)

Platform: x86\_64-apple-darwin15.6.0 (64-bit)

Running under: macOS 10.14

Matrix products: default

BLAS:

/System/Library/Frameworks/Accelerate.framework/Versions/A/Frameworks/vecLib.framework/Versions/A/libBLAS.dylib

LAPACK: /Library/Frameworks/R.framework/Versions/3.5/Resources/lib/libRlapack.dylib

locale:

[1] en\_US.UTF-8/en\_US.UTF-8/en\_US.UTF-8/C/en\_US.UTF-8/en\_US.UTF-8

attached base packages:

[1] parallel stats4 stats graphics grDevices utils datasets methods base

other attached packages:

[1] biomaRt\_2.38.0      circlize\_0.4.5      HTSFilter\_1.22.1  
[4] cluster\_2.0.7-1    DESeq2\_1.20.0      SummarizedExperiment\_1.12.0  
[7] DelayedArray\_0.8.0    BiocParallel\_1.16.5    matrixStats\_0.54.0  
[10] Biobase\_2.42.0      GenomicRanges\_1.34.0    GenomeInfoDb\_1.18.1  
[13] IRanges\_2.16.0      S4Vectors\_0.20.1      BiocGenerics\_0.28.0  
[16] made4\_1.56.0      scatterplot3d\_0.3-41    ade4\_1.7-13  
[19] Seurat\_2.3.0      Matrix\_1.2-15      cowplot\_0.9.4  
[22] scales\_1.0.0      colorRamps\_2.3      RColorBrewer\_1.1-2  
[25] gplots\_3.0.1.1      ggplot2\_3.1.0

loaded via a namespace (and not attached):

[1] prabclus\_2.2-7      ModelMetrics\_1.2.2    R.methodsS3\_1.7.1    tidy\_0.8.3  
[5] acepack\_1.4.1      bit64\_0.9-7      knitr\_1.21      irlba\_2.3.3  
[9] R.utils\_2.8.0      data.table\_1.12.0    rpart\_4.1-13      RCurl\_1.95-4.11  
[13] generics\_0.0.2      metap\_1.1      snow\_0.4-3      callr\_3.1.1  
[17] usethis\_1.4.0      RSQLite\_2.1.1      RANN\_2.6.1      VGAM\_1.0-6  
[21] combinat\_0.0-8      proxy\_0.4-22      future\_1.12.0      bit\_1.1-14  
[25] lubridate\_1.7.4      assertthat\_0.2.1      viridis\_0.5.1      gower\_0.2.0  
[29] xfun\_0.4      hms\_0.4.2      progress\_1.2.0      DEoptimR\_1.0-8  
[33] caTools\_1.17.1.2    igraph\_1.2.4      DBI\_1.0.0      geneplotter\_1.60.0  
[37] htmlwidgets\_1.3      sparsesvd\_0.1-4      purrr\_0.3.2      dplyr\_0.8.0.1  
[41] backports\_1.1.3      DDRTree\_0.1.5      trimcluster\_0.1-2.1    annotate\_1.60.0  
[45] gbRd\_0.4-11      remotes\_2.0.2      ROCR\_1.0-7      caret\_6.0-83  
[49] withr\_2.1.2      robustbase\_0.93-3    checkmate\_1.9.1      prettyunits\_1.0.2  
[53] mclust\_5.4.2      ape\_5.3      diffusionMap\_1.1-0.1    segmented\_0.5-3.0  
[57] lazyeval\_0.2.2      crayon\_1.3.4      genefilter\_1.64.0      edgeR\_3.24.3  
[61] recipes\_0.1.5      pkgconfig\_2.0.2      slam\_0.1-44      labeling\_0.3  
[65] nlme\_3.1-137      pkgload\_1.0.2      nnet\_7.3-12      devtools\_2.0.1  
[69] rlang\_0.3.2      globals\_0.12.4      diptest\_0.75-7      doSNOW\_1.0.16  
[73] rsvd\_1.0.0      rprojroot\_1.3-2      lmtest\_0.9-36      zoo\_1.8-5  
[77] base64enc\_0.1-3      GlobalOptions\_0.1.0    ggridges\_0.5.1      processx\_3.2.1  
[81] pheatmap\_1.0.12      png\_0.1-7      viridisLite\_0.3.0      bitops\_1.0-6  
[85] R.oo\_1.22.0      KernSmooth\_2.23-15    blob\_1.1.1      shape\_1.4.4  
[89] lars\_1.2      stringr\_1.4.0      memoise\_1.1.0      magrittr\_1.5  
[93] plyr\_1.8.4      ica\_1.0-2      bibtex\_0.4.2      gdata\_2.18.0  
[97] zlibbioc\_1.28.0      compiler\_3.5.1      HSMMSingleCell\_1.2.0    lsei\_1.2-0  
[101] fitdistrplus\_1.0-14    cli\_1.1.0      dtw\_1.20-1      XVector\_0.22.0

[105] listenv\_0.7.0 pbapply\_1.4-0 ps\_1.3.0 htmlTable\_1.13.1  
 [109] Formula\_1.2-3 MASS\_7.3-51.1 tidysselect\_0.2.5 stringi\_1.4.3  
 [113] densityClust\_0.3 yaml\_2.2.0 locfit\_1.5-9.1 latticeExtra\_0.6-28  
 [117] ggrepel\_0.8.0 grid\_3.5.1 tools\_3.5.1 future.apply\_1.2.0  
 [121] rstudioapi\_0.9.0 monocle\_2.10.1 foreach\_1.4.4 foreign\_0.8-71  
 [125] gridExtra\_2.3 prodlim\_2018.04.18 Rtsne\_0.15 BiocManager\_1.30.4  
 [129] digest\_0.6.18 FNN\_1.1.2.2 lava\_1.6.5 qIcMatrix\_0.9.7  
 [133] fpc\_2.1-11.1 Rcpp\_1.0.1 SDMTools\_1.1-221 httr\_1.4.0  
 [137] AnnotationDbi\_1.44.0 npsurv\_0.4-0 kernlab\_0.9-27 Rdpack\_0.10-1  
 [141] colorspace\_1.4-1 XML\_3.98-1.16 fs\_1.2.6 ranger\_0.11.1  
 [145] reticulate\_1.11.1 splines\_3.5.1 flexmix\_2.3-14 plotly\_4.8.0  
 [149] sessioninfo\_1.1.1 xtable\_1.8-3 jsonlite\_1.6 timeDate\_3043.102  
 [153] modeltools\_0.2-22 testthat\_2.0.1 ipred\_0.9-8 tclust\_1.4-1  
 [157] R6\_2.4.0 Hmisc\_4.2-0 pillar\_1.3.1 htmltools\_0.3.6  
 [161] glue\_1.3.1 DESeq\_1.34.1 class\_7.3-15 codetools\_0.2-16  
 [165] pkgbuild\_1.0.2 tsne\_0.1-3 mvtnorm\_1.0-8 lattice\_0.20-38  
 [169] tibble\_2.1.1 mixtools\_1.1.0 gtools\_3.8.1 clipr\_0.5.0  
 [173] survival\_2.43-3 limma\_3.38.3 docopt\_0.6.1 desc\_1.2.0  
 [177] fastICA\_1.2-1 munsell\_0.5.0 GenomeInfoDbData\_1.2.0 iterators\_1.0.10  
 [181] reshape2\_1.4.3 gtable\_0.2.0

## **DISCUSSIONS**

## Discussion Expérimentale - Technologique

Comme aucun système n'est parfait, il est nécessaire d'évaluer les limites des analyses que nous effectuons en recherche. Cette partie du manuscrit s'attachera donc à rapporter les limites (identifiées) de l'étude.

### **Les limites du modèle de différenciation plasmocytaire *in vitro***

Comme évoqué dans l'introduction, la différenciation terminale des LB est un mécanisme fortement impacté par le micro-environnement présent au sein des OLS. Il est évident qu'*in vitro*, nous ne pouvons récapituler l'ensemble des signaux, ni leurs concentrations physiologiques, ni la dynamique de leur action *in vivo*.

Trois signaux sont utilisés conjointement dans la phase d'activation des LB naïfs primaires. L'utilisation d'un Fab'2 anti IgM permet l'activation massive des cellules B sans respect de la spécificité antigénique des cellules. Il est pourtant clairement défini *in vivo* que l'affinité du BCR va induire une signalisation différente et impacter différemment le devenir des cellules<sup>136,402</sup>. De plus, les LB avec une forte affinité vont avoir un avantage compétitif sur les moins affins pour pouvoir recevoir une aide plus forte du LT et ainsi recevoir plus de signaux de différenciation<sup>243</sup>. Ce cercle vertueux d'activation n'est pas reproduit *in vitro*. Malgré cela, l'utilisation du Fab'2 anti IgM nous permet de lisser l'hétérogénéité d'activation au BCR, cette standardisation de la signalisation nous permet de contrôler partiellement le signal délivré aux cellules B et ainsi de réduire l'hétérogénéité d'intégration de ce signal.

Concernant l'utilisation du CD40L, c'est un signal retrouvé très tôt dans l'activation du LB. La limite du modèle est sûrement la concentration, qui est difficilement évaluable *in vivo*, ainsi que peut-être la temporalité du signal, étant donné qu'il est ajouté au même moment que la stimulation BCR. Si le CD40 est exprimé de manière constitutive par le LB, le CD40L délivré par le LT est quant à lui régulé de manière très dynamique car internalisé suite au contact LB/LT et son expression à la membrane n'est stabilisée qu'en réponse à des interactions bidirectionnelles avec le LB. La disponibilité en continu du CD40L les 4 premiers jours d'activation mime artificiellement une interaction forte avec le LT nécessaire à la différenciation plasmocytaire.

L'utilisation du CpG permet dans ce modèle le renforcement de la voie ERK nécessaire à la différenciation plasmocytaire. C'est un signal essentiel dans le modèle car en son absence les LB activés ne prolifèrent pas. Sa représentation et sa fonction *in vivo* est plus floue, les antigènes de faible poids moléculaires peuvent diffuser passivement dans l'OLS et rencontrer les LB<sup>53</sup>, Lanzavecchia décrit ce signal comme le troisième signal nécessaire à la différenciation (avec l'activation du BCR et l'aide du LT)<sup>67</sup>. Il pourrait être intéressant d'identifier les éléments bactériens de type LPS (par dosage), ou des séquences nucléotidiques libre (par PCR) dans des amygdales humaines pour évaluer la relevance de ces signaux *in vivo*

L'IL-2 ajouté dans le milieu avant la première division est nécessaire dans notre modèle pour générer les plasmablastes au 7<sup>ème</sup> jour. Sa production par les LT est décrite comme un événement très précoce, dès son activation. Elle doit être titrée pour permettre la différenciation des LT en TFH et l'expression du récepteur par les LB activés permet l'intégration précoce de ce messenger. Néanmoins, là encore la concentration reste difficile à évaluer. Ce problème de concentration est aussi présent pour l'environnement cytokinique (IL-10/-2/-4) de la deuxième partie de la stimulation.

Pour pallier à ces problèmes, l'une des solutions possibles serait d'utiliser des cellules allogéniques et d'utiliser un super-Antigène pour permettre une intégration des signaux plus physiologique. Sur une différenciation complète, cette solution bien que plus appropriée d'un point de vu physiologique est quand même soumise à des biais expérimentaux. Le ratio cellulaire à appliquer dans les co-cultures est par exemple subjectif. L'activation au super-antigène biaise là aussi la signalisation des BCR liée à l'affinité et rendant la compréhension des mécanismes d'intégration des signaux plus compliquée devant la pléiotropie des signaux connus et non connus mis en jeu.

Une critique pouvant être émise sur ce modèle concerne l'absence d'utilisation de l'IL-21. Cette cytokine pourtant décrite comme la cytokine sécrétée précocement par le TFH induit la différenciation *in vitro et in vivo* chez l'homme<sup>117,134</sup>. Dans notre modèle, cette cytokine induit effectivement un pourcentage de cellules différenciées important. Malgré cela, cette cytokine induit la mort des cellules non différenciées gonflant largement le pourcentage de cellules différenciées dans la culture. Par ailleurs, cette cytokine induit une prolifération plus importante des LB et sensibilise les cellules à l'IL-2 en augmentant l'expression du récepteur à forte affinité pour l'IL-2. La prolifération étant nécessaire à la différenciation, il n'est pas aisé de découpler les effets intrinsèques de la cytokine extérieur à la prolifération. L'IL-21 est

connue pour activer STAT3 et induire l'expression de *PRDM1*, dans notre modèle l'utilisation de l'IL-10 en deuxième partie de stimulation va induire cette activation de STAT3 mimant l'up-régulation tardive de *PRDM1* nécessaire à la maturation des plasmablastes. Comme décrit par le groupe de Tangye, l'addition d'IL-2 et d'IL-21 renforce la différenciation des cellules. Néanmoins, évaluer le rôle de l'IL-2 devient difficile en présence du signal IL-21 car l'IL-2 n'est alors plus le signal limitant pour induire la capacité de différenciation. *In vivo*, il est très probable que différentes cytokines interviennent conjointement ou successivement. Les signalisations IL-2 et l'IL-21 synergisent pour assurer la différenciation, mais dans notre objectif d'évaluer les rôles intrinsèques de l'IL-2 dans la différenciation, nous avons choisi de ne pas ajouter d'IL-21.

### **Les limites de l'étude de la régulation de BACH2 par l'axe de signalisation ERK/ELK1**

Dans cette étude, en utilisant un siRNA contre *BACH2* nous démontrons son importance en tant que frein de la différenciation. Inhérent à l'utilisation des siRNA, l'extinction de l'expression des gènes n'est jamais totale, mais dans cette étude elle permet d'avoir une répression transitoire de l'expression de *BACH2* suffisante pour induire la capacité de différenciation ultérieurement. L'utilisation de ciseaux génomiques comme les CRISPR par exemple aurait pu être envisagée pour induire une délétion constitutive du gène. Malheureusement dans notre cas, l'extinction de *BACH2* nécessite d'être précoce après 2 jours de culture. L'utilisation des CRISPR sur des cellules B primaires nécessite une phase d'expansion intense et Wu et ses collaborateurs <sup>403</sup> décrivent une transfection faible des cellules B quiescentes et activées après 24h induisant une baisse de l'expression de la cible proche des 50%. Ainsi, dans notre cas les siRNA semblent adaptés devant la facilité d'utilisation et les protocoles mis en place au laboratoire.

Afin d'évaluer l'activité de ELK1 sur l'enhancer de *BACH2*, H. Symington a utilisé un système rapporteur luciférase. Dans cette étude, elle démontre une baisse de l'activité transcriptionnelle du promoteur lors de mutations induites sur le site de liaison de ELK1. La limitation ici repose sur l'utilisation d'un système rapporteur *in vitro* dans lequel les séquences régulatrices sont isolées de leur environnement génomique. Néanmoins, cela reste le meilleur système pour évaluer l'activité de l'enhancer devant l'absence d'outils d'édition génomique pouvant insérer une mutation spécifiquement sur ces bases dans l'ADN constitutif des cellules B primaires humaines.

Concernant les analyses du transcriptome dans cette étude, elles ont été faites en comparant les sous-populations de LB activés au quatrième jour de culture : cellules CFSE<sup>low</sup> CD25<sup>hi</sup> traitées à l'IL-2, les cellules CFSE<sup>low</sup> siBACH2 non traités à l'IL2 et les cellules CFSE<sup>low</sup> non traités à l'IL-2. Avec notre recul d'aujourd'hui, il aurait été intéressant d'effectuer ces analyses en single-cell RNAseq, en effet une portion des cellules engagées dans la différenciation est présente dans toutes ces conditions comme en témoigne à J7 la différenciation de ces cellules (**Projet 1-Fig2.F**). Cette proportion de différenciation sans IL-2 par exemple est variable suivant les donneurs, et le tri de la population CFSE<sup>Low</sup> au 4ème jour augmente la proportion de progéniteurs ayant ces capacités de différenciation. Il aurait été intéressant de réduire l'hétérogénéité de ces populations pour avoir une vision plus précise des mécanismes différenciant ces sous-populations et ainsi pouvoir effectuer des comparaisons plus adaptées. Néanmoins, ce bulk-RNAseq nous a permis de mettre en évidence la signature transcriptomique des cellules engagées dans la différenciation grâce à l'IL-2

#### **Les limites de la dynamique d'expression des gènes au cours de la différenciation.**

L'approche populationnelle effectuée grâce à des bulk-RNAseq apporte une profondeur importante permettant de mettre en évidence les transcrits les plus faiblement représentés. Cela met en évidence un nombre de gènes différentiellement exprimés au cours du processus de différenciation très important (près de 15 000 gènes). Les limites d'une approche comme celle-ci est la capacité d'évaluer la pertinence des gènes mis en évidence dans le processus de différenciation *in vitro*. En effet, le modèle de différenciation *in vitro* n'est pas adapté à de larges études d'inactivation ou de surexpression de gènes. Une solution pourrait être d'effectuer une étude d'inactivation de gènes à grande échelle grâce à une banque de guide ARN ciblant l'ensemble des gènes exprimés. En transfectant de manière unique ces guides ARN avec une Cas9 dans une lignée permissive, il serait possible d'évaluer la survie, la prolifération, la réponse à des stimuli chez les cellules clonales délétées pour un gène particulier. Un autre inconvénient de cette approche populationnelle est que nous avons trié des populations enrichies en progéniteurs des plasmablastes. Nous n'avons pas d'informations sur l'hétérogénéité des populations, ni sur la dynamique fine de l'expression des gènes.

Pour pallier à cela, nous avons dans un premier temps effectué des single-cell RNAseq sur les populations triées avec le C1 de chez Fluidigm, seule technologie disponible au laboratoire à

ce moment là de l'étude. Cette technologie permet d'avoir le transcriptome complet des cellules avec un séquençage complet de l'ARN (Full-length mRNAseq). Elle offre la possibilité d'évaluer les variants d'épissages alternatifs présents dans les cellules, les mutations codantes, et le répertoire BCR. Si la mise en œuvre est lourde : chargement de la puce C1, visualisation de la capture d'une cellule unique et vivante pour chacun des 96 pièges de la puce C1, génération d'une librairie par cellule, cette technologie est particulièrement adaptée pour les faibles quantités de cellules nécessitant une profondeur de séquençage important. La sensibilité de détection des transcrits est la meilleure de toutes les technologies développées à ce jour. C'est le résultat de la séparation des différentes étapes réactionnelles qui se réalisent dans des nanovolumes et des chambres distinctes de la puce C1. C'est aussi la technologie la plus coûteuse.

Les limites de cette technique se portent principalement sur l'analyse des données. En effet, le protocole de base fourni par Fluidigm génère des bibliothèques où les molécules d'ARN ne sont pas marquées par des UMI (Unique Molecular Identifier UMI). Ces petites molécules permettant d'enlever les duplicatas de PCR générés lors de la réaction d'amplification des bibliothèques avant séquençage. Ainsi, il faut partir du postulat que la réaction permettant de générer les bibliothèques est de même efficacité pour chaque cellule, mais aussi que l'amplification des bibliothèques avant séquençage générera le même nombre de duplicatas de PCR. Par ailleurs, le débit de cette technologie est faible étant donné que nous ne pouvons réaliser qu'au maximum 96 bibliothèques en 8h (dépendant de l'efficacité de capture dans les puits).

La trajectoire des cellules qui en découlent nous permet donc de comprendre les variations transcriptomiques apparaissant au cours de la différenciation (dynamique d'expression, hiérarchie) pour des gènes peu exprimés comme les facteurs de transcription, mais elle ne nous permet pas d'évaluer les moments décisifs de l'engagement des cellules vers la différenciation. Ceci est lié à la stratégie choisie liée à la technologie "bas débit". En effet, nous avons triés les populations contenant les progéniteurs des plasmablastes, nous avons donc réduit l'hétérogénéité cellulaire en enlevant les cellules qui ne se différencieraient pas. Cette approche n'est pas informative sur les moments décisionnels orientant la cellule vers la différenciation.

Pour répondre à cette question, nous avons effectué une analyse de single cell RNAseq de l'ensemble des cellules en culture à différents temps grâce à la technologie Chromium de 10X genomics. Cette technologie inclue l'utilisation d'UMI mais limite le nombre de transcrits



capturés, ainsi un maximum de 100 000 transcrits est capturé représentant un nombre de gènes plus faible que dans la technologie de chez Fluidigm. Les librairies générées sont-elles aussi différentes, il s'agit dans notre cas d'une librairie permettant de séquencer l'extrémité 5' de l'ARN, couplé à une librairie correspondant aux séquences entières du VDJ des cellules. L'avantage de cette technique est de pouvoir avoir un très grand nombre de cellules analysées pour chacune des fenêtres d'analyse et ainsi d'évaluer les points de décisions orientant vers la différenciation. Les inconvénients de cette technique est qu'il est difficile d'obtenir des transcrits pour les gènes faiblement exprimés comme les facteurs de transcription, cette situation est d'autant plus vraie pour les plasmocytes ou les transcrits des Ig représentent une grande proportion des ARNm et sont donc préférentiellement captés.

Concernant la différenciation de Waldenström, les limites de l'étude sont les mêmes que celles mises en évidence pour la trajectoire normale effectuée en Chromium, 10X Genomics. Nos connaissances sur la différenciation de WM étant plus limitées que sur le versant normal, nous allons agrémenter notre analyse grâce à deux autres trajectoires de différenciation produites à partir de 2 autres patients malade. Enfin, notre différenciation normale est basée sur des lymphocytes B naïfs et la cellule initiale de WM étant supposé être un mémoire IgD+, IgM+ CD27-. Il se peut que nous n'ayons pas la bonne contrepartie. Nous avons opté pour la différenciation de l'ensemble des LB circulants de patients (tumoraux et non tumoraux). Les LB mémoires non mutées dans cette culture serait le meilleur contrôle si nous arrivons à établir une trajectoire comparative avec les cellules mutées du même patient. Dans les précédentes études du laboratoire, il n'a pas été identifié des grosses variations de transcriptomes entre les LB activés *in vitro* issues de LB mémoires ou naïves, cependant la comparaison à l'échelle de la cellule unique n'a pas été faite et il est très probable que la dynamique d'expression des gènes, même au sein d'une culture où les stimuli sont parfaitement contrôlés, soit différente. Néanmoins nos connaissances de la différenciation normale d'un LB naïfs vers un plasmocyte nous permettrons de mieux appréhender les mécanismes dérégulés dans cette pathologie.

## Discussion-Perspectives

### Rôle clé de BACH2 dans la différenciation plasmocytaire

Au cours de ma thèse, nous avons déterminé le rôle de *BACH2* dans un modèle de différenciation *in vitro* de LB naïfs humains en cellules sécrétrices d'anticorps. Son rôle au-delà de la répression de *PRDM1*<sup>164</sup>, FT plasmocytaire, n'était pas connu. BACH2 possède un rôle clé dans la différenciation normale comme le démontre les nombreuses cibles de ce TF mises en évidence par immuno-précipitation de la chromatine. Nous avons mis en évidence près de 4000 gènes possédant un site de liaison de BACH2, des gènes cibles que nous avons validés en utilisant en condition contrôle les LB activés dans lesquels BACH2 est inhibé par siRNA (**Projet 1**). La majorité de ces gènes ont une expression augmentée lorsque BACH2 est inhibé, validant le rôle de répresseur transcriptionnel de ce FT. Ce régulome important est une base de travail solide pour comprendre les mécanismes par lesquels BACH2 régule la différenciation plasmocytaire. Notre approche single cell RNAseq de l'étude de la dynamique transcriptomique du processus de différenciation plasmocytaire, dans le modèle *in vitro* de différenciation de LB naïfs, nous a permis d'identifier la co-expression spécifique et transitoire, au cours de l'activation précoce des LB, d'une partie des gènes cibles de BACH2 (**Projet 2**). Ces gènes ne s'expriment plus dans les PC. Alors que BACH2 est décrit dans la littérature comme un FT réprimant les gènes PC, nos données démontrent (1) que l'expression de BACH2 s'éteint progressivement dans la trajectoire linéaire du processus de différenciation, dès l'activation du BCR, si l'ensemble des signaux de différenciation dont l'IL-2, signal limitant dans notre modèle, est intégré par les LB naïfs, (2) que BACH2 peut-être réexprimé par les LB activés si l'intégration des signaux de différenciation ne permettent pas l'engagement de la cellule vers la différenciation terminale. Cette réexpression dans les LB activés *in vitro* peut être mise en parallèle avec l'expression forte de BACH2 dans les centroblastes du GC. (3) La répression forcée et transitoire de BACH2 par un siRNA, à un stade précoce d'activation des LB naïfs, est suffisante pour induire la capacité de différenciation plasmocytaire. De même une stimulation courte des LB activés, de quelques minutes, avant la première division cellulaire des LB naïfs, par le signal IL-2 de différenciation, est suffisante dans notre modèle pour leur conférer la capacité de différenciation. Or nous montrons que la répression de *BACH2* par l'intégration du signal IL-2 contribue de façon importante à la signature transcriptomique des LB engagées vers la différenciation plasmocytaire, suggérant là encore que BACH2 est impliqué

précocement dans la régulation du transcriptome. L'intégration de tous nos résultats suggère un rôle précoce de BACH2 sur la destinée cellulaire des LB en permettant l'expression transitoire au cours de l'activation du LB de gènes dont l'étude permettra de mieux comprendre les processus d'engagement vers la différenciation plasmocytaire.

De plus, si nos études démontrent qu'une répression forcée et transitoire de BACH2, à un stade précoce de l'activation des LB naïfs humains, modifie la destinée de la cellule après plusieurs divisions, cette inhibition de BACH2 modifie également, et de manière importante la fonction des cellules ainsi différenciées. (1) La diversité des plasmocytes résultant de la recombinaison de classe des immunoglobulines M n'est pas observée. Ceci est à mettre en relation avec le modèle proposé par l'équipe de Muto<sup>170</sup> de l'existence d'une fenêtre temporelle pendant laquelle BACH2 doit être exprimé, permettant l'expression d'AID, l'enzyme clé impliquée dans la recombinaison de classe des immunoglobulines, avant que l'expression de BLIMP1 réprime l'expression d'AID. (2) La différenciation plasmocytaire semble incomplète lorsqu'elle est induite par l'inhibition forcée de *BACH2*. Les plasmablastes générés par inhibition transitoire de BACH2 réexpriment (ou maintiennent l'expression) des marqueurs de l'identité B (*BACH2*, *PAX5*, *BCL6*, *IRF8*, *SPIB*...) alors que l'expression des marqueurs de l'identité plasmocytaires est correctement induite. La liste des gènes différentiellement exprimés dans ces cellules différenciées par le siBACH2 va être intéressante à comparer avec les gènes cibles de BACH2 exprimés tardivement dans le processus de différenciation pour identifier si le maintien d'une expression de BACH2 contribue à ce phénotype. L'expression des TF de l'identité B pourrait être réprimée artificiellement par siRNA dans les cellules ainsi différenciées. Cela permettrait d'évaluer si le phénotype avorté de la différenciation peut être inversé par l'extinction d'un gène en particulier. (3) Les fonctions cellulaires des cellules différenciées sont altérées : hypersécrétion d'IgM, activation constitutive de STAT5, cf Perspectives du [Projet 1](#). Bien que nous ayons observé une activation forte de la voie STAT5 chez les plasmablastes générés par siBACH2, l'inhibition de cette voie diminue significativement l'expression du CD20 à la membrane sans pour autant atteindre le niveau observé dans la condition siCTL. Cela indique qu'il existe sûrement d'autres mécanismes de contrôle de l'état de différenciation qu'il serait intéressant de mettre en évidence. L'analyse comparative des transcriptomes des plasmablastes générés dans ces conditions, IL-2-siCTL et NoIL2-siBACH2 (cf Discussion [Projet 1](#)), apporteront des pistes

d'études. Des inhibiteurs chimiques pourraient être utilisés sur les cellules différenciées par siBACH2 pour évaluer l'importance des interconnexions entre voies de signalisation dans ces cellules. Nous pourrions monitorer l'expression des gènes en regard du traitement avec ces inhibiteurs pour évaluer la réversibilité du phénotype induit par le siBACH2.

### **Voie alterne de différenciation plasmocytaire et/ou processus pathologique ?**

Récemment l'équipe de T. Defrance a identifié, chez la souris, des plasmocytes IgM<sup>+</sup> qui conservent des caractéristiques de LB<sup>404</sup>, et qui sont générés massivement par des antigènes polysaccharidiques T-indépendants, c'est à dire en l'absence de l'aide des LT et donc probablement en l'absence de signal IL-2. Une contrepartie humaine a été mise en évidence par Pinto et ses collaborateurs. Des PC IgM<sup>+</sup> humains générés *in vitro* ou analysés *ex vivo*<sup>405</sup> conservent également l'expression de leur BCR IgM à la membrane. Il est donc possible d'envisager que l'absence de l'aide apportée par les LT, et plus particulièrement d'IL-2, soit l'un des paramètres nécessaires à la génération de ces PC/B IgM<sup>+</sup>. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que l'émergence de cellules à double identité PC/B IgM<sup>+</sup> pourrait résulter d'une voie de différenciation plasmocytaire alterne caractérisée par une extinction précoce de BACH2. A noter que la différenciation plasmocytaire extra-folliculaire, générant majoritairement des PC IgM, n'est pas affectée dans les souris invalidées pour *BACH2*<sup>170</sup>. La qualité de la signalisation BCR pourrait être un paramètre important pour cette voie de différenciation alterne. Il est en effet connu que la réponse TI aux antigènes polysaccharidiques (à l'inverse de la réponse TD) requiert un fort degré d'agrégation du BCR engageant BTK. La voie ERK est aussi activée dans la signalisation du BCR, on peut émettre l'hypothèse qu'un signal BCR fort, BTK-dépendant, induit une activation soutenue et précoce de la voie ERK susceptible d'induire une répression précoce de *BACH2* suffisante pour induire l'engagement vers cette voie alterne de différenciation.

D'un autre point de vue, les cellules engagées vers la différenciation plasmocytaire par l'inhibition précoce de BACH2 peuvent sembler incapables de finaliser le programme de différenciation. Figées à la transition lympho-plasmocytaire, elles partagent de nombreuses similitudes avec les lymphoplasmocytes rencontrés dans la maladie de WM dont la pathogénie reste incomprise. L'expression des marqueurs B persiste malgré l'expression des facteurs plasmocytaires. Ces PC sont CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>low</sup>, ils secrètent de grandes quantités d'IgM. De plus, les PC générés par inhibition transitoire de BACH2 partagent des

caractéristiques fonctionnelles avec les PC tumoraux de WM, ils possèdent une forte activation de la voie STAT5. Cette activation a été décrite par Hodge et ses collaborateurs<sup>358</sup> comme participant à la sécrétion massive des IgM par les cellules de WM. En effet l'inhibition de la voie STAT5 diminue la capacité de sécrétion d'IgM par les cellules de WM de la même manière que dans nos PC générés par inhibition transitoire de *BACH2*. De plus, lorsque nous inhibons la voie STAT5 dans ces PC générés *in vitro* avec le siBACH2, cela entraîne une maturation plasmocytaire (acquisition du marqueur CD138). Il serait intéressant d'inhiber la voie STAT5 dans les cellules de WM poussées en différenciation *in vitro* et étudier l'impact sur le phénotype PC.

Cette homologie entre les phénotypes des PC générés *in vitro* par inhibition transitoire de BACH2 en absence d'IL-2, et les lymphoplasmocytes de WM, suggèrent qu'une dérégulation de l'expression de BACH2 lors des phases précoces d'activation des LB pourrait expliquer la différenciation pathologique à l'origine de la maladie de WM. Or nous avons identifié une région enhancer dans le premier intron de *BACH2* dont l'activité semble liée à la répression de BACH2 dans les phases précoces d'activation des LB. Le séquençage de cette région enhancer a été entreprise dans 25 cas de WM, lymphome plasmablastique et lymphome B diffus à différenciation plasmocytaire. Elle n'a pas permis d'identifier de mutations qui auraient pu contribuer à la dérégulation de l'expression de *BACH2* et potentialiser l'émergence tumorale. Cependant la mutation gain de fonction L256P de MYD88 observée dans la majorité des cas de WM, code une protéine adaptatrice qui recrute les molécules de signalisations aux TLRs contribuant à activer la voie MAPK-ERK-ELK1. La répression précoce de l'expression de *BACH2* par une voie ERK soutenue pourrait engager les cellules vers la différenciation plasmocytaire indépendamment des signaux de différenciation apportés par les LT. De même, la mutation tout récemment identifiée dans le gène *SPI1* codant PU.1 modifie sa capacité à se lier à ses cibles de manière spécifique et lie des séquences normalement reconnues par ELK1<sup>344</sup>. Or, un site de liaison de PU.1 se trouve dans l'enhancer de BACH2, chevauchant le site de liaison de ELK1 qui régule l'activité enhancer. Il n'est pas exclu que la mutation de PU.1 perturbe l'expression dynamique de BACH2.

En conclusion, nos résultats identifient BACH2 comme étant une protéine clef du réseau transcriptionnel contrôlant la différenciation terminale des lymphocytes B en assurant le verrouillage du programme PC. Cela suggère que la régulation dynamique de *BACH2*, au cours

de l'activation des lymphocytes B, par le niveau d'activation de la voie ERK, doit être précisément contrôlée pour éviter une différenciation avortée au stade lymphoplasmocytaire. Le rôle d'une régulation perturbée de BACH2 dans la pathogénie de WM reste à explorer plus en détail. Nous avons initié dans le troisième projet de cette thèse l'étude du processus de différenciation des cellules WM circulantes en réponse à des signaux parfaitement contrôlés, ainsi que l'étude du continuum de différenciation décrite dans la moelle des patients. Ces deux études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique permettront d'apporter des connaissances sur la différenciation plasmocytaire à l'origine de la maladie de WM. Nous avons, grâce aux résultats préliminaires obtenus présentés dans ce manuscrit de thèse, validé la faisabilité technique et la puissance de cette approche pour visualiser la dynamique d'expression des gènes, et les gènes différentiellement exprimés au cours du processus de différenciation pathologique mais aussi par rapport à des cellules saines activées de la même manière *in vitro* ou issues de la moelle de donneurs sains.

Les résultats de l'équipe de X. Leleu suggèrent un rôle important de BACH2 dans l'évolution de la maladie<sup>375</sup>. De manière importante, parmi les 48 gènes identifiés dans leur analyse différentielle comparant l'expression génique entre des cellules de WM à un stade asymptomatique et symptomatique, 20 gènes (soit plus de 41%) sont des cibles directes de BACH2 identifiées par notre analyse ChIPseq, renforçant le rôle clef de BACH2 dans l'évolution de la maladie.

### **Dynamique d'expression au cours de la différenciation normale et pathologique**

Le modèle de différenciation *in vitro* permet d'avoir accès à tous les stades transitoires de différenciation, ces états cellulaires sont difficiles à analyser *in vivo* car les LB activés représentent très peu de cellules. Par ailleurs les signaux de différenciation étant parfaitement contrôlés dans le modèle d'étude *in vitro*, cela réduit l'hétérogénéité des états transitoires de différenciation. Le séquençage de l'ARNm des populations cellulaires contenant les progéniteurs des PC, ou de l'ensemble des cellules uniques présentes dans le puit de culture à chaque jour de la différenciation *in vitro*, nous fournit une carte précise des variations transcriptomiques impliquées dans la génération de PC normaux. L'approche populationnelle permet un séquençage profond et la détection précise de gènes peu exprimés. Le grand nombre de gènes permet plus facilement de mettre en évidence des processus cellulaires, des groupes de gènes régulés de la même manière au cours de la différenciation. Nous sommes

par exemple en train d'évaluer le rôle de *SMARCA4* dans la différenciation plasmocytaire. Bien qu'il ait été démontré qu'il est important pour les phases précoces du développement des LB, il n'y a pas de données sur la différenciation terminale. Le grand nombre de gènes différentiellement exprimés mis en évidence au cours du processus de différenciation (>15 000 LRT test  $p_{adj} < 0.05$ ) ouvre des champs d'exploration très vastes. La capacité d'inactiver des gènes par siRNA dans ce modèle *in vitro* de différenciation étant bien contrôlé au laboratoire, il est aisé d'évaluer dynamiquement l'impact de la répression d'un gène. De même, l'analyse fonctionnelle des séquences ADN régulatrices, développée dans ce modèle, pourrait être couplée aux approches single cell RNAseq, offrant la perspective d'intégrer les mécanismes moléculaires et cellulaires, à l'échelle de la cellule unique, pour mieux comprendre la différenciation PC normale et pathologique.

Dans le cadre de la différenciation normale, le séquençage de l'ARN complet sur cellules uniques nous a permis de mettre en évidence les variations continues de l'expression des gènes gouvernant ou non la différenciation. L'expression des gènes est bien plus finement et dynamiquement régulée que la représentation que nous avons obtenu par séquençage de sous-populations. Une grosse limitation de notre analyse en full-length mRNAseq de cellules uniques est le nombre de cellules capturé par la puce C1 de Fluidigm qui limite l'analyse possible à 96 cellules maximum par point dans le temps, car le programme du système C1 dure 8 heures. Cela ne nous a pas permis d'évaluer les points de décisions d'engagement vers la différenciation. Il va être intéressant d'étudier cela grâce à nos données du séquençage de cellules uniques générées grâce à la technologie haut débit de 10XGenomics. En effet, nous allons avoir accès aux différentes populations de cellules qui ne se différencient pas dans notre modèle de différenciation (celles qui ne prolifèrent pas, celles qui n'intègrent pas tous les signaux et n'atteignent pas le seuil d'activation pour se différencier) et aux populations engagées vers la différenciation. Une analyse de trajectoire branchée nous permettra d'identifier les points de bifurcations des destins cellulaires. Nous allons donc être en mesure d'évaluer les voies de signalisation et les TF qui gouvernent la différenciation. Le design expérimental choisi inclut d'analyser en parallèle la différenciation *in vitro* de LB circulants de patients atteint de la maladie de Waldenström, nous avons généré très récemment les données single-cell RNAseq de la différenciation complète (7 points dans le temps) d'un patient, couplée à l'analyse des cellules B de son compartiment médullaire. Nous allons donc pouvoir comparer les deux trajectoires de différenciation, normale et pathologique, pour

évaluer les différences, sans aucun moyennage de l'expression génique dû à l'analyse de population et des tris cellulaires mal adaptés ne prenant pas en compte l'hétérogénéité cellulaire.

Les trajectoires générées seront en théorie plus robustes que celle présentée dans ce manuscrit grâce au nombre plus important de cellules. Il sera intéressant de comparer le poids du nombre de cellules et celui du nombre de gènes (la technologie 10X détecte en moyenne trois fois moins de gènes sur nos cellules) sur l'analyse de trajectoire. De plus, en prélevant des puits entiers de cellules à chaque point dans le temps de la culture, l'ensemble des stades d'activation et de maturation de ce processus asynchrone de différenciation sera représenté, pouvant impacter l'axe de la trajectoire de différenciation. Ce dataset comporte environ 40 000 cellules. Le volume de données générées est très important et nécessite l'utilisation d'un cluster de calcul pour faire tourner les analyses. Nous pouvons valider l'approche choisie avec les données préliminaires de l'étude de la différenciation avortée de Waldenström présentées dans ce manuscrit. L'exploitation de l'ensemble de ces données permettra d'apporter des éléments de réponses pour diverses questions relatives à la dynamique de la différenciation PC normale, et à l'origine de la maladie de WM. La faisabilité de ces études visant à caractériser des populations hétérogènes rares retrouvées dans des cancers hématologiques a été démontré par l'équipe de Ido Amit en 2018<sup>406</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont caractérisé l'hétérogénéité des plasmocytes présents à différents stades de la progression d'un MGUS vers un myélome multiple, et on mis en évidence des plasmocytes tumoraux résiduels après traitement au Bortézomib. Ces observations renforcent notre conviction qu'il est possible de disséquer finement les événements moléculaires à l'origine de l'hétérogénéité des cellules B dans la pathologie de WM.

### **Autres perspectives dans le modèle de différenciation**

Il serait aussi intéressant de réussir à maintenir les cellules différenciées en vie sur de plus longues durées, nous sommes capables de les garder 8-10 jours en culture. L'utilisation de cellules stromales de la moelle par exemple pourrait peut-être nous permettre d'effectuer des tests de maturation plus poussés sur les cellules différenciées. Nous pourrions évaluer l'augmentation de l'expression du CD138, les capacités de sécrétions, la réactivité des anticorps produits, la dépendance aux signaux du microenvironnement...



### **Approche expérimentale du rôle de l'IL-2 *in vivo***

Nous démontrons ici que les LB activés *in vitro*, dans un système contrôlé, possèdent des phénotypes variés (taille des cellules, capacité de prolifération, capacité de réponse à l'IL-2, capacité de différenciation...). Ces caractéristiques s'expriment selon une dynamique correspondant à un processus progressif au cours duquel se met en place un programme transcriptionnel déterminant le destin du LB plusieurs divisions plus tard.

*In vivo*, cette activation des LB naïfs correspond à une intégration temporelle de signaux résultant de la localisation des LB, de la force et du nombre de contacts réalisés avec les TFH (préTFH et TFH), et du phénotype très hétérogène de ces TFH<sup>407</sup>. Selon leurs localisations micro-anatomiques, les interactions cellulaires qu'ils subissent, dont les interactions bidirectionnelles avec les LB activés, les TFH ont des fonctions modifiées. Les études de cette "population" TFH réalisées à partir de tissus homogénéisés, correspondent donc à une analyse moyennée des multiples phénotypes de cellules prises à différents temps de leur processus de développement initié par l'activation antigénique du TCR de LT CD4+ et de leur co-stimulation par les DC et par des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-21. Cette hétérogénéité des TFH explique en partie l'hétérogénéité des LB activés. Une meilleure connaissance de la temporalité de la différenciation des TFH permettra une meilleure compréhension de la temporalité de l'activation des LB.

Un autre acteur critique de la différenciation TFH est l'IL-2. En effet une étude récente démontre que les progéniteurs des TFH secrètent de l'IL-2 qui inhibe la différenciation TFH des cellules T activées qui ne produisent pas d'IL-2<sup>130</sup>. Il sera intéressant d'étudier la temporalité de ce signal IL-2 délivré par les progéniteurs des TFH avec l'engagement des LB activés dans le processus de différenciation terminale. Les TFH sont nécessaires à la génération et au maintien des GC, mais sont également essentielles à la réponse T dépendante extrafolliculaire correspondant à une différenciation rapide des LB en plasmocytes à courte durée de vie et en cellules mémoires. En lien avec le rôle précoce de l'IL-2 dans l'engagement vers la différenciation plasmocytaire identifié dans notre étude, l'IL-2 pourrait promouvoir la différenciation extrafolliculaire au dépend de la formation des GC. En effet l'expression de BACH2 s'éteint progressivement lorsque la cellule est engagée vers la différenciation plasmocytaire (nos données), elle est au contraire très forte dans les centroblastes du GC.

Par ailleurs une sous-population de TFH engagés dans les conjugués B/T au sein des GC d'amygdales humaines, exprime le récepteur IL2RA et répond à l'IL-2, ce qui permet

d'augmenter les fonctions helper des TFH (augmentation de l'expression d'ICOS, OX40, IL-21, IL-10...<sup>256</sup>). Ainsi une production locale d'IL-2 dans le GC pourrait favoriser la différenciation plasmocytaire par un mécanisme impliquant la modification des fonctions effectrices des TFH. L'hypothèse de l'existence d'un mécanisme intrinsèque aux LB du GC et d'un rôle sur la différenciation plasmocytaire et/ou mémoire n'est pas exclue. L'expression de BACH2 devant être maintenue pour la différenciation en LB mémoire<sup>269</sup>. Dans cette étude il est aussi démontré que le niveau d'expression de BACH2 dans les B du GC est inversement corrélé à la force de l'aide reçue par les TFH. L'IL-2 pourrait intervenir dans cette synapse B du GC/TFH, orientant vers un destin plasmocytaire du LB.

Le rôle de l'IL-2 sur le LB est peu documenté *in vivo*, ce qui s'explique par l'absence de modèles murins permettant de disséquer finement les mécanismes intrinsèques aux cellules B mis en jeu lors d'une invalidation constitutive de l'IL-2 ou de son récepteur. Une approche expérimentale *in vivo* est menée dans le groupe, elle consiste à étudier la fonctionnalité de la signalisation IL-2 dans la réponse immunitaire par un mécanisme intrinsèque aux cellules B. L'équipe a généré des souris floxées pour le gène *IL2rb*, une sous unité du récepteur à l'IL-2, qui sont croisées avec des souris Cre spécifiques pour invalider la signalisation IL-2 spécifiquement dans les cellules B, à différentes étapes du processus d'activation des LB (LB matures versus LB du GC). Les résultats apportés par l'étude de ce modèle murin permettront de statuer sur l'importance du rôle de cet axe IL-2/ERK /BACH2 sur la destinée des LB *in vivo* aux deux étapes de la réponse immune impliquant les conjugués B/T : après l'étape d'initiation de la réponse immune, dans la zone extrafolliculaire, et plus tardivement dans la zone claire des GC.

Les avancées technologiques permettent aujourd'hui de mener des études qui n'étaient pas envisageables au début de ma thèse. Ces avancées rapides dans le domaine de l'analyse sur cellules uniques sont dues à la communauté scientifique qui est en constante ébullition autour de ce sujet. Ainsi, il est maintenant possible d'évaluer l'expression protéique de dizaines de marqueurs à la surface de la cellule couplée au transcriptome de celle-ci (CITE-seq<sup>408</sup>). L'aspect épigénétique sur cellule unique est largement couvert grâce à des protocoles d'analyse ATAC-seq sur cellule unique commercialisés par 10Xgenomics par exemple. Plus récemment, un groupe de recherche a mis en place un protocole d'analyse des marques histones sur cellules

uniques<sup>409</sup>. Des protocoles de single-cell RNAseq *in situ* sont actuellement en développement<sup>410,411</sup>. L'ensemble de ces nouvelles technologies s'appuie sur une communauté de développeur importante qui permettent de générer des pipelines, des packages permettant l'analyse plus ou moins aisée des jeux de données. Ces méthodes d'analyses devant s'adapter continuellement aux contraintes induites par les technologies (nombre de cellules, méthodes de séquençage, design expérimental...), certaines méthodes deviennent inutilisables et sont très rapidement remplacée par des méthodes plus stables, plus flexible, plus performante nécessitant une veille scientifique importante. Nous espérons que les études initiées au cours de cette thèse ouvriront un immense champ d'investigations pour les années futures dans le cadre de la compréhension de la différenciation terminale des LB.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

1. Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 107–116 (2006).
2. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
3. Wardemann, H. *et al.* Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* **301**, 1374–1377 (2003).
4. Nie, Y. *et al.* The Role of CXCR4 in Maintaining Peripheral B Cell Compartments and Humoral Immunity. *J. Exp. Med.* **200**, 1145–1156 (2004).
5. Beck, T. C., Gomes, A. C., Cyster, J. G. & Pereira, J. P. CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *J. Exp. Med.* **211**, 2567–2581 (2014).
6. Pereira, J. P., Cyster, J. G. & Xu, Y. A Role for S1P and S1P1 in Immature-B Cell Egress from Mouse Bone Marrow. *PLOS ONE* **5**, e9277 (2010).
7. Suryani, S. & Tangye, S. G. Therapeutic implications of advances in our understanding of transitional B-cell development in humans. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **6**, 765–775 (2010).
8. Palanichamy, A. *et al.* Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 5982–5993 (2009).
9. Carsetti, R., Köhler, G. & Lamers, M. C. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* **181**, 2129–2140 (1995).
10. Monroe, J. G. Balancing signals for negative selection and activation of developing B lymphocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **95**, S8-13 (2000).
11. Luning Prak, E. T., Monestier, M. & Eisenberg, R. A. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1217**, 96–121 (2011).
12. Merrell, K. T. *et al.* Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity* **25**, 953–962 (2006).
13. Eris, J. M. *et al.* Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4392–4396 (1994).
14. Goodnow, C. C. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 489–518 (1992).
15. Goodnow, C. C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676–682 (1988).
16. Bannish, G., Fuentes-Pananá, E. M., Cambier, J. C., Pear, W. S. & Monroe, J. G. Ligand-independent Signaling Functions for the B Lymphocyte Antigen Receptor and Their Role in Positive Selection during B Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* **194**, 1583–1596 (2001).
17. Loder, B. F. *et al.* B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. *J. Exp. Med.* **190**, 75–90 (1999).
18. Turner, M. *et al.* Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J. Exp. Med.* **186**, 2013–2021 (1997).
19. Getahun, A., O’Neill, S. K. & Cambier, J. C. Establishing Anergy as a Bona Fide In Vivo Mechanism of B Cell Tolerance. *J. Immunol.* **183**, 5439–5441 (2009).
20. Goodnow, C. C., Crosbie, J., Jorgensen, H., Brink, R. A. & Basten, A. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* **342**, 385–391 (1989).
21. Cheema, G. S., Roschke, V., Hilbert, D. M. & Stohl, W. Elevated serum B lymphocyte

- stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **44**, 1313–1319 (2001).
22. Lesley, R. *et al.* Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. *Immunity* **20**, 441–453 (2004).
  23. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
  24. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 160–171 (2015).
  25. Taylor, J. J., Pape, K. A., Steach, H. R. & Jenkins, M. K. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell. *Science* **347**, 784–787 (2015).
  26. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 172–184 (2015).
  27. Milpied, P. *et al.* Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* **19**, 1013 (2018).
  28. von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 867–878 (2003).
  29. Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 127–159 (2005).
  30. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
  31. Drenckhahn, D. & Benninghoff, A. *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Bd. 1.* (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2002).
  32. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 606–616 (2005).
  33. Cesta, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol. Pathol.* **34**, 599–608 (2006).
  34. Nossal, G. J. V., Abbot, A., Mitchell, J. & Lummus, Z. Antigens in Immunity: Xv. Ultrastructural Features of Antigen Capture in Primary and Secondary Lymphoid Follicles. *J. Exp. Med.* **127**, 277–290 (1968).
  35. Carrasco, Y. R. & Batista, F. D. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 286–291 (2006).
  36. Depoil, D. *et al.* CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat. Immunol.* **9**, 63–72 (2008).
  37. Heesters, B. A., Myers, R. C. & Carroll, M. C. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 495–504 (2014).
  38. Kosco-Vilbois, M. H., Gray, D., Scheidegger, D. & Julius, M. Follicular dendritic cells help resting B cells to become effective antigen-presenting cells: induction of B7/BB1 and upregulation of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **178**, 2055–2066 (1993).
  39. Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T. G., Kelly, L. M. & Cyster, J. G. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1485–1493 (2009).
  40. Hannum, L. G., Haberman, A. M., Anderson, S. M. & Shlomchik, M. J. Germinal Center Initiation, Variable Gene Region Hypermutation, and Mutant B Cell Selection without Detectable Immune Complexes on Follicular Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **192**, 931–942 (2000).

41. Batista, F. D., Iber, D. & Neuberger, M. S. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489–494 (2001).
42. Carrasco, Y. R. & Batista, F. D. B Cells Acquire Particulate Antigen in a Macrophage-Rich Area at the Boundary between the Follicle and the Subcapsular Sinus of the Lymph Node. *Immunity* **27**, 160–171 (2007).
43. Junt, T. *et al.* Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**, 110–114 (2007).
44. Koppel, E. A. *et al.* Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2962–2969 (2005).
45. Kellermayer, Z. *et al.* Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 436–449 (2014).
46. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
47. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
48. Baumjohann, D., Okada, T. & Ansel, K. M. Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. *J. Immunol.* **187**, 2089–2092 (2011).
49. Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A. & Clynes, R. Cell Surface Recycling of Internalized Antigen Permits Dendritic Cell Priming of B Cells. *Immunity* **23**, 503–514 (2005).
50. Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C. & Germain, R. N. Extrafollicular Activation of Lymph Node B Cells by Antigen-Bearing Dendritic Cells. *Science* **312**, 1672–1676 (2006).
51. Mora, J. R. *et al.* Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science* **314**, 1157–1160 (2006).
52. Phan, T. G., Grigorova, I., Okada, T. & Cyster, J. G. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* **8**, 992–1000 (2007).
53. Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A. & Jenkins, M. K. The Humoral Immune Response Is Initiated in Lymph Nodes by B Cells that Acquire Soluble Antigen Directly in the Follicles. *Immunity* **26**, 491–502 (2007).
54. Roozendaal, R. *et al.* Conduits Mediate Transport of Low-Molecular-Weight Antigen to Lymph Node Follicles. *Immunity* **30**, 264–276 (2009).
55. Maity, P. C. *et al.* B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation. *Sci. Signal.* **8**, ra93 (2015).
56. Tolar, P., Sohn, H. W. & Pierce, S. K. The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Immunol.* **6**, 1168–1176 (2005).
57. Tolar, P., Hanna, J., Krueger, P. D. & Pierce, S. K. The constant region of the membrane immunoglobulin mediates B-cell receptor clustering and signaling in response to membrane antigens. *Immunity* **30**, 44–55 (2009).
58. Treanor, B. *et al.* The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity* **32**, 187–199 (2010).
59. Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A. & Lennon-Duménil, A.-M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 475–486 (2013).

60. Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Köhler, G. & Lamers, M. C. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr. Biol.* **7**, 133–143 (1997).
61. Justement, L. B. & Siminovitch, K. A. *Signal Transduction and the Coordination of B Lymphocyte Development and Function I: Transduction of BCR Signals from the Cell Membrane to the Nucleus*. (Springer Science & Business Media, 2012).
62. Huntington, N. D. & Tarlinton, D. M. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* **94**, 167–174 (2004).
63. Okada, M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 1385–1397 (2012).
64. Bojarczuk, K. *et al.* B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies. *Blood Cells. Mol. Dis.* **55**, 255–265 (2015).
65. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
66. Bekeredjian-Ding, I. & Jegou, G. Toll-like receptors – sentries in the B-cell response. *Immunology* **128**, 311–323 (2009).
67. Ruprecht, C. R. & Lanzavecchia, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 810–816 (2006).
68. Leadbetter, E. A. *et al.* Chromatin–IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603 (2002).
69. Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L. & Wei, W. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
70. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
71. Liu, X. *et al.* Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* **507**, 513–518 (2014).
72. McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N. & McHeyzer-Williams, L. Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 24–34 (2011).
73. Natkanski, E. *et al.* B Cells Use Mechanical Energy to Discriminate Antigen Affinities. *Science* **340**, 1587–1590 (2013).
74. Yuseff, M.-I. *et al.* Polarized Secretion of Lysosomes at the B Cell Synapse Couples Antigen Extraction to Processing and Presentation. *Immunity* **35**, 361–374 (2011).
75. Moss, C. X., Tree, T. I. & Watts, C. Reconstruction of a pathway of antigen processing and class II MHC peptide capture. *EMBO J.* **26**, 2137–2147 (2007).
76. Stoddart, A. *et al.* Lipid Rafts Unite Signaling Cascades with Clathrin to Regulate BCR Internalization. *Immunity* **17**, 451–462 (2002).
77. Drake, L., McGovern-Brindisi, E. M. & Drake, J. R. BCR ubiquitination controls BCR-mediated antigen processing and presentation. *Blood* **108**, 4086–4093 (2006).
78. Chaturvedi, A., Martz, R., Dorward, D., Waisberg, M. & Pierce, S. K. Endocytosed BCRs sequentially regulate MAPK and Akt signaling pathways from intracellular compartments. *Nat. Immunol.* **12**, 1119–1126 (2011).
79. Reif, K. *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94–99 (2002).
80. Rodda, L. B. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* **48**, 1014–1028.e6 (2018).
81. Chattopadhyay, P. K., Yu, J. & Roederer, M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with diverse cytokine profiles. *Nat. Med.* **11**, 1113–1117 (2005).
82. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in



- the immune system. *Immunol. Rev.* **229**, (2009).
83. Hanissian, S. H. & Geha, R. S. Jak3 Is Associated with CD40 and Is Critical for CD40 Induction of Gene Expression in B Cells. *Immunity* **6**, 379–387 (1997).
  84. Renshaw, B. R. *et al.* Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1889–1900 (1994).
  85. Kawabe, T. *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **1**, 167–178 (1994).
  86. Lee, B. O. *et al.* CD40, but Not CD154, Expression on B Cells Is Necessary for Optimal Primary B Cell Responses. *J. Immunol.* **171**, 5707–5717 (2003).
  87. Ochs, H. D., Hollenbaugh, D. & Aruffo, A. The role of CD40L (gp39)/CD40 in T/B cell interaction and primary immunodeficiency. *Semin. Immunol.* **6**, 337–341 (1994).
  88. Skov, S., Bonyhadi, M., Ødum, N. & Ledbetter, J. A. IL-2 and IL-15 Regulate CD154 Expression on Activated CD4 T Cells. *J. Immunol.* **164**, 3500–3505 (2000).
  89. Hawkins, E. D. *et al.* Quantal and graded stimulation of B lymphocytes as alternative strategies for regulating adaptive immune responses. *Nat. Commun.* **4**, 2406 (2013).
  90. Wang, S. *et al.* Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* **96**, 2808–2813 (2000).
  91. Choi, Y. S. *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* **34**, 932–946 (2011).
  92. Xu, H. *et al.* Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* **496**, 523–527 (2013).
  93. Liu, D. *et al.* T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* **517**, 214–218 (2015).
  94. Ma, C. S., Nichols, K. E. & Tangye, S. G. Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by the SLAM and SAP Families of Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 337–379 (2007).
  95. De Salort, J., Sintès, J., Llinàs, L., Matesanz-Isabel, J. & Engel, P. Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: from pro-B to plasma cells. *Immunol. Lett.* **134**, 129–136 (2011).
  96. Morra, M. *et al.* X-LINKED LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE : A Progressive Immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 657–682 (2001).
  97. Crotty, S., Kersh, E. N., Cannons, J., Schwartzberg, P. L. & Ahmed, R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* **421**, 282 (2003).
  98. Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L. & Germain, R. N. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* **455**, 764–769 (2008).
  99. Yurchenko, M. Y. *et al.* CD150 regulates JNK1/2 activation in normal and Hodgkin's lymphoma B cells. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 565–574 (2010).
  100. Gururajan, M. *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *Blood* **106**, 1382–1391 (2005).
  101. Klyushnenkova, E. N., Li, L., Armitage, R. J. & Choi, Y. S. CD48 Delivers an Accessory Signal for CD40-Mediated Activation of Human B Cells. *Cell. Immunol.* **174**, 90–98 (1996).
  102. Zaretsky, I. *et al.* ICAMs support B cell interactions with T follicular helper cells and promote clonal selection. *J. Exp. Med.* **214**, 3435–3448 (2017).
  103. Vogelzang, A. *et al.* A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T

- Follicular Helper Cells. *Immunity* **29**, 127–137 (2008).
104. Haberman, A. M., Gonzalez, D. G., Wong, P., Zhang, T. & Kerfoot, S. M. Germinal center B cell initiation, GC maturation, and the coevolution of its stromal cell niches. *Immunol. Rev.* **288**, 10–27 (2019).
105. Suh, W.-K. Life of T Follicular Helper Cells. *Mol. Cells* **38**, 195–201 (2015).
106. Weinstein, J. S. *et al.* T<sub>FH</sub> cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197–1205 (2016).
107. Toellner, K.-M. Cognate interactions: Extrafollicular IL-4 drives germinal-center reactions, a new role for an old cytokine. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1917–1920 (2014).
108. Chevrier, S., Kratina, T., Emslie, D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 925–932 (2017).
109. Spolski, R., Gromer, D. & Leonard, W. J. The  $\gamma$ c family of cytokines: fine-tuning signals from IL-2 and IL-21 in the regulation of the immune response. *F1000Research* **6**, 1872 (2017).
110. Leonard, W. J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 688–698 (2005).
111. Fornek, J. L. *et al.* Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. *Blood* **107**, 1085–1091 (2006).
112. Ozaki, K. *et al.* A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* **298**, 1630–1634 (2002).
113. Kuhn, R., Rajewsky, K. & Muller, W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* **254**, 707–710 (1991).
114. Linterman, M. A. *et al.* IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* **207**, 353–363 (2010).
115. Jin, H., Carrio, R., Yu, A. & Malek, T. R. Distinct Activation Signals Determine whether IL-21 Induces B Cell Costimulation, Growth Arrest, or Bim-Dependent Apoptosis. *J. Immunol.* **173**, 657–665 (2004).
116. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
117. Bryant, V. L. *et al.* Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5+ T Follicular Helper Cells. *J. Immunol.* **179**, 8180–8190 (2007).
118. Wensveen, F. M., Slinger, E., van Attekum, M. H., Brink, R. & Eldering, E. Antigen-affinity controls pre-germinal center B cell selection by promoting Mcl-1 induction through BAFF receptor signaling. *Sci. Rep.* **6**, 35673 (2016).
119. Andrews, A.-L., Holloway, J. W., Holgate, S. T. & Davies, D. E. IL-4 Receptor  $\alpha$  Is an Important Modulator of IL-4 and IL-13 Receptor Binding: Implications for the Development of Therapeutic Targets. *J. Immunol.* **176**, 7456–7461 (2006).
120. Turqueti-Neves, A. *et al.* B-cell-intrinsic STAT6 signaling controls germinal center formation. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2130–2138 (2014).
121. Rush, J. S. & Hodgkin, P. D. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1150–1159 (2001).
122. Kashiwada, M. *et al.* IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 821–826 (2010).
123. Wurster, A. L., Rodgers, V. L., White, M. F., Rothstein, T. L. & Grusby, M. J.

- Interleukin-4-mediated Protection of Primary B Cells from Apoptosis through Stat6-dependent Up-regulation of Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **277**, 27169–27175 (2002).
124. Waldmann, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 595–601 (2006).
125. Willerford, D. M. *et al.* Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* **3**, 521–530 (1995).
126. Suzuki, H. *et al.* Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* **268**, 1472–1476 (1995).
127. Recher, M. *et al.* IL-21 is the primary common  $\gamma$  chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood* **118**, 6824–6835 (2011).
128. Sojka, D. K., Bruniquel, D., Schwartz, R. H. & Singh, N. J. IL-2 Secretion by CD4+ T Cells In Vivo Is Rapid, Transient, and Influenced by TCR-Specific Competition. *J. Immunol.* **172**, 6136–6143 (2004).
129. Johnson-Léger, C., Christenson, J. R., Holman, M. & Klaus, G. G. B. Evidence for a Critical Role for IL-2 in CD40-Mediated Activation of Naive B Cells by Primary CD4 T Cells. *J. Immunol.* **161**, 4618–4626 (1998).
130. DiToro, D. *et al.* Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science* **361**, (2018).
131. Li, J., Lu, E., Yi, T. & Cyster, J. G. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* **533**, 110–114 (2016).
132. Gasteiger, G. & Kastenmuller, W. Foxp3+ Regulatory T-cells and IL-2: The Moirai of T-cell Fates? *Front. Immunol.* **3**, (2012).
133. Le Gallou, S. *et al.* IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 161–173 (2012).
134. Berglund, L. J. *et al.* IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* **122**, 3940–3950 (2013).
135. Teranishi, T., Hirano, T., Lin, B. H. & Onoue, K. Demonstration of the involvement of interleukin 2 in the differentiation of Staphylococcus aureus Cowan I-stimulated B cells. *J. Immunol.* **133**, 3062–3067 (1984).
136. Paus, D. *et al.* Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* **203**, 1081–1091 (2006).
137. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells: BCL6 role in GC B cells. *Immunol. Rev.* **247**, 172–183 (2012).
138. Cerchiatti, L. & Melnick, A. TARGETING BCL-6 IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: WHAT DOES THIS MEAN FOR THE FUTURE TREATMENT? *Expert Rev. Hematol.* **6**, 343–345 (2013).
139. Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. & Staudt, L. M. Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science* **276**, 589–592 (1997).
140. Crotty, S., Johnston, R. J. & Schoenberger, S. P. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* **11**, 114–120 (2010).
141. Fukuda, T. *et al.* Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *J. Exp. Med.* **186**, 439–448 (1997).
142. Kitano, M. *et al.* Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* **34**, 961–972 (2011).
143. Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C. R. & Brink, R. Guidance of B cells by the

- orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity* **31**, 259–269 (2009).
144. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster, J. G. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* **460**, 1122–1126 (2009).
145. Carotta, S. *et al.* The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J. Exp. Med.* **211**, 2169–2181 (2014).
146. Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**, 199–212 (2000).
147. Tunyaplin, C. *et al.* Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 1158–1165 (2004).
148. Cimmino, L. *et al.* Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of *ifng*, *tbx21*, and *bcl6* gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 2338–2347 (2008).
149. Saito, M. *et al.* A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* **12**, 280–292 (2007).
150. Basso, K. *et al.* Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* **115**, 975–984 (2010).
151. Phan, R. T. & Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635 (2004).
152. Feng, J. *et al.* IFN Regulatory Factor 8 Restricts the Size of the Marginal Zone and Follicular B Cell Pools. *J. Immunol.* **186**, 1458–1466 (2011).
153. Pathak, S., Ma, S., Shukla, V. & Lu, R. A role for IRF8 in B cell anergy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, (2013).
154. Xu, H. *et al.* Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nat. Immunol.* **16**, 1274–1281 (2015).
155. Wang, D. *et al.* Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease. *Int. Immunol.* **17**, 1179–1191 (2005).
156. John, S. A., Clements, J. L., Russell, L. M. & Garrett-Sinha, L. A. Ets-1 Regulates Plasma Cell Differentiation by Interfering with the Activity of the Transcription Factor Blimp-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 951–962 (2008).
157. John, S. *et al.* Transcription Factor Ets1, but Not the Closely Related Factor Ets2, Inhibits Antibody-Secreting Cell Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 522–532 (2014).
158. Luo, W. *et al.* A Balance between B Cell Receptor and Inhibitory Receptor Signaling Controls Plasma Cell Differentiation by Maintaining Optimal Ets1 Levels. *J. Immunol.* **193**, 909–920 (2014).
159. Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. & Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573–1577 (1994).
160. Su, G. H. *et al.* Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *EMBO J.* **16**, 7118–7129 (1997).
161. Yasuda, T. *et al.* ERKs Induce Expression of the Transcriptional Repressor Blimp-1 and Subsequent Plasma Cell Differentiation. *Sci Signal* **4**, ra25–ra25 (2011).
162. Hipp, N. *et al.* IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nat. Commun.* **8**, 1443 (2017).
163. Huang, C., Geng, H., Boss, I., Wang, L. & Melnick, A. Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation. *Blood* **123**, 1012–

1020 (2014).

164. Tanaka, H. *et al.* Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* **291**, 6316–6330 (2016).
165. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. & Busslinger, M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* **8**, 463 (2007).
166. Horcher, M., Souabni, A. & Busslinger, M. Pax5/BSAP Maintains the Identity of B Cells in Late B Lymphopoiesis. *Immunity* **14**, 779–790 (2001).
167. Schebesta, A. *et al.* Transcription Factor Pax5 Activates the Chromatin of Key Genes Involved in B Cell Signaling, Adhesion, Migration, and Immune Function. *Immunity* **27**, 49–63 (2007).
168. Johanson, T. M. *et al.* Transcription-factor-mediated supervision of global genome architecture maintains B cell identity. *Nat. Immunol.* **19**, 1257–1264 (2018).
169. Andrey, G. & Mundlos, S. The three-dimensional genome: regulating gene expression during pluripotency and development. *Development* **144**, 3646–3658 (2017).
170. Muto, A. *et al.* The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* **429**, 566 (2004).
171. Muto, A. *et al.* Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J.* **29**, 4048–4061 (2010).
172. Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., Takahashi, S. & Igarashi, K. Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *Int. Immunol.* **20**, 453–460 (2008).
173. Gonda, H. *et al.* The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* **198**, 1427–1437 (2003).
174. Wöhner, M. *et al.* Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *J. Exp. Med.* **213**, 1201–1221 (2016).
175. Morgan, M. A. J., Mould, A. W., Li, L., Robertson, E. J. & Bikoff, E. K. Alternative Splicing Regulates Prdm1/Blimp-1 DNA Binding Activities and Corepressor Interactions. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3403–3413 (2012).
176. Turner, C. A., Mack, D. H. & Davis, M. M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297–306 (1994).
177. Lin, Y., Wong, K. & Calame, K. Repression of c-myc Transcription by Blimp-1, an Inducer of Terminal B Cell Differentiation. *Science* **276**, 596–599 (1997).
178. Kallies, A. *et al.* Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **26**, 555–566 (2007).
179. Shaffer, A. L. *et al.* Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity* **17**, 51–62 (2002).
180. Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C. & Calame, K. Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4771–4780 (2002).
181. Tellier, J. *et al.* Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* **17**, 323–330 (2016).
182. Mittrücker, H.-W. *et al.* Requirement for the Transcription Factor LSIRF/IRF4 for Mature B and T Lymphocyte Function. *Science* **275**, 540–543 (1997).
183. Willis, S. N. *et al.* Transcription Factor IRF4 Regulates Germinal Center Cell Formation through a B Cell–Intrinsic Mechanism. *J. Immunol.* **192**, 3200–3206 (2014).

184. Casola, S. *et al.* Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7396–7401 (2006).
185. Sciammas, R. *et al.* Graded Expression of Interferon Regulatory Factor-4 Coordinates Isotype Switching with Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **25**, 225–236 (2006).
186. Bettigole, S. E. & Glimcher, L. H. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 107–138 (2015).
187. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881–891 (2001).
188. Shaffer, A. L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81–93 (2004).
189. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782 (2006).
190. Todd, D. J. *et al.* XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* **206**, 2151–2159 (2009).
191. Shen, Y. & Hendershot, L. M. Identification of ERdj3 and OBF-1/BOB-1/OCA-B as direct targets of XBP-1 during plasma cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 2969–2978 (2007).
192. Schubart, K. *et al.* B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1. *Nat. Immunol.* **2**, 69–74 (2001).
193. Hess, J., Nielsen, P. J., Fischer, K.-D., Bujard, H. & Wirth, T. The B Lymphocyte-Specific Coactivator BOB.1/OBF.1 Is Required at Multiple Stages of B-Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1531–1539 (2001).
194. Schubart, D. B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M. H., Botteri, F. & Matthias, P. B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* **383**, 538–542 (1996).
195. Corcoran, L. M. *et al.* Differential requirement for OBF-1 during antibody-secreting cell differentiation. *J. Exp. Med.* **201**, 1385–1396 (2005).
196. Bartholdy, B. *et al.* The Ets factor Spi-B is a direct critical target of the coactivator OBF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11665–11670 (2006).
197. Covens, K. *et al.* Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood* **121**, 5176–5183 (2013).
198. Quách, T. D. *et al.* Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. *J. Immunol.* **196**, 1060–1069 (2016).
199. Klein, U., Rajewsky, K. & Küppers, R. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1679–1689 (1998).
200. Weller, S. *et al.* CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1166–1170 (2001).
201. Weller, S. *et al.* Human blood IgM ‘memory’ B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647–3654 (2004).
202. Wu, Y.-C. *et al.* High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes

- between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* **116**, 1070–1078 (2010).
203. Saito, T. *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**, 675–685 (2003).
204. Hammad, H. *et al.* Transitional B cells commit to marginal zone B cell fate by Taok3-mediated surface expression of ADAM10. *Nat. Immunol.* (2017). doi:10.1038/ni.3657
205. Zhao, Y. *et al.* Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nat. Commun.* **9**, 3857 (2018).
206. Weller, S. *et al.* Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+IgD+CD27+ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* **205**, 1331–1342 (2008).
207. Haas, K. M., Poe, J. C. & Tedder, T. F. CD21/35 promotes protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a complement-independent but CD19-dependent pathway that regulates PD-1 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 3661–3671 (2009).
208. Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 118–132 (2013).
209. Weill, J.-C., Weller, S. & Reynaud, C.-A. Human Marginal Zone B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 267–285 (2009).
210. He, B. *et al.* TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor protein MyD88. *Nat. Immunol.* **11**, 836–845 (2010).
211. Pack, M. *et al.* DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology* **123**, 438–446 (2008).
212. Jones, D. D., Wilmore, J. R. & Allman, D. Cellular dynamics of memory B cell populations: IgM+ and IgG+ memory B cells persist indefinitely as quiescent cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 4753–4759 (2015).
213. Alouche, N. *et al.* Cxcr4 desensitization is an essential regulatory mechanism controlling the extra-follicular B cell response. *bioRxiv* (2019). doi:10.1101/537761
214. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
215. Sintès, J. *et al.* mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nat. Commun.* **8**, 1462 (2017).
216. Auner, H. W., Beham-Schmid, C., Dillon, N. & Sabbattini, P. 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**, 3445–3455 (2010).
217. Gatto, D. & Brink, R. B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends Immunol.* **34**, 336–341 (2013).
218. Zhang, T. *et al.* Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help. *eLife* (2017). doi:10.7554/eLife.19552
219. Kim, S. J. *et al.* Increased IL-12 inhibits B cells' differentiation to germinal center cells and promotes differentiation to short-lived plasmablasts. *J. Exp. Med.* **205**, 2437–2448 (2008).
220. Toyama, H. *et al.* Memory B Cells without Somatic Hypermutation Are Generated from Bcl6-Deficient B Cells. *Immunity* **17**, 329–339 (2002).
221. Taylor, J. J., Pape, K. A. & Jenkins, M. K. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* **209**, 597–

606 (2012).

222. Weisel, F. J., Zuccarino-Catania, G. V., Chikina, M. & Shlomchik, M. J. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* **44**, 116–130 (2016).
223. Jarjour, M. *et al.* Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* **211**, 1109–1122 (2014).
224. Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K. & Fest, T. CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 7595–7602 (2009).
225. Klein, U. *et al.* Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2639–2644 (2003).
226. Liu, Y.-J. *et al.* Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* **342**, 929 (1989).
227. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 22–33 (2008).
228. Klein, F. *et al.* Somatic Mutations of the Immunoglobulin Framework Are Generally Required for Broad and Potent HIV-1 Neutralization. *Cell* **153**, 126–138 (2013).
229. Alberts, B. *et al.* DNA Repair. *Mol. Biol. Cell 4th Ed.* (2002).
230. Methot, S. P. & Di Noia, J. M. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv. Immunol.* **133**, 37–87 (2017).
231. Le, Q. & Maizels, N. Activation-induced deaminase (AID) localizes to the nucleus in brief pulses. *PLoS Genet.* **15**, e1007968 (2019).
232. Brar, S. S., Watson, M. & Diaz, M. Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J. Biol. Chem.* **279**, 26395–26401 (2004).
233. Rouaud, P. *et al.* The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
234. Pasqualucci, L. *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341 (2001).
235. Bannard, O. *et al.* 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 (2013).
236. Dominguez-Sola, D. *et al.* The proto-oncogene *MYC* is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat. Immunol.* **13**, 1083–1091 (2012).
237. Heinzl, S. *et al.* A Myc-dependent division timer complements a cell-death timer to regulate T cell and B cell responses. *Nat. Immunol.* **18**, 96–103 (2017).
238. Wu, Y. *et al.* IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int. Immunol.* **21**, 745–756 (2009).
239. Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R. J. & Choi, Y. S. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 6676–6683 (2004).
240. Victora, G. D. *et al.* Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* **120**, 2240–2248 (2012).
241. Allen, C. D. C. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* **5**, 943–952 (2004).
242. Sander, S. *et al.* PI3 Kinase and FOXO1 Transcription Factor Activity Differentially



- Control B Cells in the Germinal Center Light and Dark Zones. *Immunity* **43**, 1075–1086 (2015).
243. Victora, G. D. *et al.* Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* **143**, 592–605 (2010).
244. Stebegg, M. *et al.* Regulation of the Germinal Center Response. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
245. Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. Clonal selection in the germinal center by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* **509**, 637–640 (2014).
246. Shulman, Z. *et al.* Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* **345**, 1058–1062 (2014).
247. Tuscano, J. M. *et al.* Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* **88**, 1359–1364 (1996).
248. Hennino, A., Bérard, M., Krammer, P. H. & Defrance, T. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J. Exp. Med.* **193**, 447–458 (2001).
249. Zotos, D. *et al.* IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell–intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* **207**, 365–378 (2010).
250. Yoon, S.-O., Zhang, X., Berner, P. & Choi, Y. S. IL-21 and IL-10 have redundant roles but differential capacities at different stages of plasma cell generation from human germinal center B cells. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1311–1318 (2009).
251. Choe, J. & Choi, Y. S. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 508–515 (1998).
252. Laidlaw, B. J. *et al.* Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci. Immunol.* **2**, eaan4767 (2017).
253. Sage, P. T. & Sharpe, A. H. T follicular regulatory cells. *Immunol. Rev.* **271**, 246–259 (2016).
254. Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F. W. & Geha, R. S. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int. Immunol.* **16**, 395–404 (2004).
255. Holder, M. J. *et al.* Growth factor requirements for the stimulation of germinal center B cells: evidence for an IL-2-dependent pathway of development. *Int. Immunol.* **3**, 1243–1251 (1991).
256. Li, H. & Pauza, C. D. CD25(+) Bcl6(low) T follicular helper cells provide help to maturing B cells in germinal centers of human tonsil. *Eur. J. Immunol.* **45**, 298–308 (2015).
257. Arpin, C. *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* **268**, 720–722 (1995).
258. Papa, I. *et al.* TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature* **547**, 318–323 (2017).
259. Pavri, R. R Loops in the Regulation of Antibody Gene Diversification. *Genes* **8**, (2017).
260. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 517–531 (2012).
261. Pène, J. *et al.* Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells. *J. Immunol.* **172**, 5154–5157 (2004).
262. Ettinger, R. *et al.* IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *J. Immunol.* **175**, 7867–7879 (2005).
263. Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., Malefyt, R. de W. & Tangye, S. G. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *J. Immunol.* **181**, 1767–1779 (2008).

264. Gascan, H., Gauchat, J. F., Aversa, G., Vlasselaer, P. V. & Vries, J. E. de. 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. *J. Immunol.* **147**, 8–13 (1991).
265. Chou, C. *et al.* The Transcription Factor AP4 Mediates Resolution of Chronic Viral Infection through Amplification of Germinal Center B Cell Responses. *Immunity* **45**, 570–582 (2016).
266. Livet, J. *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**, 56–62 (2007).
267. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* **45**, 471–482 (2016).
268. Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J. & Tarlinton, D. M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J.* **16**, 2996–3006 (1997).
269. Shinnakasu, R. *et al.* Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* **17**, 861–869 (2016).
270. Fischer, S. F. *et al.* Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* **110**, 3978–3984 (2007).
271. Clybouw, C. *et al.* Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma. *Blood* **118**, 4120–4128 (2011).
272. Wu, Y.-C. B., Kipling, D. & Dunn-Walters, D. K. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.* **2**, 81 (2011).
273. Kometani, K. *et al.* Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **39**, 136–147 (2013).
274. Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.-I. & Calame, K. Commitment of B Lymphocytes to a Plasma Cell Fate Is Associated with Blimp-1 Expression In Vivo. *J. Immunol.* **165**, 5462–5471 (2000).
275. Ise, W. *et al.* 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 (2018).
276. Zhang, Y. *et al.* Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J. Exp. Med.* **215**, 1227–1243 (2018).
277. Herviou, L., Jourdan, M., Martinez, A.-M., Cavalli, G. & Moreaux, J. EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in human plasma cell differentiation. *Leukemia* **1** (2019). doi:10.1038/s41375-019-0392-1
278. Schwab, S. R. *et al.* Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* **309**, 1735–1739 (2005).
279. Kabashima, K. *et al.* Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J. Exp. Med.* **203**, 2683–2690 (2006).
280. Hargreaves, D. C. *et al.* A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *J. Exp. Med.* **194**, 45–56 (2001).
281. Cassese, G. *et al.* Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *J. Immunol.* **171**, 1684–1690 (2003).
282. DiLillo, D. J. *et al.* Maintenance of Long-Lived Plasma Cells and Serological Memory Despite Mature and Memory B Cell Depletion during CD20 Immunotherapy in Mice. *J.*

- Immunol.* **180**, 361–371 (2008).
283. Moore, N. *et al.* Impact of CXCR4/CXCL12 Blockade on Normal Plasma Cells In Vivo. *Am. J. Transplant.* **17**, 1663–1669 (2017).
284. Hauser, A. E. *et al.* Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response. *J. Immunol.* **169**, 1277–1282 (2002).
285. Winter, O. *et al.* Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* **116**, 1867–1875 (2010).
286. Gomez, M. R. *et al.* Basophils Support the Survival of Plasma Cells in Mice. *J. Immunol.* **185**, 7180–7185 (2010).
287. Rozanski, C. H. *et al.* Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1435–1446 (2011).
288. Hunter, Z. R. *et al.* The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* **123**, 1637–1646 (2014).
289. Geffroy-Luseau, A., Jégo, G., Bataille, R., Campion, L. & Pellat-Deceunynck, C. Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. *Int. Immunol.* **20**, 775–782 (2008).
290. Matthes, T. *et al.* Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* **118**, 1838–1844 (2011).
291. Chu, V. T. *et al.* Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **12**, 151–159 (2011).
292. Bortnick, A., Chernova, I., Spencer, S. P. & Allman, D. No strict requirement for eosinophils for bone marrow plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* **48**, 815–821 (2018).
293. Haberland, K. *et al.* Eosinophils are not essential for maintenance of murine plasma cells in the bone marrow. *Eur. J. Immunol.* **48**, 822–828 (2018).
294. Lightman, S. M., Utley, A. & Lee, K. P. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
295. Pellat-Deceunynck, C. & Defrance, T. The Origin of the Plasma-Cell Heterogeneity. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
296. Halliley, J. L. *et al.* Long-lived Plasma Cells Are Contained Within the CD19–CD38<sup>hi</sup>CD138<sup>+</sup> Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* **43**, 132–145 (2015).
297. Waldenström, J. Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? *Acta Med. Scand.* **117**, 216–247 (1944).
298. Martín-Jiménez, P. *et al.* Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström’s macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* **92**, 635–642 (2007).
299. *Waldenström’s Macroglobulinemia*. (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-22584-5
300. Kriangkum, J. *et al.* Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenström macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood* **104**, 2134–2142 (2004).
301. Paiva, B. *et al.* The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **125**, 2370–2380 (2015).
302. Sahota, S. S. *et al.* Typical Waldenström macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* **100**,

1505–1507 (2002).

303. Kyle, R. A. *et al.* Progression in smoldering Waldenström macroglobulinemia: long-term results. *Blood* **119**, 4462–4466 (2012).
304. Owen, R. G. *et al.* Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 110–115 (2003).
305. Schop, R. F. J. *et al.* 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet. Cytogenet.* **169**, 150–153 (2006).
306. Xu, L. *et al.* MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* **121**, 2051–2058 (2013).
307. Montoto, S. *et al.* Malignant transformation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Semin. Oncol.* **30**, 178–181 (2003).
308. Baldini, L. *et al.* Immunoglobulin M monoclonal gammopathies of undetermined significance and indolent Waldenström's macroglobulinemia recognize the same determinants of evolution into symptomatic lymphoid disorders: proposal for a common prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 4662–4668 (2005).
309. Ocio, E. M. *et al.* 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br. J. Haematol.* **136**, 80–86 (2007).
310. Correa, J. G. *et al.* Prevalence and prognosis implication of MYD88 L265P mutation in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* **179**, 849–851 (2017).
311. Poulain, S. *et al.* High-Throughput Genomic Analysis in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **11**, 106–108 (2011).
312. Argyropoulos, K. V. *et al.* Clonal B cells in Waldenström's macroglobulinemia exhibit functional features of chronic active B-cell receptor signaling. *Leukemia* **30**, 1116–1125 (2016).
313. McMaster, M. L. Familial Waldenström's macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* **30**, 146–152 (2003).
314. McMaster, M. L. *et al.* Long-term Evaluation of Three Multiple-Case Waldenström Macroglobulinemia Families. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5063–5069 (2007).
315. Cerhan, J. R. *et al.* Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 1233–1238 (2014).
316. Lemal, R. *et al.* TCL1 expression patterns in Waldenström macroglobulinemia. *Mod. Pathol.* **29**, 83–88 (2016).
317. Hunter, Z. R. *et al.* Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia. *J. Clin. Oncol.* **35**, 994–1001 (2017).
318. Nguyen-Khac, F. *et al.* Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* **98**, 649–654 (2013).
319. Treon, S. P. *et al.* MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 826–833 (2012).
320. Janssens, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J. & Beyaert, R. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-κB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett.* **548**, 103–107 (2003).
321. Deguine, J. & Barton, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling.

*F1000Prime Rep.* **6**, (2014).

322. Takeda, K. & Akira, S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**, 3–9 (2004).
323. Drandi, D. *et al.* Highly sensitive MYD88L265P mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica* **103**, 1029–1037 (2018).
324. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301–310 (2002).
325. Leleu, X. *et al.* Targeting NF- $\kappa$ B in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* **111**, 5068–5077 (2008).
326. Roccaro, A. M. *et al.* Role of Proteasome Inhibition in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin. Lymphoma Myeloma* **9**, 94–96 (2009).
327. Leleu, X. *et al.* The Akt pathway regulates survival and homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* **110**, 4417–4426 (2007).
328. Yang, G. *et al.* Targeting IRAK1/IRAK4 Signaling in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Blood* **126**, 4004–4004 (2015).
329. Yang, G. *et al.* A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **122**, 1222–1232 (2013).
330. Ngo, V. N. *et al.* Oncogenically active *MYD88* mutations in human lymphoma. *Nature* **470**, 115–119 (2011).
331. Ansell, S. M. *et al.* Activation of TAK1 by MYD88 L265P drives malignant B-cell Growth in non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J.* **4**, e183 (2014).
332. Yang, G. *et al.* HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood* **127**, 3237–3252 (2016).
333. Wenzl, K. *et al.* Loss of TNFAIP3 enhances MYD88L265P-driven signaling in non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J.* **8**, (2018).
334. Braggio, E. *et al.* Identification of Copy Number Abnormalities and Inactivating Mutations in Two Negative Regulators of Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling Pathways in Waldenström's Macroglobulinemia. *Cancer Res.* **69**, 3579–3588 (2009).
335. Busillo, J. M. & Benovic, J. L. . *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 952–963 (2007).
336. Domanska, U. M. *et al.* A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur. J. Cancer* **49**, 219–230 (2013).
337. Hernandez, P. A. *et al.* Mutations in the chemokine receptor gene *CXCR4* are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* **34**, 70–74 (2003).
338. Biajoux, V. *et al.* Efficient Plasma Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell Rep.* **17**, 193–205 (2016).
339. Treon, S. P. *et al.* Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **123**, 2791–2796 (2014).
340. Cao, Y. *et al.* The WHIM-like CXCR4<sup>S338X</sup> somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Leukemia* **29**, 169–176 (2015).
341. Hunter, Z. R. *et al.* Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **128**, 827–838 (2016).
342. Tripodo, C. *et al.* Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.*

- 177**, 792–802 (2010).
343. Vos, J. M. *et al.* CXCL13 levels are elevated in patients with Waldenström macroglobulinemia, and are predictive of major response to ibrutinib. *Haematologica* **102**, e452–e455 (2017).
344. Roos-Weil, D. *et al.* A recurrent activating missense mutation in Waldenström macroglobulinemia affects the DNA binding of the ETS transcription factor SPI1 and enhances proliferation. *Cancer Discov.* (2019). doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0873
345. Treon, S. P., Hunter, Z. R., Castillo, J. J. & Merlini, G. Waldenström Macroglobulinemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **28**, 945–970 (2014).
346. Gutiérrez, N. C. *et al.* Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström’s macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* **21**, 541–549 (2007).
347. Ngo, H. T. *et al.* SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **112**, 150–158 (2008).
348. Hatjiharissi, E. *et al.* Proteomic Analysis of Waldenström Macroglobulinemia. *Cancer Res.* **67**, 3777–3784 (2007).
349. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2927–2931 (2010).
350. ElSawa, S. F. *et al.* Comprehensive analysis of tumor microenvironment cytokines in Waldenström macroglobulinemia identifies CCL5 as a novel modulator of IL-6 activity. *Blood* **118**, 5540–5549 (2011).
351. Santos, D. D. *et al.* Bone Marrow Mast Cells Are Significantly Increased in Patients with Waldenström’s Macroglobulinemia, and Their Number Following Therapeutic Intervention Is Dependent on Extent of Response. *Blood* **106**, 980–980 (2005).
352. Tournilhac, O. *et al.* Mast cells in Waldenström’s macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling. *Ann. Oncol.* **17**, 1275–1282 (2006).
353. Ho, A. W. *et al.* CD27-CD70 interactions in the pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **112**, 4683–4689 (2008).
354. Azab, F. *et al.* Eph-B2/Ephrin-B2 Interaction Plays a Major Role in the Adhesion and Proliferation of Waldenström’s Macroglobulinemia. *Clin. Cancer Res.* **18**, 91–104 (2012).
355. Hivert, B. *et al.* Clinical and prognostic implications of low or high level of von Willebrand factor in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **120**, 3214–3221 (2012).
356. Gavriatopoulou, M. *et al.* Elevated vWF Antigen Serum Levels Are Associated With Poor Prognosis, and Decreased Circulating ADAMTS-13 Antigen Levels Are Associated With Increased IgM Levels and Features of WM but not Increased vWF Levels in Patients With Symptomatic WM. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **19**, 23–28 (2019).
357. Hodge, L. S. *et al.* IL-21 in the bone marrow microenvironment contributes to IgM secretion and proliferation of malignant cells in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* **120**, 3774–3782 (2012).
358. Hodge, L. S. *et al.* Constitutive activation of STAT5A and STAT5B regulates IgM secretion in Waldenström’s macroglobulinemia. *Blood* **123**, 1055–1058 (2014).
359. Preud’homme, J.-L. & Seligmann, M. Immunoglobulins on the Surface of Lymphoid Cells in Waldenström’s Macroglobulinemia. *J. Clin. Invest.* **51**, 701–705 (1972).
360. Smith, B. R., Robert, N. J. & Ault, K. A. In Waldenström’s macroglobulinemia the

- quantity of detectable circulating monoclonal B lymphocytes correlates with clinical course. *Blood* **61**, 911–914 (1983).
361. Pettersson, D., Mellstedt, H. & Holm, G. Characterization of the Monoclonal Blood and Bone Marrow B Lymphocytes in Waldenström's Macroglobulinaemia. *Scand. J. Immunol.* **11**, 593–599 (1980).
362. Hunter, Z. *et al.* Detection Of MYD88 L265P In Peripheral Blood Of Patients With Waldenström's Macroglobulinemia and IgM Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance. *Blood* **122**, 3024–3024 (2013).
363. Levy, Y. *et al.* Interleukin 6 dependence of spontaneous in vitro differentiation of B cells from patients with IgM gammopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 3309–3313 (1990).
364. Roberts, M. J., Chadburn, A., Ma, S., Hyjek, E. & Peterson, L. C. Nuclear Protein Dysregulation in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **139**, 210–219 (2013).
365. Zhou, Y. *et al.* Transcriptional repression of plasma cell differentiation is orchestrated by aberrant over-expression of the ETS factor SPIB in Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* **166**, 677–689 (2014).
366. Anderson, K. J. *et al.* The BLIMP1 – EZH2 nexus in a non-Hodgkin lymphoma. *bioRxiv* 606749 (2019). doi:10.1101/606749
367. Pasare, C. & Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364–368 (2005).
368. Kallies, A. *et al.* Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J. Exp. Med.* **200**, 967–977 (2004).
369. Fairfax, K. A. *et al.* Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 4104–4111 (2007).
370. Jiang, Y., Soong, T. D., Wang, L., Melnick, A. M. & Elemento, O. Genome-Wide Detection of Genes Targeted by Non-Ig Somatic Hypermutation in Lymphoma. *PLoS ONE* **7**, (2012).
371. Kobayashi, S. *et al.* Identification of IGHC $\delta$ -BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer* **50**, 207–216 (2011).
372. Türkmen, S. *et al.* A BACH2-BCL2L1 fusion gene resulting from a t(6;20)(q15;q11.2) chromosomal translocation in the lymphoma cell line BLUE-1. *Genes. Chromosomes Cancer* **50**, 389–396 (2011).
373. Takakuwa, T. *et al.* Integration of Epstein-Barr Virus into Chromosome 6q15 of Burkitt Lymphoma Cell Line (Raji) Induces Loss of BACH2 Expression. *Am. J. Pathol.* **164**, 967–974 (2004).
374. Liu, J. *et al.* Identification of novel Bach2 transcripts and protein isoforms through tagging analysis of retroviral integrations in B-cell lymphomas. *BMC Mol. Biol.* **10**, 2 (2009).
375. Herbaux, C. *et al.* BACH2 promotes indolent clinical presentation in Waldenström macroglobulinemia. *Oncotarget* **8**, 57451–57459 (2017).
376. Shi, W. *et al.* Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat. Immunol.* **16**, 663 (2015).
377. Eberwine, J. *et al.* Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 3010–3014 (1992).
378. Kurimoto, K. *et al.* An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* **34**, e42 (2006).
379. Tang, F. *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods*

- 6, 377–382 (2009).
380. Maaten, L. van der & Hinton, G. Visualizing Data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579–2605 (2008).
381. Mao, Q., Wang, L., Goodison, S. & Sun, Y. Dimensionality Reduction Via Graph Structure Learning. in *Proceedings of the 21th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining* 765–774 (ACM, 2015). doi:10.1145/2783258.2783309
382. Saelens, W., Cannoodt, R., Todorov, H. & Saeys, Y. A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat. Biotechnol.* **37**, 547 (2019).
383. Bolotin, D. A. *et al.* MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* **12**, 380–381 (2015).
384. Waters, L. R., Ahsan, F. M., Wolf, D. M., Shirihai, O. & Teitell, M. A. Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. *iScience* **5**, 99–109 (2018).
385. Thompson, C. B. *et al.* Size-dependent B lymphocyte subpopulations: relationship of cell volume to surface phenotype, cell cycle, proliferative response, and requirements for antibody production to TNP-Ficoll and TNP-BA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **133**, 2333–2342 (1984).
386. Meyer-Bahlburg, A., Bandaranayake, A. D., Andrews, S. F. & Rawlings, D. J. Reduced c-myc expression levels limit follicular mature B cell cycling in response to TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 4065–4075 (2009).
387. Tibshirani, R., Walther, G. & Hastie, T. Estimating the number of clusters in a dataset via the Gap statistic. **63**, 411–423 (2000).
388. Bossen, C. *et al.* Brg1 activates enhancer repertoires to establish B cell identity and modulate cell growth. *Nat. Immunol.* **16**, 775–784 (2015).
389. Rehman, A. U. *et al.* BRG1 Expression in Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Is Associated with Advanced Disease Stage. *Blood* **124**, 5367–5367 (2014).
390. Street, K. *et al.* Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* **19**, 477 (2018).
391. Wolf, F. A. *et al.* PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells. *Genome Biol.* **20**, 59 (2019).
392. Schlitzer, A. *et al.* Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **16**, 718–728 (2015).
393. Xu, H. *et al.* Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nat. Immunol.* **16**, 1274–1281 (2015).
394. Jalali, S. & Ansell, S. M. Bone marrow microenvironment in Waldenstrom’s Macroglobulinemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **29**, 148–155 (2016).
395. Stoeckius, M. *et al.* Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* **19**, 224 (2018).
396. Caron, G. *et al.* Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Rep.* **13**, 1059–1071 (2015).
397. Pilarski, L. M. *et al.* Abnormalities in lymphocyte profile and specificity repertoire of patients with Waldenstrom’s macroglobulinemia, multiple myeloma, and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Am. J. Hematol.* **30**, 53–60 (1989).
398. Owen, R. G., Hillmen, P. & Rawstron, A. C. CD52 expression in Waldenstrom’s macroglobulinemia: implications for alemtuzumab therapy and response assessment. *Clin. Lymphoma* **5**, 278–281 (2005).



399. Prabhala, R. H. *et al.* Interleukin-17 and TH17 Pathway Supports Waldenstrom's Macroglobulinemia Cell-Growth: Potential Therapeutic Implications. *Blood* **116**, 446–446 (2010).
400. Xie, S. *et al.* IL-17 Activates the Canonical NF- $\kappa$ B Signaling Pathway In Autoimmune B Cells of BXD2 Mice to Upregulate the Expression of Regulators of G-Protein Signaling 16. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 2289–2296 (2010).
401. Monin, L. & Gaffen, S. L. IL-17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities and therapeutic implications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
402. Liu, W., Meckel, T., Tolar, P., Sohn, H. W. & Pierce, S. K. Antigen affinity discrimination is an intrinsic function of the B cell receptor. *J. Exp. Med.* **207**, 1095–1111 (2010).
403. Wu, C.-A. M. *et al.* Genetic engineering in primary human B cells with CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *J. Immunol. Methods* **457**, 33–40 (2018).
404. Blanc, P. *et al.* Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge. *Nat. Commun.* **7**, 13600 (2016).
405. Pinto, D. *et al.* A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* **121**, 4110–4114 (2013).
406. Ledergor, G. *et al.* Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat. Med.* **24**, 1867–1876 (2018).
407. Song, W. & Craft, J. T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunol. Rev.* **288**, 85–96 (2019).
408. Stoeckius, M. *et al.* Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat. Methods* **14**, 865–868 (2017).
409. Gosselin, K. *et al.* High-throughput single-cell ChIP-seq identifies heterogeneity of chromatin states in breast cancer. *Nat. Genet.* **51**, 1060–1066 (2019).
410. Wang, X. *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* **361**, eaat5691 (2018).
411. Giacomello, S. *et al.* Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species. *Nat. Plants* **3**, (2017).

## Résumé

La différenciation terminale du lymphocyte B est un processus permettant de générer des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, ainsi que des lymphocytes B mémoires. Ce processus est fortement régulé grâce à un ensemble de signaux présents dans le micro-environnement dont l'intégration détermine la progression du lymphocyte B vers le stade différencié.

Au cours de ce projet, j'ai identifié que la signalisation IL-2 induit le programme de différenciation plasmocytaire par un mécanisme impliquant la voie de transduction ERK et le facteur de transcription BACH2. Ce travail apporte de nouvelles informations sur le rôle crucial de BACH2 dans le contrôle de la différenciation plasmocytaire humaine grâce, notamment, à des approches à l'échelle de la cellule permettant d'appréhender l'hétérogénéité des réponses immunes dans un modèle de différenciation *in vitro*. J'ai ensuite développé des études transcriptomiques sur cellules uniques pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires spatiotemporels de la différenciation plasmocytaire normale d'une part, et des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie de Waldenström résultant d'une différenciation plasmocytaire avortée d'autre part. Mes travaux valident la faisabilité technologique des approches expérimentales développées et ouvrent de nombreuses perspectives d'analyses visant à mieux caractériser la physiopathologie de la maladie de Waldenström.

Mots clés: Lymphocytes B, Interleukine-2, BACH2, Waldenström.

## Abstract

Terminal B cell differentiation gives rise to antibody secreting plasma cells and memory B cells. It's a highly controlled process regulated by external inputs which guide B cell fate in the transition from naive B cells through to plasma cell.

Here, we identify that IL-2 signaling triggers the plasma cell differentiation programme via the ERK transduction pathway instigating BACH2 repression. Results obtained using expression profiles of individual cells to bypass heterogeneous and asynchronous B cell responses confirm the crucial role of BACH2 regulating human B cell fate decision in a well-defined *in vitro* model of primary human naive B cell differentiation into plasma cell. My focus was then to study the temporal resolution of transcriptional dynamics following times series single-cell transcriptome analysis that should pinpoint key regulatory events that govern normal plasma cell differentiation in one hand and, on the other hand, the mechanisms that govern the differentiation arrest of plasma cell differentiation responsible for Waldenström disease, a rare incurable neoplasm. Altogether the data confirm the technological feasibility of the experimental strategies and should contribute to a better understanding of the complex mechanisms that control generation of plasma cell. This project may ultimately help to achieve greater knowledge of the pathological process in Waldenström disease.

Key Words: B lymphocyte, Interleukin-2, BACH2, Waldenström.

**Titre : Dynamique transcriptionnelle de la différenciation normale et pathologique des lymphocytes B naïfs en cellules effectrices**

**Mots clés :** Lymphocytes B, Interleukine-2, BACH2, Waldenström

**Résumé :** La différenciation terminale du lymphocyte B est un processus permettant de générer des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, ainsi que des lymphocytes B mémoires. Ce processus est fortement régulé grâce à un ensemble de signaux présents dans le micro-environnement dont l'intégration détermine la progression du lymphocyte B vers le stade différencié.

Au cours de ce projet, j'ai identifié que la signalisation IL-2 induit le programme de différenciation plasmocytaire par un mécanisme impliquant la voie de transduction ERK et le facteur de transcription BACH2. Ce travail apporte de nouvelles informations sur le rôle crucial de BACH2 dans le contrôle de la différenciation plasmocytaire humaine grâce,

notamment, à des approches à l'échelle de la cellule permettant d'appréhender l'hétérogénéité des réponses immunes dans un modèle de différenciation in vitro. J'ai ensuite développé des études transcriptomiques sur cellules uniques pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires spatiotemporels de la différenciation plasmocytaire normale d'une part, et des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie de Waldenström résultant d'une différenciation plasmocytaire avortée d'autre part. Mes travaux valident la faisabilité technologique des approches expérimentales développées et ouvrent de nombreuses perspectives d'analyses visant à mieux caractériser la physiopathologie de la maladie de Waldenström

**Titre : Transcriptional dynamic of normal and pathological differentiation of naive B cells into effector cells**

**Keywords :** B lymphocyte, Interleukin-2, BACH2, Waldenström.

**Abstract :** Terminal B cell differentiation gives rise to antibody secreting plasma cells and memory B cells. It's a highly controlled process regulated by external inputs which guide B cell fate in the transition from naive B cells through to plasma cell.

Here, we identify that IL-2 signaling triggers the plasma cell differentiation programme via the ERK transduction pathway instigating BACH2 repression. Results obtained using expression profiles of individual cells to bypass heterogeneous and asynchronous B cell responses confirm the crucial role of BACH2 regulating human B cell fate decision in a well-defined in vitro model of primary human naive B cell differentiation into plasma cell. My focus

was then to study the temporal resolution of transcriptional dynamics following times series single-cell transcriptome analysis that should pinpoint key regulatory events that govern normal plasma cell differentiation in one hand and, on the other hand, the mechanisms that govern the differentiation arrest of plasma cell differentiation responsible for Waldenström disease, a rare incurable neoplasm. Altogether the data confirm the technological feasibility of the experimental strategies and should contribute to a better understanding of the complex mechanisms that control generation of plasma cell. This project may ultimately help to achieve greater knowledge of the pathological process in Waldenström disease.