



HAL
open science

Exploration du facteur de transcription MAF dans les lymphocytes B humains

Magalie Michée-Cospolite

► **To cite this version:**

Magalie Michée-Cospolite. Exploration du facteur de transcription MAF dans les lymphocytes B humains. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. ⟨NNT : 2022BRES0081⟩. ⟨tel-04093133⟩

HAL Id: tel-04093133

<https://theses.hal.science/tel-04093133v1>

Submitted on 9 May 2023

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Magalie MICHEE-COSPOLITE

Exploration du facteur de transcription MAF dans les lymphocytes B humains

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 12 décembre 2022

Unité de recherche : UMR 1227 – Lymphocytes B et auto-immunité

Rapporteurs avant soutenance :

Nadine VARIN	DR2 INSERM, INSERM UMR 978, Université de la Sorbonne Paris Nord
Raymond CESAIRE	PU-PH de Virologie, CHU Guadeloupe, Faculté de médecine de l'Université des Antilles

Composition du Jury :

Président du Jury :	Nadine VARIN	DR2 INSERM, INSERM UMR 978
Rapporteurs :	Nadine VARIN Raymond CESAIRE	DR2 INSERM, INSERM UMR 978 PU-PH de Virologie, CHU Guadeloupe, Faculté de médecine de l'Université des Antilles
Directrice de thèse :	Sophie HILLION	MCU-PH, INSERM UMR 1227, Université de Bretagne Occidentale
Co-directrice de thèse :	Laëtitia LE POTTIER	MCF, INSERM UMR 1227, Université de Bretagne Occidentale

A ma Guadeloupe, à mes ancêtres qui se sont battus
pour un monde meilleur.

« *Vivre libre ou Mourir* »

Les combattants de la liberté 1802

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le fruit d'une expérience qui m'a énormément changé autant sur le plan professionnel que personnel. Dès mes 11 ans, j'avais décidé que je deviendrais Docteure en Biologie. Ce rêve d'enfant se réalise aujourd'hui et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

En premier lieu, je remercie le Pr. Raymond Césaire et le Dr Nadine Varin d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir donné de leur temps pour évaluer ce travail. C'est un réel honneur pour moi que vous fassiez partie de ce jury.

Je remercie également les Dr. Sophie Hillion et Dr. Laëtitia Le Pottier pour m'avoir donné une chance de faire partie de cette aventure, m'avoir fait confiance dans la réalisation de cette étude, leur accompagnement, leur disponibilité, leur bienveillance ainsi que leurs précieux conseils qui m'ont permis d'apprendre énormément, de me dépasser autant sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie ensuite les Dr. Cécile Voisset et Dr. Virginie Pichard pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils, votre accompagnement ont été précieux pour l'avancée de ce travail. Je remercie particulièrement le Dr. Virginie Pichard qui m'a également encadré en stage de Master 2 et sans qui, je n'aurais probablement pas continué en thèse. Merci pour tous tes conseils et ton soutien indéfectible.

Je remercie le Pr. Jacques-Olivier Pers qui m'a accueillie au sein de son équipe et le Pr. Divi Cornec qui dirige actuellement le laboratoire pour le temps qu'ils ont consacré aux doctorants que ce soit lors des séminaires ou des réunions des doctorants. Merci pour le temps et l'implication que vous nous avez consacré.

Un grand merci au Dr. Alexis Grasseau qui m'a passé le flambeau du facteur de transcription MAF dans les lymphocytes B, qui n'a cessé de prendre de mes nouvelles et de celles du projet qu'il a laissé entre mes mains et qui m'a beaucoup encouragée à distance tout au long de cette thèse.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire d'immunologie dont certains que je citerai plus particulièrement.

Merci aux chercheurs Dr. Christophe Jamin, Dr. Olivier Mignen (tes questions naïves me manqueront 😊), Pr. Maryvonne Dueymes (merci de m'avoir donné espoir de rentrer enseigner chez moi), Dr. Anne Bordon, Dr. Christelle Le Dantec, Dr Patrice Hémon, Dr. Jean-Eric Alard, Dr. Fiona LE PAPE et à tout le personnel de recherche Stéphanie Deshayes (Merci pour ta gentillesse tout au long de ma thèse, et surtout à la fin), Nadège Marec (merci pour les fous rires partagés).

Je remercie particulièrement le Dr. Pierre Pochard qui m'a beaucoup aidé tout le long de ma thèse. Merci pour tous les Kinder Maxi quand je n'avais pas le moral ou lors des très longues journées. Merci pour ton aide précieuse lors de cette fin de thèse. Merci pour les superbes fleurs en chocolat (que mes chiens ont mangé avant moi 😊). Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance à mon égard. Je suis heureuse de t'avoir rencontré.

Je remercie également la « super team » composée des doctorants, post-doctorants et des Dr. Fiona LE PAPE et Omid Feizbaksh.

Tout d'abord, le Dr. Nedra Chriti. Ma Nedra d'amour, que dire de toi ? Te rencontrer a été l'une des plus belles expériences de cette thèse et la seule qui n'a pas nécessité de mises au point 😊. En arrivant à Brest, je ne connaissais personne et me sentais très seule. Mais dès qu'on s'est rencontré, tout a changé comme quand on passe des niveaux de gris à la couleur. Notre relation est devenue une de ces amitiés qu'on garde toute une vie. J'ai trouvé ma « BFF », comme on dit, qui m'a fait découvrir la vie brestoïse, la vie en thèse, qui n'a jamais hésité à rester tard au labo pour m'attendre. Merci pour ton soutien, même après ta soutenance, tes appels qui m'ont souvent redonné le sourire. Merci pour toutes nos sorties au restaurant et tous tes bons petits plats. Merci d'être toi, ma Nedra, tout simplement.

Ensuite, ma petite Mimi (Marie Morel), tu as été une telle bouffée d'air frais quand tu es arrivée au laboratoire. Tu fais partie de ces personnes qu'on veut garder près de soi dans la vie. J'espère que même après ma thèse, j'arrivais à te garder encore un peu, malgré la distance car ton soutien, ta joie de vivre, ton immense gentillesse ont rendu cette expérience bien meilleure. Merci pour les petits trajets avec toi le matin, la petite virée avec Nedra ou encore tous ces moments partagés au boulot comme à l'extérieur qui ont vraiment illuminé ma thèse. Merci aussi d'être toi, Marie et surtout, ne change pas.

Merci à Marina Boudigou. Tu as été vraiment un soutien énorme lors de cette thèse. Que soit au début où tu as pris le temps de former sur de nombreuses techniques mais aussi à la fin quand tu prenais le temps de me conseiller, de me rassurer et de m'aider à sécher mes larmes quand je paniquais. Merci pour tout. J'espère qu'on pourra faire quelques balades de nos toutous ensemble avant que tu ne trouves la suite de ta route.

Merci à Yvonne, « Vonvon ». Ton énergie a ensoleillé ce laboratoire. Ta joie de vivre, ton naturel font de toi, une personne unique. Merci pour nos moments de rires, de complicité, nos super discussions sur la royauté anglaise et la série The Crown.

Merci à Anthony. Merci pour nos fous rires, nos soirées de purification des lymphocytes B d'amygdale (Motivés jusqu'au bout!!!), nos soirées où tu changeais de musique pour que je ne rentre pas trop tôt, la nuit des chercheurs avec Yvonne où on a passé un super moment. Merci pour tous ces bons moments partagés.

Merci à Cristian. Merci pour nos bons moments, les fous rires, nos discussions interminables sur nos vies en Italie pour toi et en Guadeloupe pour moi. Merci d'avoir perfectionné mon anglais aussi, il commençait à se perdre.

Merci à toi Fiona, pour tous ces moments où tu m'as encouragé, pour ces petits apéros du mercredi qui m'ont souvent permis de relâcher un peu la pression. Merci pour les rires, ma très jolie plante et pour Manu, le réparateur officiel de mon timer tout le long de cette thèse (Merci Manu). Merci pour tes petits messages reconfortants et très émouvants sur la fin de ma thèse.

Merci à Nathan pour ces petites pauses café de 17h45 où ta gentillesse et ses conseils m'ont toujours reboosté et reconforté. Merci pour cet après-midi de réalité virtuelle où tuer des zombies peut vraiment faire redescendre la pression.

Merci à Omid, Mathilde, Soizic pour leur soutien, leurs conseils, leur bienveillance durant toute cette expérience. Merci Soizic pour le renouveau que tu as déclenché au laboratoire.

Thanks to Marthe and Yannick from Groningen who share a lot of good moments with me. A special thank to you, Marthe, who continue to take news during my writing. I'm so glad to know you. I hope we will see each other soon when I will come to visit you, guys. Tot ziens 😊.

Merci à tout le personnel du laboratoire, qui a contribué à ma thèse : Carole, Nelly, Sylvie, Christine, Valérie, Missilya, Johanna, Emmanuelle, à super stagiaire, Margot. Merci pour votre gentillesse et tous ces bons moments passés en votre compagnie.

Il est tout naturel que mes prochains remerciements aillent à ma famille. Je vais commencer par la femme la plus importante de ma vie, ma petite maman, Suzy, sans qui rien ne serait possible. En plus de m'avoir donné la vie, tu m'as toujours soutenu sans faille dans tous mes projets personnels et professionnels. Tu es toujours celle qui parvient à essuyer mes larmes et me calmer même au téléphone à 8000 km. Aujourd'hui, cette réussite n'est pas juste la mienne, mais la nôtre. Car, je n'y serais jamais arrivée sans tous les sacrifices que tu as faits pour que je sois ici maintenant. S'il y a un exemple d'amour, de force et courage que je souhaite atteindre dans la vie, c'est le tien : On fanm dibout, on fanm potomitan, on fanm lanmou.

Mon oncle adoré, mon « Tonton Raymond ». Merci à toi pour ton soutien sans faille, tes discours de motivation, tes prières et tout ce qui fait de toi, mon tonton adoré. Merci d'être toujours là pour me remonter le moral, pour partager toutes mes joies et mes peines, pour me donner des conseils de vie, pour tes jeux de mots qui ne cessent de m'étonner. Merci pour tout mon tonton adoré.

Merci à ceux que j'ai perdu en cours de route mais qui n'ont jamais cessé de veiller sur moi : Christophe « Titof », tatie Lucette et ma grand-mère. Lanmou pa ka jen disparèt.

Merci à mes amis qui n'ont jamais cessé de m'encourager à distance et qui m'ont souvent prêté un peu de force quand il le fallait : Stéphanie, Florent, Cécilia, mais aussi mes copines nantaises : Israël, Thessalène, Angélique et surtout Marie, Aurélie et Michèle.

Enfin, un grand merci à celui qui partage ma vie. Te rencontrer au cours de ma thèse a été la plus belle surprise de cette aventure brestoïse. Je ne suis pas sûre que le mot « remerciement » soit suffisant pour exprimer toute ma gratitude. Sans toi, je n'aurais probablement pas survécu à ces deux dernières années. Merci d'avoir très souvent séché mes larmes, chassé mes doutes, reboosté quand j'en avais besoin, changé les idées quand il le fallait, embêté tout le temps, raconté des blagues nulles jusqu'à ce que mon sourire revienne, ramené des gauffres aux Nutella lors des journées difficiles. Je referai une thèse juste pour te rencontrer. Merci d'être à mes côtés chaque matin, d'ensolleiler ma vie, et de m'avoir fait découvrir que mon « chez moi » n'est pas qu'en Guadeloupe, mais aussi là où tu te trouves. Merci Alex, pour tout ton amour. A nos prochaines aventures ensemble...

Merci à notre petite nièce, Leyla, qui m'a beaucoup chouchouté durant mes derniers jours d'écriture avec des petits déjeuners au lit et des biscuits Nutella.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES	7
TABLES DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	14
INTRODUCTION.....	17
1. ONTOGENESE ET DIFFERENCIATION DES LB.....	17
1.1. Développement des LB dans la MO	17
1.2. Maturation et Différenciation dans les OLS.....	18
1.2.1. Différenciation des LB de la ZM.....	18
1.2.2. Initiation de la réponse immunitaire	19
1.2.2.1. Différenciation dépendante des CG.....	20
1.2.2.2. La voie extra-folliculaire	21
1.3. Régulation moléculaire de la différenciation des PB.....	23
2. LES B REGULATEURS.....	25
2.1. Découverte des LB régulateurs.....	25
2.2. La production d'interleukine 10 : le mécanisme d'immunosuppression majoritairement décrit dans les LBreg.....	25
2.3. Des mécanismes d'action indépendants ou concomittants à la production d'IL-10...	28
2.3.1. La production de TGF- β	28
2.3.2. La production d'IL-35.....	29
2.3.3. L'expression du GrB	30
2.3.4. L'expression de FasL.....	30
2.3.5. L'expression de PD-L1	31
2.4. Hétérogénéité des phénotypes de LBreg	32
2.4.1. Les LB Tr producteurs d'IL-10.....	33
2.4.2. Les LB CD1d ⁺ CD5 ⁺	33
2.4.3. Les LB mémoires CD24 ^{fort} CD27 ⁺	34
2.4.4. Les PB et PC régulateurs	35
2.5. Voies de signalisation impliquées dans l'induction des LBreg	38
2.5.1. Les voies TLR.....	38
2.5.2. La voie CD40.....	39
2.5.3. Les voies de signalisation des cytokines.....	39
2.5.3.1. L'interleukine 21.....	39

2.5.3.2.	L'interféron alpha.....	40
2.6.	Régulation moléculaire des LBreg.....	41
3.	LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION MAF.....	42
3.1.	La Famille des facteurs de transcription MAF.....	42
3.2.	Transcrits et protéines MAF décrites.....	44
3.2.1.	Les modifications post-traductionnelles de MAF.....	46
3.2.1.1.	L'ubiquitination de MAF.....	47
3.2.1.2.	La phosphorylation de MAF.....	48
3.2.1.3.	La SUMOylation de MAF.....	49
3.3.	Rôle de MAF dans l'immunité.....	51
3.3.1.	Régulation de la polarisation et la différenciation des cellules immunitaires.....	51
3.3.1.1.	Régulation de la différenciation des LT.....	51
3.3.1.1.1.	Rôle de MAF dans la différenciation LTh2.....	51
3.3.1.1.2.	Rôle de MAF dans la différenciation des LTfh.....	51
3.3.1.1.3.	Implication de MAF dans la différenciation des LTh17.....	52
3.3.1.1.4.	Régulation de la différenciation des LTreg par MAF.....	52
3.3.1.1.5.	Rôle de MAF dans la différenciation des LT $\gamma\delta$	53
3.3.1.2.	Régulation de la plasticité des cellules lymphoïdes innées (ILC).....	54
3.3.1.3.	Régulation de la polarisation des macrophages.....	56
3.3.2.	Régulation de la production d'IL-10 par MAF.....	57
3.3.2.1.	MAF et production d'IL-10 par les LTreg.....	57
3.3.2.2.	MAF et production d'IL-10 par les LTh17.....	57
3.3.2.3.	MAF induit la production d'IL-10 par les macrophages.....	58
3.3.3.	Rôle de MAF dans les LB.....	59
	PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	61
	MATERIEL ET METHODES.....	64
1.	ANALYSES <i>IN SILICO</i> DE MAF.....	64
1.1.	Base de données utilisées pour la description des variants et isoformes de MAF.....	64
1.2.	Prédiction de la structure tertiaire de MAF.....	64
1.3.	Alignement des protéines.....	64
1.4.	Prédiction des modifications post-traductionnelles.....	65
1.4.1.	Prédiction des sites de phosphorylation.....	65
1.4.2.	Prédiction des sites d'ubiquitination.....	65
1.4.3.	Prédiction des sites de SUMOylation.....	65
1.4.4.	Prédiction des sites de glycosylation.....	65
2.	CULTURE CELLULAIRE.....	65
2.1.	Lignées lymphocytaires RAJI, RAMOS et RPMI 8226.....	66

2.2.	Lignée épithéliale HSG	66
2.3.	Purification et culture des LB primaires.....	66
2.3.1.	Purification des lymphocytes LB périphériques.....	66
2.3.2.	Purification des lymphocytes LB d'amygdales	67
2.3.3.	Modèle de Différenciation des LB	68
2.3.4.	Modèle B10.....	68
3.	BIOLOGIE MOLECULAIRE	68
3.1.	Plasmide	68
3.1.1.	PCR et gel d'électrophorèse	69
3.1.2.	Transfection	70
3.1.3.	Séquençage	70
3.1.4.	Digestion enzymatique.....	71
3.2.	Extraction des ARN et Dosage.....	71
3.3.	PCR quantitative (qPCR)	72
4.	EXPRESSION PROTEIQUE.....	72
4.1.	Cytométrie.....	72
4.1.1.	Discrimination phénotypique des LB en fonction de leur stade de différenciation	72
4.1.2.	Marquage MAF	75
4.1.3.	Marquage extracellulaire dans les LB primaires	76
4.1.4.	Marquage intracellulaire dans les LB primaires.....	76
4.1.4.1.	Marquage MAF	76
4.1.4.2.	Marquage IL-10 et MAF/IL-10.....	76
4.1.5.	Acquisition des données de cytométrie.....	77
4.2.	Western Blot	77
4.2.1.	Extraction de protéines et Dosage	77
4.2.2.	Electrophorèse, Transfert et Marquage.....	77
4.3.	Immunoprécipitation.....	78
5.	Logiciel d'analyses statistiques	79
	RESULTATS	80
	PARTIE I : VALIDATION DE DIFFERENTS OUTILS POUR LA DETECTION DE MAF 80	
1.	EXPLORATION <i>IN SILICO</i> DES VARIANTS ET ISOFORMES DE MAF	80
1.1.	Variants et isoformes de MAF résultant de différents mécanismes d'épissage.....	80
1.2.	Analyse comparative des protéines MAF longue et courte.....	83
1.3.	Homologie homme/souris	84
1.4.	Modifications post-traductionnelles de MAF	86
1.4.1.	Mise en évidence de sites potentiels de phosphorylation de MAF	86

1.4.2.	Confirmation des sites connus de SUMOylation de MAF	89
1.4.3.	Mise en évidence de sites potentiels d'ubiquitination de MAF	89
1.4.4.	Mise en évidence de sites potentiels d'O- et N-glycosylation de MAF.....	90
1.5.	Structure tertiaire des protéines MAF	91
2.	ETUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS MAF DANS LES LIGNEES DE LB HUMAINS	94
2.1.	Présentation des sondes utilisées pour détecter les variants MAF	95
2.2.	Analyse de l'expression de MAF dans les lignées RAMOS et RPMI 8226	95
3.	VALIDATION DES OUTILS DE DETECTION DE LA PROTEINE MAF	96
3.1.	Présentation des Ac.....	96
3.1.1.	Les Ac de cytométrie en flux	96
3.1.2.	Les Ac de western blot.....	97
3.1.2.1.	L'Ac polyclonal anti-MAF α M1.....	97
3.1.2.2.	L'Ac monoclonal anti-MAF BLR045F	97
3.1.2.3.	L'Ac polyclonal anti-MAF α M2.....	97
3.1.2.4.	L'Ac polyclonal anti-MAF α M3.....	98
3.2.	Présentation de la méthodologie mise en place pour valider la spécificité des Ac ..	99
3.3.	Validation de la spécificité des Ac anti-MAF	103
3.4.	Evaluation de la spécificité des Ac anti-MAF pour la protéine MAF longue	106
3.5.	Analyse de l'expression de MAF court dans différentes lignées dérivées de LB..	106
3.6.	Etude des isoformes reconnues par les Ac anti-MAF	108
4.	CONCLUSION	110
PARTIE II : EXPLORATION DE L'EXPRESSION DE MAF DANS LES LB PRIMAIRES HUMAINS		112
1.	EXPRESSION DE MAF DANS LES LB PRIMAIRES	112
1.1.	La protéine MAF est faiblement exprimée à l'état basal dans les LB.....	112
1.2.	MAF pourrait être exprimé lors de la différenciation terminale des LB en PB...	115
1.3.	L'expression de MAF est similaire dans les PB IgM ⁺ ou IgM ⁻	117
2.	EXPRESSION DE MAF AU COURS DE LA DIFFERENCIATION TERMINALE DES LB <i>IN VITRO</i>	119
2.1.	L'expression de MAF est augmentée lors de la différenciation terminale des LB <i>in vitro</i>	119
2.2.	Deux isoformes de MAF sont produites dans le modèle de différenciation <i>in vitro</i> des LB.....	123
3.	CONCLUSION	124
PARTIE III : ETUDE DE L'EXPRESSION DE MAF ET DE L'IL-10 DANS LES LB		125
1.	EXPRESSION D'IL-10 DANS LES LB A L'ETAT BASAL	125
1.1.	L'IL-10 est exprimé dans très peu de LB à l'état basal	125

1.2.	L'IL-10 n'est exprimé que par les PB à l'état basal.....	126
2.	MISE EN PLACE D'UN MODÈLE DE LB PRODUCTEURS D'IL-10	128
2.1.	Mise en place et validation du modèle in vitro de production d'IL-10 par les LB.....	129
2.2.	MAF est induit dans les LB en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40	129
2.3.	Deux isoformes de MAF sont induites en réponse à la stimulation du TLR9 par le CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.....	132
3.	CONCLUSION	133
DISCUSSION		134
1.	VALIDATION DES AC ANTI-MAF.....	134
1.1.	Validation par une expression ectopique dans une lignée qui n'exprime pas MAF	134
1.2.	Comparaison des profils de détection des Ac à une méthode indépendante des Ac (RT-qPCR).....	135
1.3.	Validation par l'utilisation de deux anticorps indépendants.....	136
1.4.	Validation par MS	137
1.5.	Un défaut de spécificité des Ac lié à la reproductibilité du western blot ?	139
1.6.	Impact de la conformation spatiale de la protéine	140
2.	MAF EST-IL IMPLIQUE DANS LA DIFFERENCIATION TERMINALE DES LB ?....	142
2.1.	MAF et l'IRF4 s'induisent mutuellement	142
2.2.	MAF/BLIMP-1 : coopération ou interaction directe ?	143
2.3.	Interaction entre MAF et les autres FT impliqués dans la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac.....	144
ANNEXES		148
ANNEXE 1 : IL-21 AND IFN-ALPHA HAVE BOTH OPPOSITE AND REDUNDANT ROLE ON HUMAN INNATE PRECURSORS AND MEMORY B-CELL DIFFERENTIATION....		148
ANNEXE 2 : THE DIVERSITY OF THE PLASMABLAST SIGNATURE ACROSS SPECIES AND EXPERIMENTAL CONDITIONS : A META-ANALYSIS		209
ANNEXE 3 : MOLECULAR MECHANISMS DRIVING IL-10 PRODUCING B CELLS FUNCTION : STAT3 AND MAF AS UNDERESTIMATED CENTRAL KEY REGULATORS.....		225
ANNEXE 4 : MISE EN EVIDENCE DES SITE PREDICTIFS DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE MAF		248
ANNEXE 5 : MISE EN EVIDENCE DE LA STRUCTURE PREDICTIVE DE LA PROTEINE MAF		253
BIBLIOGRAPHIE.....		254

TABLES DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 – Ontogénèse et différenciation des lymphocytes B.	22
Figure 2 – Dynamique d’expression des FT lors de la différenciation terminale des LB en PB et PC.	24
Figure 3 – Rôle et cibles des LBreg producteurs d’IL-10.	27
Figure 4 – Hétérogénéité et rôle des mécanismes immunosuppresseurs des LBreg32	32
Figure 5 – Voies de signalisation impliquées dans la production d’IL-10 par les LB41	41
Figure 6 – Représentation de la glissière à leucine (bZIP)42	42
Figure 7 – Représentation schématique des protéines de la sous-famille des MAF longs et leurs domaines extrêmement conservés.43	43
Figure 8 - Transcrit MAF_202 murin et protéine MAF murine courte44	44
Figure 9 - Transcrit MAF_201 murin et protéine MAF murine longue45	45
Figure 10 – Schéma récapitulatif des modifications post-traductionnelles des protéines c-MAF 46	46
Figure 11 – Ubiquitination de MAF48	48
Figure 12 – Sumoylation de MAF50	50
Figure 13 – Implication de MAF dans la différenciation en LT $\gamma\delta$ IL-17 ⁺54	54
Figure 14 – Régulation de la plasticité entre ILC1 et ILC3 par MAF56	56
Figure 15 – Rôle de MAF dans la production d’IL-10 par les LT et macrophages58	58
Figure 16 – Stratégie de discrimination des sous-populations de LB dans l’amygdale74	74
Figure 17 - Stratégie de discrimination des sous-populations de LB dans le sang75	75
Figure 18 – Représentation des transcrits MAF_201 et MAF_202 humains.81	81
Figure 19 - Représentation des protéines MAF humaines codées par les variants MAF_201 et MAF_202.82	82
Figure 20 - Représentation du transcrit MAF_203 et de la protéine prédictive correspondante. 82	82
Figure 21 - Alignement protéique de MAF court et MAF long.83	83
Figure 22 – Alignement des protéines MAF humaines et murines85	85
Figure 23 - Sites prédictifs de phosphorylation de MAF et kinases associées87	87
Figure 24- Sites prédictifs de phosphorylation de MAF88	88
Figure 25 - Schéma représentatif des sites prédictifs d’ubiquitination89	89
Figure 26 - Représentation schématique des sites prédictifs d’O- et N-glycosylation des protéines c-MAF, en utilisant la protéine longue comme matrice.91	91
Figure 27 – Structure tertiaire prédictive de MAF93	93
Figure 28- Représentation du positionnement des 3 sondes TaqMan™ sur les transcrits MAF_201 et MAF_202.95	95
Figure 29 - Expression des transcrits MAF dans les lignées dérivées de LB96	96
Figure 30 - Alignement des protéines MAF appartenant à la sous-famille des MAF longs de l’AA 1 à 50 du domaine TAD98	98
Figure 31 - Représentation des cibles des Ac anti-MAF de Western Blot99	99
Figure 32 - Localisation des couples d’amorces sur les transcrits MAF_201 et MAF_202100	100
Figure 33 – Identification du variant MAF inséré dans le plasmide pMAF-HA100	100
Figure 34 - Carte partielle du plasmide pMAF202-HA obtenu par séquençage.101	101
Figure 35 – Digestion enzymatique du plasmide pMAF202-HA102	102
Figure 36 - Validation de la spécificité des Ac de cytométrie en flux pour la détection de la protéine MAF courte103	103
Figure 37 - Validation des Ac de Western Blot pour la détection de la protéine MAF courte ...104	104
Figure 38 – Localisation des cibles des Ac anti-MAF capable de reconnaître la protéine MAF courte106	106
Figure 40- Etude de l’expression de MAF dans des lignées dérivées de LB par cytométrie de flux.107	107

Figure 41 - Etude de l'expression de MAF dans des lignées dérivées de LB par western blot...	108
Figure 42 – Etude des isoformes de MAF dans la lignée RPMI 8226.....	109
Figure 43 - Etude de l'expression de MAF dans les LB d'amygdale et du sang périphérique. ...	113
Figure 44 - Expression protéique de MAF dans les LB d'amygdale et du sang périphérique....	114
Figure 45 - Etude de l'expression de MAF en fonction du stade de différenciation des LB	116
Figure 46 - Expression de MAF dans deux populations de PB de l'amygdale en fonction de leur expression d'IgM.....	118
Figure 47 - Etude de la différenciation en PB en réponse au modèle de stimulation in vitro des LB.....	119
Figure 48 - Etude de l'expression de MAF dans un modèle de différenciation des LB.....	121
Figure 49 – Etude de l'expression des isoformes de MAF dans un modèle de différenciation des LB in vitro.....	123
Figure 50 - Etude de la production d'IL-10 dans les LB primaires issus du sang périphérique et d'amygdales.....	126
Figure 51 - Etude de l'expression d'IL-10 en fonction du stade de différenciation des LB.	127
Figure 52 - Validation du modèle in vitro de production d'IL-10 par les LB.....	129
Figure 53 - Evaluation de l'expression de MAF dans les LB stimulés par le CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.	130
Figure 54 - Etude de l'expression conjointe de MAF et d'IL-10 dans les LB en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.	131
Figure 55 - Etude de l'expression des isoformes de MAF dans un modèle de production in vitro d'IL-10 par les LB.....	132
Figure 56 – Evaluation de la spécificité de détection des Ac anti-MAF BLR045F et α M1 dans les LB d'amygdale.	137
Figure 57 - Identification des protéines ciblées par l'Ac BLR045F par MS dans les LB d'amygdale	138
Figure 58 - Stratégies et résultats de la validation renforcée des Ac α M1 et BLR045F dans les lignées et les LB d'amygdales.	139
Figure 59 - Rôle hypothétique de MAF dans la balance moléculaire au cours de la différenciation terminale des LB.	146

Tableau 1 - Hétérogénéité des phénotypes et mécanismes immuno-suppresseurs des LBreg	37
Tableau 2 – Panel de validation de la pureté des LB	67
Tableau 3 – Amorces utilisées pour la détection des transcrits MAF.....	69
Tableau 4 – Description du programme de PCR	69
Tableau 5 –Description des amorces utilisées pour le séquençage de pMAF-HA	71
Tableau 6 – Sondes Taqman™ utilisées pour la quantification de MAF et de l'endogène	72
Tableau 7 – Tableau récapitulatif des phénotypes des LB au cours de leur différenciation.....	73
Tableau 8 – Marquage extracellulaire des LB	76
Tableau 9 – Transcrits et protéines MAF : Homologie entre l'Homme et la souris.....	86
Tableau 10 - Tableau récapitulatif des différents Ac anti-MAF.....	98

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

AA: acides aminés
Ac: anticorps
ADN: acide désoxyribonucléique
Ag: antigène
AHR: *aryl hydrocarbon receptor*
AKT: protéine kinase B
AP-1: protéine activatrice 1
Arg1: arginase 1
ARN: acide ribonucléique
APC: complexe de promotion de l'anaphase

B

BACH2: *BTB domain and CNC homology 2*
BCR: *B cell receptor*
BCL-2: *B cell lymphoma 2*
BCL-6: *B cell lymphoma 6*
BLIMP-1: *B lymphocyte induced maturation protein 1*
BMDM: *bone marrow-derived macrophage*
bZIP: *basic leucine zipper*

C

CA: cellule apoptotique
CCL: chimiokine
CDS: séquences codantes
CCR ou CXCR: récepteur aux chimiokine
CD: cluster de différenciation

Cdc2: kinase dépendante de la cycline 2
Cdk5: kinase dépendante de la cycline 5
CG: centre germinatif
ChIP: immunoprécipitation de la chromatine
CI: commutation isotypique
CIA: arthrite auto-immune induite par le collagène
CKI ou CKII: caséine kinase 1 ou 2
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CMV: cytomégalovirus
CREB: *cAMP response element binding protein*
CSH: cellule souche hématopoïétique
C-ter: C-terminal
CTLA4: *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*

D

DC: cellule dendritique
DN: double négatif
DNAPK: protéine kinase dépendante de l'ADN
DUB: dé-ubiquitinase

E

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EF-1 α : *elongation factor 1 alpha*
EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique
EHR: région d'homologie étendue
ERK: *extracellular signal regulated kinase*

F

FT: facteur de transcription

FOXP3: *forkhead box P3*

G/H

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GrB: granzyme B

HA: hémagglutinine

HMS: hypermutation somatique

I

IFN: interferon

IFNAR: *interferon alpha and beta receptor subunit*

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

ILC : cellule lymphoïde innée

iNKT: *CD1d-restricted natural killer*

IP : Immunoprécipitation

K

kDa: kilo Dalton

L

LB10: B producteur d'IL-10

LB10pro: progéniteur de LB producteur d'IL-10

LBe: B effecteur

LBmem: B mémoire

LBreg: B régulateur

LBr1: LBreg de type 1

LBr3: LBreg de type 3

LB Tr: LB transitionnel

LLC: leucémie lymphoïde chronique

LPS: lipopolysaccharide

LT $\alpha\beta$: LT alpha beta

LT $\gamma\delta$: LT gamma delta

LTh: LT auxiliaire

LTfh: LT folliculaire auxiliaire

LTreg: LT régulateur

LTr1: LTreg de type 1

M

M1/M2: macrophage de type 1 ou type 2

MAPK: *mitogen associated protein kinase*

MARE: MAF recognition element

MM: myélome multiple

MO: moelle osseuse

MPT: modification post-traductionnelle

MS: spectrométrie de masse

MTB: *mycobacterium tuberculosis*

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

Myd88: *myeloid differentiation factor 88*

MZ: zone marginale

MZB: LB de la zone marginale

N

NARB⁺: LB NA CD45RB

NF-KB: *nuclear factor kappa B*

NK: *natural killer cell*

NOD: non-obese diabetic mice

N-ter : N-terminal

O

OLS: organe lymphoïde secondaire

P

Pam3: lipopeptide synthétique triacétylé

PAX5: paired box 5

PB: plasmablaste

PC: plasmocyte

pDC: cellule dendritique plasmacytoïde

PD-1: *programmed cell death 1*

PD-L1: *programmed death ligand 1*

PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*

PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PKG: protéine kinase G

PMA: phorbol myristate acetate

Pré-B: précurseur de cellule B

Pro-B: progéniteur de cellule B

R

R848: resiquimod (ligand des TLR7/8)

RA: polyarthrite rhumatoïde

ROR γ T: *RAR-related orphan receptor gamma*

RORc: *RAR-related orphan receptor C*

RT-qPCR: *reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction*

S

SEN1/ SUSP: *sen1/SUMO-specific protease*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SEM: erreur standard à la moyenne

shRNA: petit ARN en épingle

siRNA: ARN interférant

SLAM: *signal lymphocytic activating*

SLE: lupus érythémateux systémique

SM: LB mémoire commuté

SRC: *sarc tyrosine kinase*

STAT: *specific signal transducers and activators of transcription*

SUMO: *small ubiquitin-like modifier*

T

TAD: *transactivation domain*

TAMs: *tumor associated macrophages*

T-BET: *T-box expressed in T cells*

TCR: *T cell receptor*

TGF- β : *tumor growth factor beta*

TLR: *toll-like receptor*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

TRAF: *TIR-domain containing adapter-inducing IFN β*

U

UTR: *untranslated transcribed region*

USM: LB mémoire non commuté

Z

ZS: zone sombre

ZC: zone claire

Autres

α M : anti-MAF

INTRODUCTION

1. ONTOGENESE ET DIFFERENCIATION DES LB

Le processus de développement des LB peut être divisé en trois grandes étapes : la génération de LB matures, l'activation de ces LB lors de la rencontre avec l'antigène (Ag) et la différenciation des LB activés en plasmocytes (PC) ou LB mémoires (LBmem). Ces grandes étapes vont se succéder de l'étape de génération du progéniteur des LB (pro-LB) dans la moelle osseuse (MO) au stade PC sécréteurs d'anticorps (Ac) dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), tels que les ganglions lymphatiques, la rate, l'amygdale.... (**Figure 1**).

1.1. Développement des LB dans la MO

La première étape de la lymphopoïèse LB est la génération de pro-B à partir de cellules souches hématopoïétiques qui se déroule dans la MO. Du stade pro-B, puis précurseur des LB (pré-B) au stade de LB immatures, vont se succéder différentes recombinaisons des segments d'ADN codant pour les chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline du récepteur des cellules B (BCR) (Van Zelm et al., 2007; Melchers, 2007). Au stade pré-B, la chaîne lourde est temporairement exprimée à la surface de la cellule et constitue un pré-BCR avec une chaîne légère de substitution. Le complexe pré-BCR est ensuite internalisé puis réarrangé dans le but de générer un BCR fonctionnel. De ce fait, l'expression des gènes codant pour les protéines de signalisation du BCR, de l'Ig α et de l'Ig β et du CD19 vont être induits. Au stade immature, les LB expriment à leur surface un BCR de type IgM. Les LB immatures auto-réactifs vont soit subir un réarrangement de la chaîne légère du BCR visant à supprimer la reconnaissance des auto-Ag, soit entrer en anergie, soit entrer en apoptose (Ichii et al., 2014). Malgré ces mécanismes de la tolérance centrale, plus de 50 % des LB immatures auto-réactifs peuvent sortir de la MO (Wardemann et al., 2003). Néanmoins, ils pourront être éliminés lors d'une seconde étape de tolérance en périphérie où ces cellules deviennent anergiques (Gauld et al.,

2005). Ensuite, les LB immatures sortent de la MO et passent par une étape transitoire de LB Tr qui expriment des IgM et IgD à leur surface.

1.2. Maturation et Différenciation dans les OLS

Les LB Tr vont migrer de la MO vers les OLS, et notamment la rate, via la circulation sanguine et la circulation lymphatique. A ce stade, les LB peuvent bifurquer vers une différenciation en LB dans la zone marginale (MZB) ou en LB folliculaire (LB FO). Plusieurs études chez la souris ont décrit un rôle essentiel de la réactivité du BCR dans l'orientation vers la différenciation en MZB ou en LB FO (Cariappa et al., 2001 ; Cariappa et al., 2007). En effet, dans un modèle de souris transgénique où les B expriment un BCR spécifique du lysosyme d'œuf de poule, il a été observé qu'en absence de cet antigène, les MZB et les LB FO ne sont pas capables de développer (Cariappa et al., 2007). Par ailleurs, un fort signal du BCR promeut une différenciation vers la voie folliculaire *via. A contrario*, un faible signal du BCR permet une différenciation vers la voie marginale (Cariappa et al., 2001). Chez l'Homme, ces voies sont moins décrites.

1.2.1. Différenciation des LB de la ZM

Les MZB sont les premiers LB à rencontrer les Ag provenant du sang. Ils représentent la première ligne de défense de la rate contre les pathogènes et font partie des LB « innés », dû à la faible diversité de la région variable de leur BCR (Grasseau et al., 2019). Les MZB peuvent se différencier en plasmablastes (PB) puis en PC.

Contrairement à leurs homologues murins, les MZB humains comprennent deux populations séparées par leur localisation : ceux qui résident dans la MZ et ceux qui circulent dans le sang périphérique appelés « MZB-like » ou encore LB mémoires non commutés IgM⁺ IgD^{+/faible} CD27⁺ (USM). Certaines études suggèrent l'existence d'une population précurseur des MZB humains dans la rate qui se distingue par l'expression

d'un variant O-glycosylé de la protéine CD45RB (Bemark et al., 2013 ; Descatoire et al., 2014). Récemment, dans une étude s'intéressant au devenir des LB à différents stades de différenciation en fonction des signalisations induites, nous avons mis en évidence une sous-population de LB matures naïfs CD19⁺ CD27⁻ CD38^{int} IgD⁺ IgM^{fort} CD45RB⁺ dans le sang périphérique, appelée NARB⁺. Ces cellules présentent des attributs communs aux MZB tout en conservant une certaine plasticité en réponse à différentes cytokines (interféron-alpha et interleukine-21). Notre étude suggère une passerelle entre les voies de différenciation folliculaire et marginale. La découverte des NARB⁺ fait l'objet d'une publication présentée en Annexe 1 « Dual in-vitro response to activation reveals human mature B-cell precursors with multiple differentiation potentials » (Boudigou et al., 2021).

1.2.2. Initiation de la réponse immunitaire

Les B matures naïfs (NA) peuvent circuler entre le sang et les OLS jusqu'à rencontrer Ag. A leur rencontre avec l'Ag, ils vont migrer en bordure des follicules et de la zone T où ils vont être en contact avec des lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh). A cette étape, les LB présentent l'Ag préalablement internalisé et digéré via leur complexe majeur d'histocompatibilité de type II au récepteur des lymphocytes T (TCR). En réponse à cette présentation de peptides antigéniques aux LTfh, les LB vont recevoir des signaux de co-stimulations provenant des LTfh qui interviennent dans l'activation complète du LB mature. Ces co-stimulations comprennent l'interaction du CD40 des LB avec son ligand CD40L et l'interaction de la molécule de costimulation CD28 des T à ses ligands CD80 et CD86 exprimés par les LB. Les LB activés peuvent ensuite se différencier soit en plasmocytes producteurs d'IgM, soit en Bmem non commutés qui ont mûri indépendamment des centres germinatifs (CG), soit former des CG.

1.2.2.1. Différenciation dépendante des CG

Les CG sont composés de la zone sombre (ZS) qui est la plus proche de la zone T et dans laquelle les LB prolifèrent et comprenant aussi la zone claire (ZC) qui contient des LB CG et d'autres cellules immunitaires (cellules dendritiques (DC), LTfh et macrophages). Dans la ZS, se déroule un processus induisant la mutation des régions variables de l'immunoglobuline, nommé hypermutation somatique (HMS). Il conduit à des mutations ponctuelles sur l'ensemble des gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères et est suivi par une sélection des variants de forte affinité pour l'Ag dans la ZC. Dans la ZC, deux processus sont mis en place : la commutation isotypique (CI) qui induit des excisions des séquences sur la partie constante de l'Ig qui codent pour les différentes classes isotypique d'Ig (IgM IgG, IgA et IgE) (Xu et al., 2012) et la sélection des variants de forte affinité.

Chez la souris, plusieurs sous-populations de LBmem sont générées dans les CG après l'immunisation par l'Ag : les LBmem non commutés IgM⁺ (LB USM pour « unswitched-memory ») et les LBmem commutés (LB SM pour « Switched-Memory ») CD19⁺ CD27⁺ CD38^{int} IgG1⁺ (Dogan et al., 2009). En réponse à une seconde immunisation (180 jours après la première), les LB SM IgG1⁺ sont capables de se différencier en PC CD19^{faible} CD27^{fort} CD38^{fort} IgD⁻ IgM⁻ qui produisent des IgG1 alors que les LB USM IgM⁺ recommencent un cycle dans les CG où ils subissent d'autres mutations dans le but d'améliorer leur affinité pour l'Ag. Chez l'homme, la présence d'une mutation du gène *BCL6*, propre aux cellules provenant des CG a été identifiée dans des sous-populations de LB USM IgM⁺ IgD^{+/-} CD27⁺ (Seifert et Küppers, 2009). Par ailleurs, les LBmem des CG sont capables de se différencier en PB IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺, contrairement à leurs homologues murins.

A l'issue des CG, les PC générés sont considérés comme des PC à longue durée de vie (LLPC pour « long-lived plasma cells »), car ils peuvent migrer vers la MO et perdurer durant de nombreuses années. Les LLPC permettent la mise en place d'une mémoire humorale (très importante lors du processus de vaccination) et peuvent rester dans les niches de la MO jusqu'à une réinfection par le même pathogène.

1.2.2.2. La voie extra-folliculaire

La voie extra-folliculaire conduit à l'expansion et à la différenciation rapide des LB activés en LBmem, PB et PC en dehors des CG. Les LB présentant une faible affinité pour l'Ag se différencient en LB USM, généralement de type IgM (Taylor et al., 2012). Les LB de forte affinité migrent à la frontière des zones LB/LT et se différencient en PB et PC. Les PB et PC extra-folliculaires sont générés dès le 2^e jour après une infection (Pape et al., 2003) et présentent une durée de vie assez courte entre 3 et 5 jours (McHeyzer-Williams et McHeyzer-Williams, 2005), permettant une protection initiale contre les agents pathogènes avant la réponse dépendante des CG (Elsner et Slomchik, 2020).

La différenciation extra-folliculaire a été décrite dans certains modèles murins où la réponse de CG est altérée. Ce phénomène a été illustré dans un modèle murin d'infection par la *Salmonella typhimurium*, où les PB extra-folliculaires ont mis en place une réponse humorale qui a persisté jusqu'à 5 semaines (Cunningham et al., 2007). Lors de l'infection par la *Salmonella typhimurium*, les LB activés sont capables de mettre en place des processus de HMS et CI afin de générer des Ac de haute affinité pour l'Ag au sein du milieu extra-folliculaire (Di Niro et al., 2015 ; Jenks et al., 2019). En effet, il apparaît que la CI peut être initiée avant la formation de CG et l'entrée dans la voie extra-folliculaire chez la souris (Rocco et al., 2019). La réponse extra-folliculaire est également observée en cas d'infections parasitaires, telles que celle à *Trypanosoma cruzi* (Bermejo et al., 2011) ou à *Leishmania infantum* (Silva-O'Hare et al., 2016).

Sang

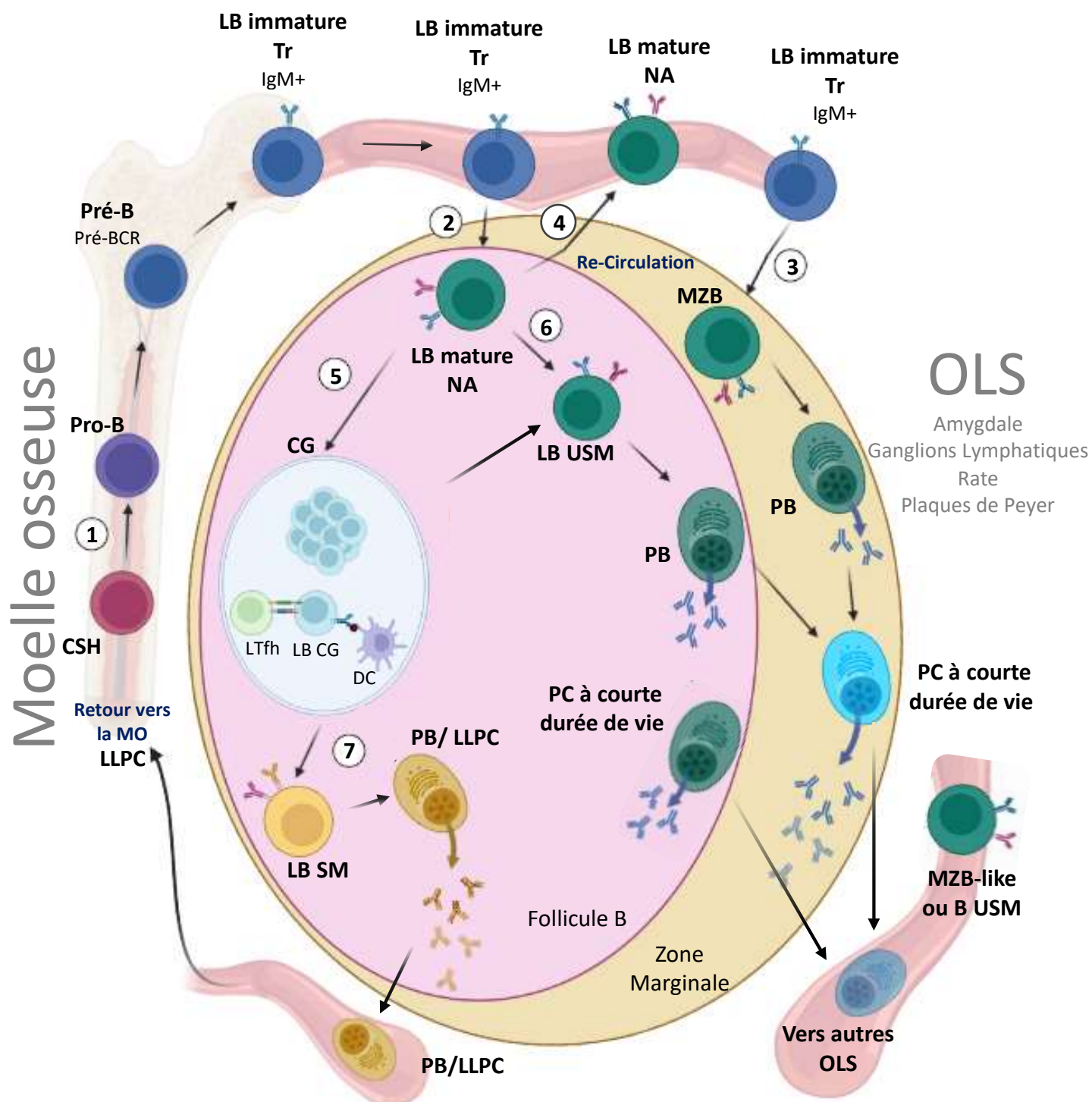


Figure 1 – Ontogénèse et différenciation des lymphocytes B.

CSH : cellule souche hématopoïétique ; **OLS** : organe lymphoïde secondaire ; **Pro-B** : progéniteur de B ; **Pré-B** : précurseur de B ; **LB immature Tr** : LB immature transitionnel ; **LB mature NA** (naïf) : qui n'a pas encore rencontré l'antigène ; **LB USM ou MZB-like**: LB mémoire non commuté ; **LB CG** : LB des centres germinatifs ; **LB SM** : LB mémoire commuté ;

PB : plasmablaste ; **PC** : plasmocyte ; **LLPC** : PC à longue durée de vie. La zone marginale est indiquée par un cercle jaune, le follicule B par un cercle rose et le centre germinatif par un cercle bleu.

1. Première étape du développement du LB dans la MO : génération de la cellule pro-B à partir de CSH. 2. Entrée du LB immature Tr dans le follicule de l'OLS et maturation en LB NA. 3. Entrée du LB immature Tr dans la zone marginale de l'OLS et maturation en MZB. 4. Circulation des LB NA vers les autres OLS jusqu'à rencontrer un antigène. 5. Formation des CG. 6. Différenciation des LB NA en LB USM. 7. Différenciation des LB SM en PB/PC sécréteurs d'IgA, IgG ou IgE.

1.3. Régulation moléculaire de la différenciation des PB

La différenciation terminale des LB en cellules sécrétrices d'Ac (ASC), comprenant les PB et PC, se caractérise par une augmentation progressive du facteur de transcription (FT) « Interferon regulatory factor 4 » (IRF4). Une forte expression d'IRF4 réprime celle des FT « B cell lymphoma protein 6 » (BCL6) et IRF8, tout en induisant celle du FT « B lymphocyte induced maturation protein-1 » (BLIMP-1), codé par le gène *PRDM1*. Afin d'assurer les fonctions des ASC, BLIMP-1 régule négativement plusieurs autres FT impliqués dans les étapes antérieures de la maturation et la différenciation du LB, tels que « Paired Box Gene 5 » (PAX5), BCL-6 et c-MYC. BLIMP-1 permet l'augmentation de l'expression XBP-1 *via* la levée d'inhibition de PAX5, conduisant à la sécrétion d'Ac. Il est nécessaire à l'induction de la « Unfolded Protein Response » (UPR), permettant la production d'une grande quantité d'Ac, médiée par un remodelage du réticulum endoplasmique (Tellier et al., 2016).


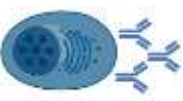
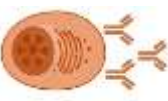
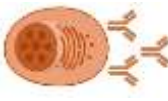
	LB activé	PB	PC à courte durée de vie	LLPC
				
Localisation	OLS, Sang	OLS, Sang	OLS, Sang	MO
Prolifération	+	+	-	-
Marqueurs phénotypiques	CD19⁺ CD20⁺ CD27^{+/-} CD38^{+/-} CD138⁻	CD19⁺ CD20^{faible} CD27^{fort} CD38^{fort} CD138^{+/-}	CD19^{faible} CD20^{faible} CD27^{fort} CD38^{fort} CD138⁺	CD19^{faible} CD20^{faible} CD27^{fort} CD38^{fort} CD138⁺
Marqueurs moléculaires	PAX5⁺ c-MYC⁺ BCL6⁺ IRF4⁺ BLIMP-1⁻ XBP1⁻	PAX5⁻ c-MYC⁻ BCL6⁻ IRF4⁺⁺⁺ BLIMP-1⁺ XBP1⁺	PAX5⁻ c-MYC⁻ BCL6⁻ IRF4⁺⁺⁺ BLIMP-1⁺⁺⁺ XBP1⁺⁺⁺	PAX5⁻ c-MYC⁻ BCL6⁻ IRF4⁺⁺⁺ BLIMP-1⁺⁺⁺ XBP1⁺⁺⁺

Figure 2 – Dynamique d’expression des FT lors de la différenciation terminale des LB en PB et PC. Schéma d’après Tellier et Nutt, 2019

Les PB sont décrits comme des cellules prolifératives circulantes à courte durée de vie. Ils sont considérés comme des précurseurs des PC (Sanz et al., 2019 ; Palm et Henry, 2019). A ce jour, la signature moléculaire des PC humains de la MO est bien établie. Ce qui n’est pas le cas des PB en raison des discordances entre les différentes études (Halliley et al., 2015 ; Valor et al., 2017 ; De Masson et al., 2015). Au sein du laboratoire, une analyse comparative du transcriptome de trois sous-populations de LB humains et murins, incluant les LB matures non différenciés, les PB et les PC a été réalisée. Elle s’est basée sur des jeux de données publiques (GEO)(Grasseau et al., 2021). Nous avons mis en évidence que comparativement aux LB non différenciés, les PB présentent une diminution des FT impliqués dans le maintien du lignage B tels que *PAX5*, *IRF8* et *BACH2* et une augmentation de ceux impliqués dans la différenciation terminale des LB tels que l’*IRF4* et *BLIMP-1*. La définition de la signature moléculaire des PB fait l’objet d’une publication présentée en Annexe 2 (Grasseau et al., 2021).

En plus de leurs fonctions effectrices (production d'anticorps, implication dans la réponse pro-inflammatoire), les LB sont aussi dotés de fonctions régulatrices.

2. LES LB REGULATEURS

2.1. Découverte des LB régulateurs

L'existence des LB régulateurs (LBreg) a d'abord été mise en évidence chez la souris dans un modèle murin de sclérose en plaque : l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Wolf et al., 1996). Dans ce modèle, des souris contrôles subissent une injection de protéines de la myéline, générant une forte réponse immunitaire via une prolifération de LTh1 et LTh17 dirigés contre la myéline du système nerveux central et ainsi, le déclenchement de l'EAE. Ces souris présentent ensuite une guérison spontanée. Les souris EAE présentant une délétion pour la région transmembranaire de l'Ig des LB (BCR non fonctionnel), ne présentaient pas de guérison spontanée de l'EAE contrairement aux souris EAE contrôles, indiquant qu'en absence de signaux inducteurs du BCR, les LT dirigés contre la myéline n'étaient pas supprimés. Cette étude était la première à suggérer un rôle régulateur des LB.

Depuis, de nombreuses études focalisées sur différentes maladies auto-immunes telles que le psoriasis (Hayashi et al., 2016), la sclérose en plaques (Matsushita et al., 2016), la polyarthrite rhumatoïde (Flores-Borja et al., 2013)), mais aussi dans des infections virales (Siewe et al., 2013) et la réponse immunitaire allergique (Kamekura et al., 2015) ont mis en lumière leur rôle, leur grande hétérogénéité de mécanismes d'action variés et de phénotypes.

2.2. La production d'interleukine 10 : le mécanisme d'immunosuppression majoritairement décrit dans les LBreg

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire décrite dans le maintien de l'équilibre entre une réponse immune adaptée et une réponse immune exacerbée. Auparavant, l'IL-10 était décrite comme un facteur de croissance des LB en induisant

leur prolifération, la production d'Ac et l'expression du CMH de type II (Levy et Brouet, 1994).

Son rôle dans la régulation a été décrite dans les modèles murins d'EAE (Fillatreau et al., 2002). En l'absence de production d'IL-10, les LB n'exerçaient pas leur rôle protecteur de l'EAE. Depuis une multitude d'études *in vitro* et *in vivo* a mis en évidence que les LB sont capables de supprimer la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires des LT CD4⁺ *via* la production d'IL-10. Ils permettent une diminution de l'inflammation dans les modèles murins de maladies auto-immunes (Matsushita et al., 2010 ; Carter et al., 2012 ; Yoshizaki et al., 2012) ou de maladies infectieuses (Kalkal et al., 2022). D'autres études ont mis en exergue la capacité des LBreg sécréteurs d'IL-10 à inhiber des cellules de l'immunité innée telles que les cellules lymphoïdes innée de type 2 (ILC2, «type-2 innate lymphoid cells ») (Kim et al., 2019), les neutrophiles et NK (Liu et al., 2013 ; Neves et al., 2010). En parallèle de leur capacité suppressive, les LBreg IL-10⁺ murins sont capables de favoriser la conversion des LT CD4⁺ en LTreg *via* l'induction du FT FoxP3 (Carter et al., 2012).

Chez l'homme, une faible proportion de LBreg IL-10⁺ est associée à la persistance de l'inflammation chez les patients présentant un rejet de greffe (Luo et al., 2021) et ceux atteints de pathologies auto-immunes ou infectieuses telles que la COVID-19 (Cervantes-Diaz et al., 2022), la sclérodermie (Hori et al., 2022), l'hépatite E (Sharma et Tripathy, 2022) ou le VIH (Gutiérrez et al., 2019). Les LBreg IL-10⁺ humains sont également capables de supprimer la réponse pro-inflammatoire des T *via* la production d'IL-10 (Sharma et Tripathy, 2022 ; Brosseau et al., 2018 ; Das et al., 2012). En parallèle, les LBreg humains peuvent inhiber *via* leur production d'IL-10, la production d'interféron alpha (IFN α) par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Menon et al., 2016) et de « Tumor necrosis factor alpha » (TNF- α) par les monocytes (Iwata et al., 2011). En plus de leur activité inhibitrice, les LBreg IL-10⁺ humains peuvent favoriser la conversion des LT CD4⁺ CD25⁻ en LTreg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Tarique et al., 2018 ; Flores-Borja et al., 2013). Les LBreg IL-10⁺ sont aussi capables d'augmenter la différenciation des LB en PC producteurs d'IgG de type 4, ce qui conduit à la suppression des mastocytes et des basophiles (Van der Veen et al., 2013 ; Van der Veen et al., 2016).

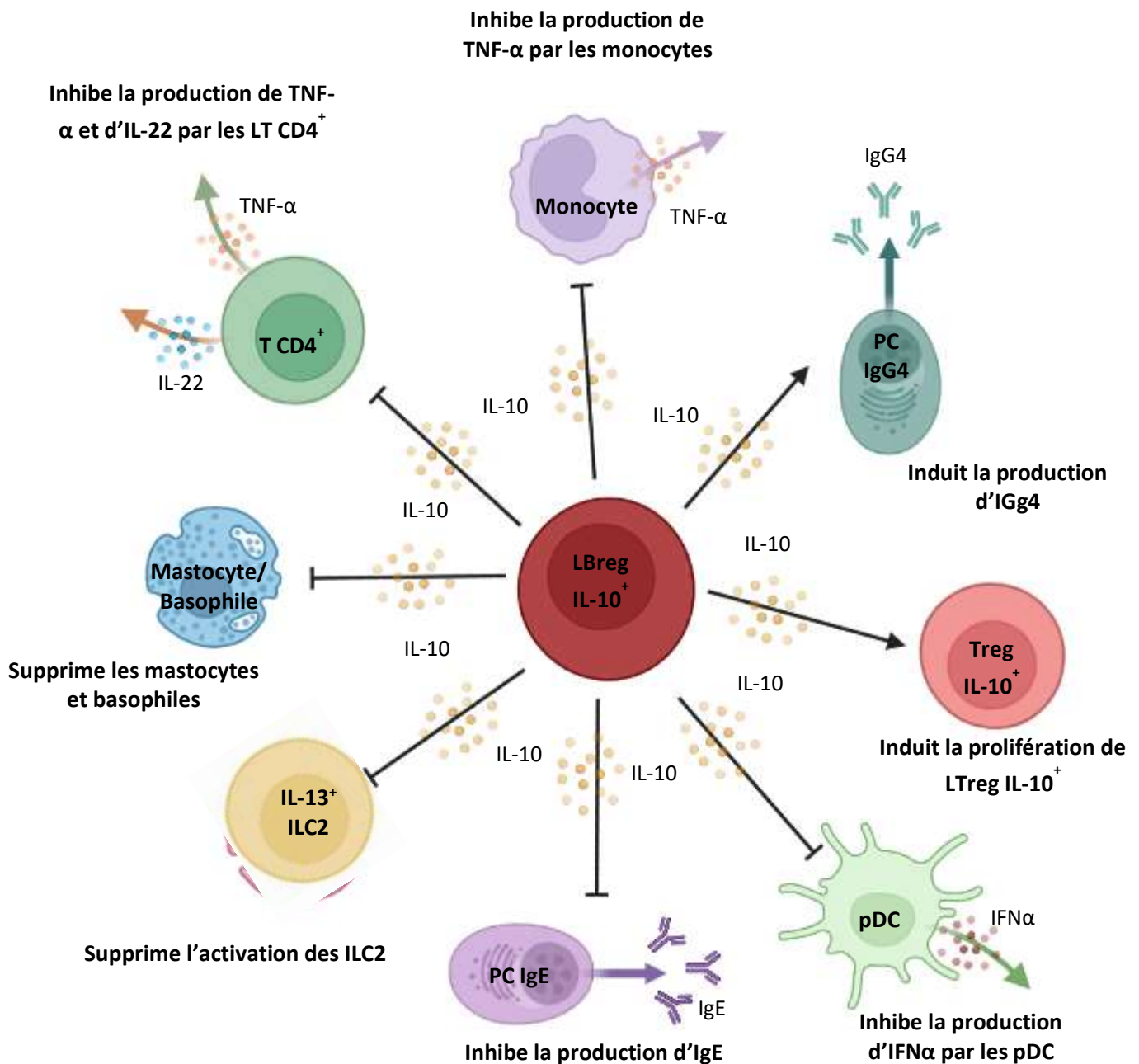


Figure 3 – Rôle et cibles des LBreg producteurs d'IL-10

Les LBreg IL-10⁺ inhibent la production de TNF α par les monocytes et LT CD4⁺ (Iwata et al., 2011), la production d'IFN α par les pDC (Menon et al., 2016), la production d'IgE par les PC (van der Veen et al., 2014). Ils suppriment l'activation des ILC2 (Kim et al., 2019). *Via* leur production d'IL-10, ils favorisent la différenciation des LB en PC sécréteurs d'IgG4 qui suppriment les mastocytes et basophiles (van der Veen et al., 2014). Enfin, ils favorisent la conversion en LTreg en induisant l'expression de FoxP3 (Tarique et al., 2018).

2.3. Des mécanismes d'action indépendants ou concomittants à la production d'IL-10

Différentes études ont montré que les LB pouvaient utiliser une multitude de mécanismes immunosuppresseurs afin de réguler leurs cibles tels que la production du «Transforming growth factor bêta » (TGF- β) et d'interleukine 35 (IL-35), mais aussi l'expression de granzyme B (GrB), de Fas ligand (FasL) et de « Programmed-death ligand 1 » (PD-L1) (*Figure 4*).

2.3.1. La production de TGF- β

La production de TGF- β par les LB localisés dans les muqueuses et les ganglions lymphatiques a d'abord été décrite dans un modèle murin de réponse immunitaire allergique (Natarajan et al., 2012). Au cours de la réponse allergique, l'augmentation de la proportion de LB CD5⁺ producteurs de TGF- β était impliquée dans la résolution de l'inflammation. La production de TGF- β par les LB promeut la différenciation des T CD4⁺ CD25⁻ en L_{Treg} (Liu et al., 2013) *via* l'induction de FoxP3 (Natarajan et al., 2012), induit aussi la suppression de la réponse inflammatoire médiée par les L_{Th2} (Zhang et al., 2013) et altère la balance entre les sous-populations de LT auxiliaires (L_{Th1}, L_{Th2} et L_{Th17}) (Wang et al., 2019). En parallèle, les LB_{reg} sécréteurs de TGF- β limitent la maturation des DC en diminuant l'expression de leurs molécules de stimulatrices telles que CD80 et CD86 qui permettent l'activation des LT lors de la présentation d'Ag (Zhang et al., 2013). LB_{reg} TGF- β ⁺ peuvent induire leur conversion en DC immuno-régulatrices appelés « DC tolérogéniques » (Yang et al., 2015), décrites pour induire à leur tour, des LB aux fonctions régulatrices chez les souris atteintes de diabète auto-immun de type 1 (Di Caro et al., 2014).

Chez l'homme, les LB producteurs de TGF- β apparaissent au cours de la réponse allergique (Lee et al., 2011) et en réponse au traitement chez les patients atteints de sclérose en plaque (Blumenfeld Kan et al., 2019). De plus, l'augmentation de l'expression du TGF- β par les LB_{regs} corrèle avec un phénotype de type épuisé (« exhausted ») des LT. D'autres études ont illustré le mode d'action des B TGF- β ⁺ dans

des modèles de co-culture *in vitro* de LB et LT issus du sang périphérique (Wang et al., 2015 ; Nouël et al, 2015). L'utilisation de ce modèle *in vitro* a permis d'identifier une régulation de la prolifération des LT et la conversion de LT CD4⁺ CD25⁻ en LTreg FoxP3⁺ *via* la production de TGF- β des B CD24^{fort} CD38^{fort} en réponse à la stimulation BCR/CD40L (Xu et al., 2019).

2.3.2. La production d'IL-35

En premier lieu, la production d'IL-35 par les LB a été décrite dans deux études utilisant des modèles murins différentes *via* des approches complémentaires (Wang et al., 2014 ; Shen et al., 2014). Dans la première étude, le traitement de souris atteintes d'uvéïte par l'IL-35 conduit à une augmentation de la proportion de LB sécréteurs d'IL-35, associée à une suppression de l'uvéïte (Wang et al., 2014). Dans la seconde, des LBreg producteurs d'IL-35 ont été mis en évidence. Ces derniers présentaient une action régulatrice dans l'EAE et lors d'une infection bactérienne par la *Salmonella typhimurium* (Shen et al., 2014). Les souris dont les LB ne produisent pas d'IL-35, ne guérissent pas spontanément de l'EAE. En revanche, l'absence d'expression d'IL-35 par les LB conduit à une augmentation de la résistance des souris à la salmonellose.

Chez l'homme, les LBreg IL-35⁺ sont utilisés comme des biomarqueurs de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD) (Fonseca-Camarillo et al., 2015) et du cancer gastrique (Wang et al., 2018). Leur présence suggère la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire. Chez les patients atteints de SLE (Ye et al., 2019) ou de la maladie de Crohn (Zhao et al., 2020), les proportions de LBreg sont fortement diminuées. En l'absence de LBreg IL-35⁺, les productions de cytokines pro-inflammatoires par LTh1 et LTh17 ne sont plus contrôlées, conduisant à une forte inflammation qui affecte le tractus digestif (De Souza et Fiocchi, 2015). Leur diminution au cours du lupus érythémateux systémique est associée à une augmentation des LB producteurs d'auto-Ac (Ye et al., 2019).

2.3.3. L'expression du GrB

Le granzyme B est un membre de la famille des « serine proteases » qui joue un rôle essentiel dans l'apoptose médiée par les granules. Les cellules GrB⁺ (T CD8 cytotoxiques, NK et LBreg GrB⁺) se lient à leur cible, puis libère le GrB contenu dans le granule, conduisant à une activation de la voie des caspases et à la fragmentation de l'ADN de la cellule cible.

La production de granzyme B par les LBreg a été mise en évidence dans différentes pathologies telles que la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Jahrsdörfer et al., 2006), le SLE (Hagn et al., 2010), les infections virales (KaTenmeier et al., 2015) et dans le contexte de la transplantation (Chesneau et al., 2015). Les LBreg GrB⁺ sont décrits pour la dégradation du TCR des LT conduisant à une suppression de leur prolifération (Lindner et al., 2013 ; Chesneau et al., 2020).

2.3.4. L'expression de FasL

L'expression de la protéine membranaire « Fas ligand » (FasL ou CD178) par les LB a été rapportée pour la première fois en 1996 (Hahne et al., 1996). Cette étude a démontré qu'en réponse à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS), des LB murins induisaient la destruction des cellules cibles sensibles au Fas *via* la production de FasL. Leur rôle a ensuite été décrit dans différents modèles murins de maladies auto-immunes, telles que l'arthrite induite par le collagène (souris CIA) ou le diabète auto-immun (souris « non-obese diabetic », NOD). Chez les souris CIA, la faible proportion de LB FasL⁺ est associée à une sévérité plus importante de l'arthrite (Lundy et al., 2009). Par ailleurs, un transfert de LB FasL⁺ issus de souris contrôles chez des souris pré-diabétiques NOD a conduit à une diminution de la réponse LTh1 et une protection contre la réponse auto-immune (Tian et al, 2001).

Chez l'homme, peu d'études décrivent l'expression de FasL par les LB. Chez les patients atteints du diabète auto-immun, les LB CD5⁺ qui expriment FasL sont fortement augmentés, suggérant une implication de ces cellules dans la physiopathologie de la maladie (Saxena et al., 2017). L'expression de FasL par les LB est augmentée en réponse

au traitement contre l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, indiquant un rôle des LB FasL⁺ dans la résolution de l'infection (van Rensburg et al., 2017).

2.3.5. L'expression de PD-L1

PD-L1 est une protéine membranaire qui peut être exprimée par les LB. Elle est décrite pour son rôle dans la physiopathologie de maladies infectieuses, auto-immunes et dans la progression du cancer. Son expression semble conférer aux les LB des propriétés régulatrices sur la prolifération des LT CD8⁺ en induisant leur apoptose chez les patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Siewe et al., 2013) et les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Zacca et al., 2018). Chez les patients atteints d'un cancer du sein invasif, l'expression de PD-L1 par les LB est responsable de l'induction de LTreg, impliqués dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale (Guan et al., 2016).

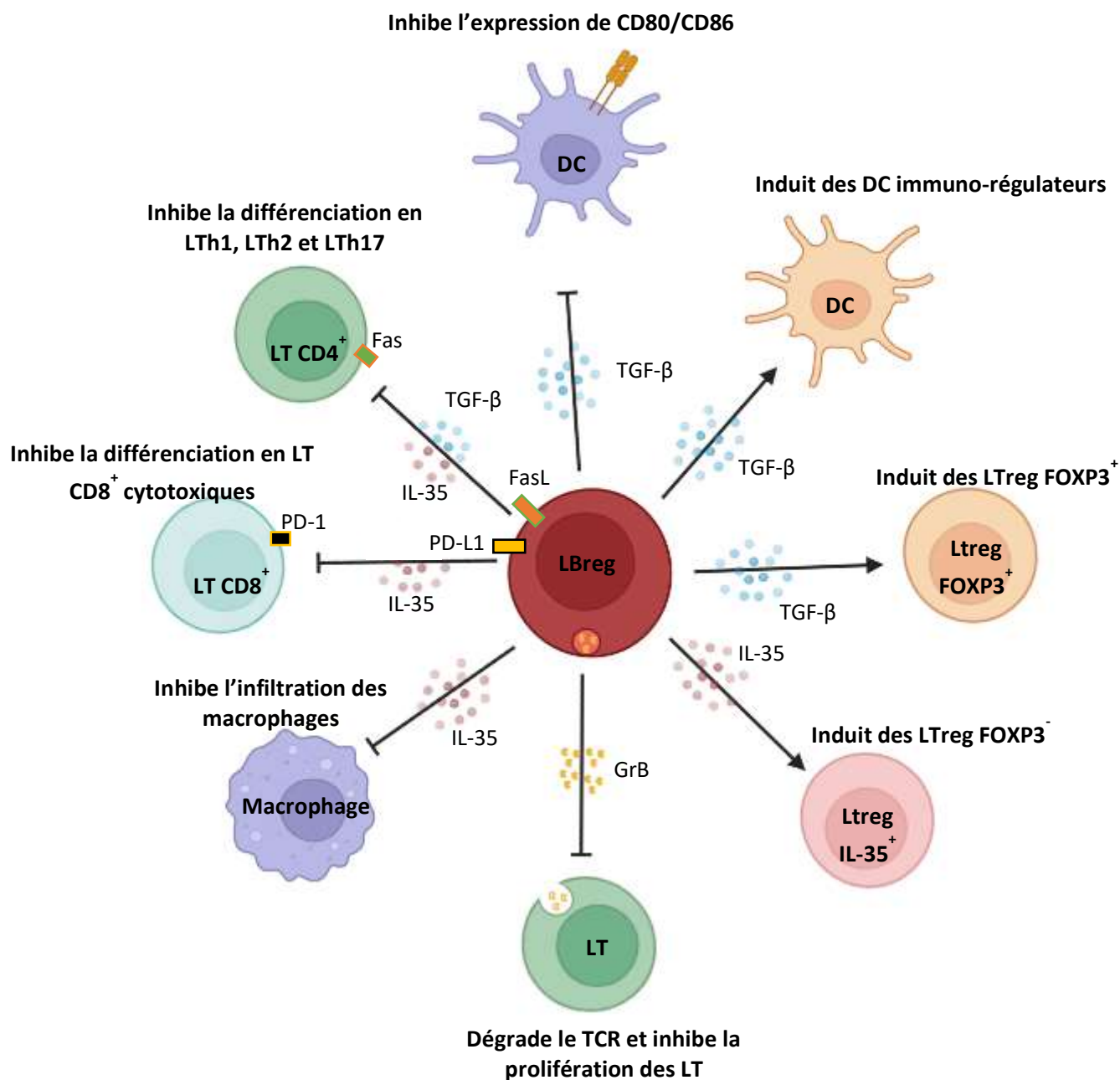


Figure 4 – Hétérogénéité et rôle des mécanismes immunosuppresseurs des LBreg

2.4. Hétérogénéité des phénotypes de LBreg

Différentes études décrivent que les cellules issues des différents stades de différenciation du LB sont capables d'exercer des fonctions régulatrices.

2.4.1. Les LB Tr producteurs d'IL-10

Plusieurs études décrivent une diminution de la proportion de LB Tr, associée à une augmentation de la sévérité de la maladie chez des patients atteints de pathologies infectieuses (Akatsuka et al., 2018) ou auto-immunes telles que le SLE (Yang et al., 2014), le psoriasis (Hayashi et al., 2016), la dermatite atopique (Yoshihara et al., 2019) ou la sclérose systémique (Matsushita et al., 2016).

L'une des premières études chez l'homme a décrit les LB Tr pour leur capacité de suppression de la différenciation LTh1 *via* la production d'IL-10 et la signalisation médiée par les molécules de costimulation CD80 et CD86 en réponse à une stimulation par du CD40 (Blair et al., 2010). D'autres études ont démontré leur capacité à supprimer de la prolifération et à réduire la production d'IFN γ , de TNF α ou d'IL-17 des LT *via* leur production d'IL-10 (Flores-Borja et al., 2013 ; Khoder et al., 2014 ; Mavropoulos et al., 2017 ; Cherukuri et al., 2021 ; Nova-Lamperti et al., 2016). Récemment, les LB Tr ont été identifiés comme ceux produisant les proportions les plus élevées d'IL-10 les parmi 6 sous-populations de LB (Glass et al., 2022). En pathologie, il est envisageable que leurs fonctions suppressives soient altérées, comme notamment chez les patients atteints de SLE. Les LB Tr des patients SLE sont incapables de produire de l'IL-10 en réponse à la stimulation par le CD40 et de supprimer des LTh1 (Blair et al., 2010).

En parallèle, les LB Tr ont la capacité de favoriser la différenciation en LTreg *via* leur production d'IL-10 (Flores-Borja et al., 2013). En revanche, les LB immatures Tr des patients atteints d'arthrite rhumatoïde n'ont plus la capacité d'induire la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LTreg.

2.4.2. Les LB CD1d⁺ CD5⁺

Le CD1d est une molécule de type CMH de classe I, qui présente des Ag lipidiques à un sous-ensemble de « natural killer T cells » (NKT) appelées « CD1d-restricted invariant NKT » (iNKT). La présentation d'Ag lipidiques aux iNKT induit leur prolifération, leur production de cytokines et leur conversion en cellules immunosuppressives (Chaudhry et Karadimitris, 2014). L'expression concomittante de CD5 et CD1d est associée aux LB immatures Tr et par les MZB (Allan et al., 2011).

Le rôle régulateur des LB CD1d^{fort} CD5⁺ ont d'abord été mis en évidence dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact (Yanaba et al., 2008). Dans ce modèle, des souris sont exposées à l'oxazolone et développent une inflammation médiée par les T. La délétion du *Cd19* (absence de LB fonctionnels) provoque une inflammation exagérée en réponse à l'exposition à l'oxazolone alors que son expression limite l'inflammation. Le contrôle de l'inflammation est réduite par la production d'IL-10 des LB CD1d^{fort} CD5⁺. En effet, un transfert de ces LB aux souris CD19^{-/-} exposées à l'oxazolone permet une diminution de leur inflammation. Une faible proportion de LB CD5⁺ CD1d^{fort} a été documentée dans plusieurs modèles murins de pathologies auto-immunes telles que le syndrome de Wiskott Aldrich (Yokoyama et al., 2015), l'endotoxémie systémique (Tao et al., 2019), l'EAE (Pennati et al., 2016) et la colique induite par le sulfate de dextrane sodique (Li et al., 2022). En revanche, leur proportion est fortement augmentée lors d'une infection parasitaire par le *Schistosoma mansoni* (Amu et al., 2010). Les LBreg CD5⁺ CD1d^{fort} sont aussi impliqués dans la mise en place d'une tolérance au greffon du cœur chez la souris traitée par médicaments anti-rejet (Zhou et al., 2021). Les LBreg CD5⁺ CD1d^{fort} sont capables d'induire la différenciation des iNKT en iNKT suppresseurs qui inhibent la réponse immunitaire médiée par les LTh1 et LTh17 arthrogéniques (Oleinika et al., 2018). Ils peuvent également inhiber de manière directe la production d'IFN γ et d'IL-17 par les LT *via* leur production d'IL-10 (Yanaba et al., 2013). En plus de leur fonction suppressive, le transfert de LBreg CD5⁺ CD1d^{fort} à des souris EAE promeut l'expansion des LTreg FoxP3⁺ et des LTr1 corrélée à des signes de guérison ou de rémission (Pennati et al., 2016).

Chez l'homme, les LB CD1d^{fort} CD5⁺ sont altérés dans différentes pathologies auto-immunes telles que le SLE (Bosma et al., 2012), la maladie thyroïdienne auto-immune (Stözek et al., 2020), la myasthénie sévère (Lai et al., 2017) alors qu'ils sont augmentés lors d'infections virales par l'hépatite B et C (Wang et al., 2014), bactériennes par *M.tuberculosis* (Zhang et al., 2012) et parasitaires par *S. mansoni* (Haeberlein et al., 2017). Les LB CD1d^{hi} CD5⁺ sont décrit pour leur suppression des LTh17 (Zhang et al., 2012).

2.4.3. Les LB mémoires CD24^{fort} CD27⁺

Les LB mémoires CD24^{fort} CD27⁺ sont capables de supprimer *via* leur production d'IL-10, la prolifération des monocytes et leur production de cytokine (Iwata et al., 2011), mais aussi celle des LT CD4⁺ producteurs d'IFN γ ou d'IL-17 (Mavropoulos et al., 2017). En plus de leur production d'IL-10, les B mémoires CD24^{fort} CD27⁺ peuvent exprimer PD-L1, le TGF- β et le GrB pour contrôler les réponses des LT CD4⁺ (Hasan et al., 2019). Par ailleurs, cette même étude a décrit une suppression des LT CD4⁺ plus efficace par les B CD24^{fort} CD27⁺ que par les LB Tr CD24^{fort} CD38^{fort}.

Récemment, une autre sous-population de Bmem CD27⁺ CD45RB⁺ a été identifiée par spectrométrie de masse comme l'une des deux populations de LBreg produisant le plus d'IL-10 après une stimulation *in vitro* (Glass et al., 2022).

2.4.4. Les PB et PC régulateurs

La fonction régulatrice des PB et PC a d'abord été révélée dans un modèle murin d'infection par *Salmonella typhimurium* (Neves et al., 2010). En effet, les auteurs ont pu observer une expansion des PC producteurs d'IL-10 qui suppriment la production d'IFN γ et de TNF α par les T CD4⁺. Les PC et PB régulateurs ont été décrits dans les modèles murins de la sclérose en plaque (Matsumoto et al., 2014 ; Rojas et al., 2019), du cancer de la prostate (Shalapour et al., 2015) et cancer hépatique (Shalapour et al., 2017) et à nouveau chez les souris infectées par la *Salmonella* (Shen et al., 2014).

Chez la souris, les PB et PC sont décrits comme les producteurs majeurs d'IL-10 à l'état basal dans la moelle osseuse et la rate (Suzuki-Yamazaki et al., 2017). De par leur production d'IL-10, les PB régulateurs suppriment la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-12) par les DC, réduisant la prolifération des LTh1 pathogéniques chez les souris EAE (Matsumoto et al., 2014) et conduisant à la rémission des souris (Rojas et al., 2019).

En revanche, les PC régulateurs producteurs IL-10 peuvent aussi induire une régulation délétère de la réponse immune. En effet, dans un modèle murin de cancer de la prostate, le traitement par oxaliplatine (médicament anti-cancéreux à base de platine) provoque une augmentation de la différenciation en PC IgA⁺ sécréteurs d'IL-10 et porteurs de FasL et de PD-L1 (Shalapour et al., 2015), responsables de la suppression des LT CD8⁺

cytotoxiques et du maintien de la croissance tumorale. Par ailleurs, en absence de LB chez des souris ayant une délétion de la région variable de l'Ig, le traitement par oxaliplatine promeut l'expansion des LT CD8⁺ cytotoxiques producteurs de perforines, d'IFN γ et de TNF α , permettant une régression de la tumeur.

Chez l'homme, l'étude de Matsumoto a permis d'identifier des PB CD27^{int} CD38⁺ producteurs d'IL-10, issus de LB NA matures CD24^{faible} CD27⁻ CD38⁻ et de LB immatures CD24^{fort} CD27⁻ CD38^{faible} du sang périphérique stimulés par du CpG (agoniste du TLR9), de l'IL-2, de l'IL-6 et de l'IFN- α (Matsumoto et al., 2014). Dans cette étude, les PB IL-10⁺ sont impliqués dans la résolution de l'inflammation chez les patients MS traités par IFN- β . En parallèle, l'activité régulatrice des PC humains a été décrite par Shalpour et al., notamment dans le cancer (Shalpour et al., 2015 ; Shalpour et al., 2017).

Tableau 1 - Hétérogénéité des phénotypes et mécanismes immuno-suppresseurs des LBreg

Stade	Phénotype	Rôle	Mécanisme	Références
LB immatures transitionnels	CD19 ⁺ CD24 ^{fort} CD38 ^{fort}	Suppression de la différenciation LTh1	IL-10	Blair et al., 2010
		Suppriment la production d'IFN γ , de TNF α et d'IL-17 des LT		Khoder et al., 2014 ; Mavropoulos et al., 2017 ; Cherukuri et al., 2021 ; Nova-Lamperti et al., 2016
		Favorisent la différenciation des Treg		Flores-Borja et al., 2013
LB immatures transitionnels et MZB	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{fort}	Induisent la différenciation des iNKT en iNKT supresseurs et inhibent indirectement les LTh1 et LTh17	CD1d	Oleinika et al., 2018
		Inhibent directement la production d'IFN γ et d'IL-17 par les LT CD4 ⁺	IL-10	Yanaba et al., 2008 ; Yanaba et al., 2013 Zhang et al., 2012 ; Savaria et al., 2016
		Promeuvent la différenciation des LTreg FoxP3 et LTreg de type 1		Haberlein et al., 2017 ; Pennati et al., 2016
		Suppriment la prolifération et la production de TNF α par les monocytes		Iwata et al., 2011
LB mémoires	CD19 ⁺ CD24 ^{fort} CD27 ⁺	Inhibent la production d'IFN γ et d'IL-17 par les LT CD4 ⁺	TGF- β , IL-10, PD-L1, GrB	Mavropoulos et al., 2017 Hasan et al., 2019
PB/PC	CD138 ⁺	Suppriment la production d'IFN γ et IL-17 par les LT CD4 ⁺	IL-10	Neves et al., 2010
		Suppriment la production d'IL-6 et d'IL-12 par les DC		Matsumoto et al., 2014
	CD138 ⁺ IgA ⁺	Suppriment les LT CD8 ⁺ cytotoxiques anti-tumoraux	IL-10, IgA, PD-L1, FasL	Shalpour et al., 2015 ; Shalpour et al., 2017

2.5. Voies de signalisation impliquées dans l'induction des LBreg

De nombreuses études ont identifié les voies de signalisation impliquées dans la production d'IL-10 par des LB (**Figure 5**).

2.5.1. Les voies TLR

Diverses études décrivent une production d'IL-10 en réponse à une stimulation des voies TLR des LB (Iwata et al., 2011 ; Lighaam et al., 2018 ; Honke et al., 2022) mais parmi ces études, peu d'entre-elles s'intéressent aux seconds messagers impliqués dans cette production d'IL-10 par les LB.

Parmi ces études, certaines se sont intéressées à l'implication du second messenger «Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 » (Myd88) dans la production d'IL-10 par les LB. En réponse à une stimulation du TLR4 (LPS) ou du TLR2 (Pam3), l'expression de Myd88 est essentielle à la production d'IL-10 (Mishima et al., 2019). En son absence, les souris Myd88^{-/-} étaient incapables d'avoir une production d'IL-10 par les LB. En pathologie, l'expression de Myd88 dans les LB permet à la protection des souris contre une infection *Helicobacter felis* via leur production d'IL-10 (Sayi et al., 2011). De même, l'expression de Myd88 est nécessaire à la production d'IL-10 qui protège de l'ADN relargué en réponse aux irradiations (Hong et al., 2017). *A contrario*, chez la souris gestante exposé au LPS, les LB sont capables de produire de l'IL-10 en absence de Myd88 (Busse et al., 2021). Chez une souris gestante contrôle, en réponse à une exposition au LPS, le TLR4 des LB induit l'expression d'IL-10 et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α) via l'activation de Myd88, conduisant à la mort du fœtus *in utero*. En revanche, les LB des souris gestantes qui n'expriment pas Myd88 produisent de l'IL-10 mais pas de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'exposition au LPS et favorisent la survie du fœtus..

D'autres études se sont intéressées à l'implication des autres seconds messagers des voies TLR tels que l'« Extracellular signal-regulated kinase » (ERK) ou STAT3 dans la production d'IL-10 (Liu et al., 2014). En effet, en présence d'inhibiteurs spécifiques de STAT3 et ERK_{1/2}, les LB ont une production d'IL-10 fortement diminuée.

2.5.2. La voie CD40

Après l'interaction du CD40 avec son ligand (CD154 aussi appelé CD40L), il interagit avec les protéines adaptatrices TRAF qui activent à leur tour, les voies MAPK, PI3K, NF- κ B. Chez les souris EAE, l'absence d'expression de CD40 spécifiquement dans les LB empêche leur guérison spontanée (Fillatreau et al., 2002), indiquant que la guérison spontanée des souris EAE qui se met en place via une production d'IL-10 par les LB est dépendante de la fixation du CD40 à son ligand (CD40L). D'autres études ont confirmé que l'activation des LB par le CD40 conduisait à une fonction régulatrice de ces LB via la suppression de la prolifération des LT de façon dose-dépendante (Lemoine et al., 2011) et la suppression de la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺ (Bankó et al., 2017). Plusieurs études ont montré qu'une double stimulation TLR9-CD40 induit une production d'IL-10 par les LB plus importante que la stimulation du TLR9 seule, suggérant une potentialisation de la production d'IL-10 par le CD40 (Iwata et al., 2011 ; Lighaam et al., 2018, Bouaziz et al., 2014).

2.5.3. Les voies de signalisation des cytokines

Plusieurs études décrivent l'impact de l'addition de cytokines à la stimulation TLR9 sur la génération de LBreg (Bankó et al., 2017 ; Matsumoto et al., 2014).

2.5.3.1. L'interleukine 21

Chez la souris, les LBreg CD5⁺ CD1d^{fort} induits par l'IL-21 sont capables de supprimer la prolifération des T CD4⁺ *via* leur production d'IL-10 (Yoshizaki et al., 2012). Chez l'homme, en réponse à l'IL-21, les LBreg CD5⁺ CD1d^{fort} induisent la dégradation du TCR *via* le relargage de GrB (Lindner et al., 2013). L'addition d'IL-21 à une stimulation CD40 augmente la production d'IL-10 par les LB alors que son addition à une stimulation du TLR4 par le LPS augmente la production d'IL-35 par les LB (Yu et al., 2015).

Plusieurs études se sont attelées à identifier les seconds messagers par lesquels l'IL-21 induit la production d'IL-10 tels que STAT3. L'IL-21 augmente la phosphorylation de STAT3 lors de l'induction d'IL-10 par LB (Bankó et al., 2017 ; Jiang et al., 2021)..

2.5.3.2. L'interféron alpha

L'IFN α a un rôle controversé sur la production d'IL-10 par les LB. La stimulation des LB par de faibles concentrations d'IFN α induit la production d'IL-10 (Menon et al., 2016). En revanche, à de fortes concentrations, l'IFN α diminue la production d'IL-10 par les LB. Chez les patients atteints de SLE, la production d'IFN α par les pDC est fortement augmentée par rapport aux individus sains. Cette production altérée d'IFN α conduit à une production d'IL-10 altérée par les LB CD24^{fort} CD38^{fort}. Par conséquent, ces LB sont incapables de réguler la production d'IFN α par les pDC chez les patients atteints de SLE.

A de faibles concentrations, l'IFN α induit la production d'IL-10 par les LB *via* la phosphorylation de STAT3. Chez les patients SLE, les LB stimulés par l'IFN α présentent un défaut de phosphorylation de STAT3 associée à l'absence de production d'IL-10 (Menon et al., 2016). En fonction de la voie TLR activée, l'IFN α peut avoir un effet différent sur la production d'IL-10 dans les LB (Liu et al., 2014). En effet, lorsque les LB sont co-stimulés par le R848 (TLR7/8), l'IFN α augmente la phosphorylation des seconds messagers ERK_{1/2} et STAT3, et la production d'IL-10. En revanche, lorsque les B sont co-stimulés par le CpG, il n'a aucun impact sur la phosphorylation de STAT3 et ERK ou sur la production d'IL-10.

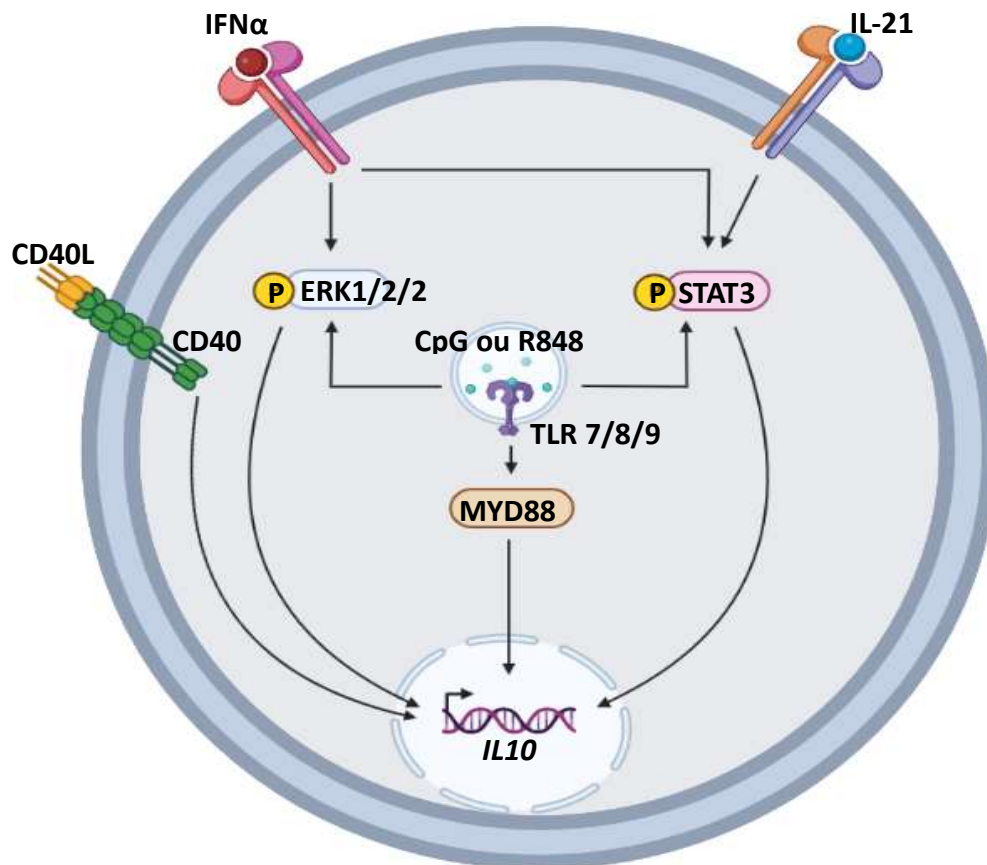


Figure 5 –Voies de signalisation impliquées dans la production d’IL-10 par les LB

2.6. Régulation moléculaire des LBreg

Il existe de nombreux phénotypes différents de LB ayant des capacités régulatrices et employant une grande variété des mécanismes d’actions. De ce fait, les obstacles à l’investigation des LBreg sont:

- L’absence de phénotype universel,
- Les différences existantes entre les humains et souris,
- Un certain nombre de mécanismes immunosuppresseurs qui peuvent aussi être co-exprimés.

Ces différents obstacles rendent difficile une identification des LBreg par la présence d’une molécule de surface ou par un mécanisme immunosuppresseur précis. Face à la complexité de caractérisation des LBreg de nouvelles études tentent d’identifier les mécanismes moléculaires qui pourraient contrôler l’acquisition de la fonction régulatrice des B. Dans ce cadre, nous avons décrit différents FT tels que STAT3, AHR, BLIMP-1

et IRF4, pour leur implication dans la production d'IL-10 par les LB. En parallèle, nous avons introduit par des résultats originaux, le FT MAF, décrit pour son rôle dans la production d'IL-10 par les T et macrophages. Son expression dans les LB producteurs d'IL-10 suggère qu'il pourrait avoir un rôle équivalent dans l'acquisition de ce mécanisme immuno-régulateur par les LB. L'implication de ces différents FT dans la production d'IL -10 par les LB font l'objet d'une revue générale présentée en Annexe 3.

3. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION MAF

3.1. La Famille des facteurs de transcription MAF

Le FT MAF fait partie d'une grande famille de FT à domaine de glissière à leucine (bZIP) à laquelle appartiennent certaines sous-familles telles qu'AP-1 et CREB. La région bZIP (*Figure 6*) est constituée de résidus basiques suivis de répétitions heptadiques de résidus hydrophobes formant la glissière à leucine (Ellenberger et al, 1992 ; Glover et Harrison, 1995).

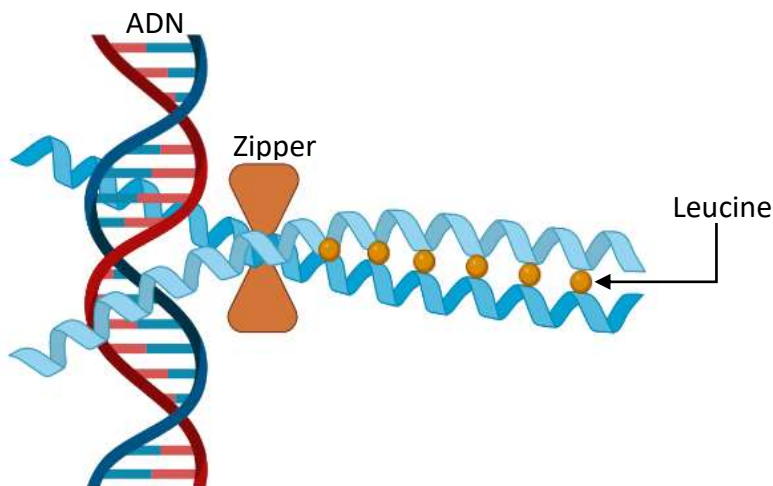


Figure 6 – Représentation de la glissière à leucine (bZIP)

La famille MAF est composée des TF MAF longs comprenant MAF-A, MAF-B, c-MAF (MAF), NRL et des MAF courts comprenant MAF-F, MAF-G et MAF-K (*Figure 7*). Les protéines MAF possèdent différents domaines hautement conservés tels que le

domaine de transactivation N-terminal (TAD) (uniquement chez les MAF longs), la région d'homologie étendue (EHR) située juste avant le domaine bZIP (Vinson et al, 2006). Le TAD est un domaine riche en proline, sérine et thréonine qui peut suffire à activer des promoteurs cibles (Friedman et al, 2004, 15328344). La région EHR permet aux protéines MAF de créer une zone de contact plus large avec l'ADN (Kusunoki et al., 2002) et de reconnaître une séquence palindromique Maf Recognition Element (MARE). La partie basique de la région bZIP permet la fixation à l'ADN via la formation de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes entre les acides aminés (AA) des chaînes latérales et les bases dans le grand sillon (Blank et Andrews, 1997). La partie « leucine zipper » forme une structure enroulée, consistant en deux hélices α parallèles qui fournissent une interface hydrophobe pour les interactions protéine-protéine. Cette interface permet la formation d'homo- ou d'hétérodimères avec d'autres membres de la famille MAF (Vinson et al., 2002) ou avec d'autres protéines bZIP compatibles (Kataoka et al., 1994 ; Kerppola et Curran, 1994).

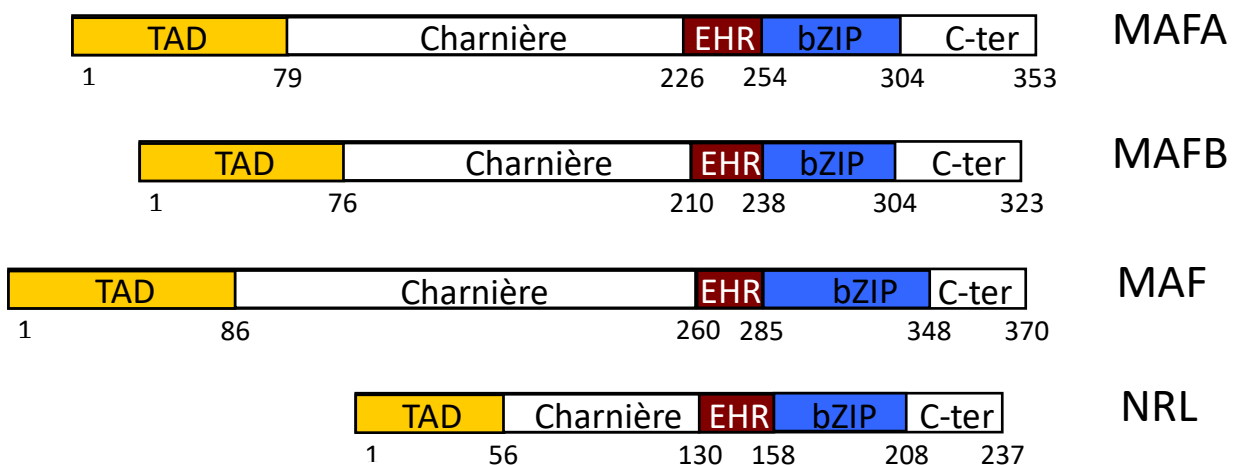


Figure 7 – Représentation schématique des protéines de la sous-famille des MAF longs et leurs domaines extrêmement conservés.

Les protéines MAF longues comprennent MAFA, MAFB, c-MAF (MAF) et NRL. La protéine c-MAF représentée est la protéine MAF courte murine. Les domaines extrêmement conservés sont le domaine de transactivation (TAD), la région d'homologie étendue (EHR) et le domaine de glissière à leucine (bZIP). Les domaines montrant de nombreuses différences (charnière et C-terminal) sont représentés en blanc.

3.2. Transcrits et protéines MAF décrites

Dans la littérature, seuls les variants et isoformes murines de MAF ont été mis en évidence expérimentalement. A ce jour, il existe très peu d'études qui décrivent les isoformes humaines de MAF et elles ne s'appuient que sur les informations disponibles dans les bases de données sans une mise en évidence expérimentale.

Chez la souris, le gène MAF est situé sur le chromosome 8. Le premier variant, MAF_202 (Ensembl!, ENSMUST00000109104) a été découvert en 1995 (Kurshner et Morgan, 1995). Ce variant contient un unique exon de 3 642 bases avec un cadre ouvert de lecture (ORF « Open reading Frame ») de 1 113 bases qui sont traduites en une protéine de 370 acides aminés (AA) appelée MAF courte murine d'une taille prédictive de 38,5 kDa (**Figure 8**). Dans l'étude de Kurshner et Morgan, cette protéine est décrite comme ayant 87 % d'homologie avec la protéine v-Maf du virus AS42. La séquence C-terminale présente une différence sur les 10 derniers AA, non présents dans la protéine MAF courte murine comparée la protéine codée par *v-Maf*.

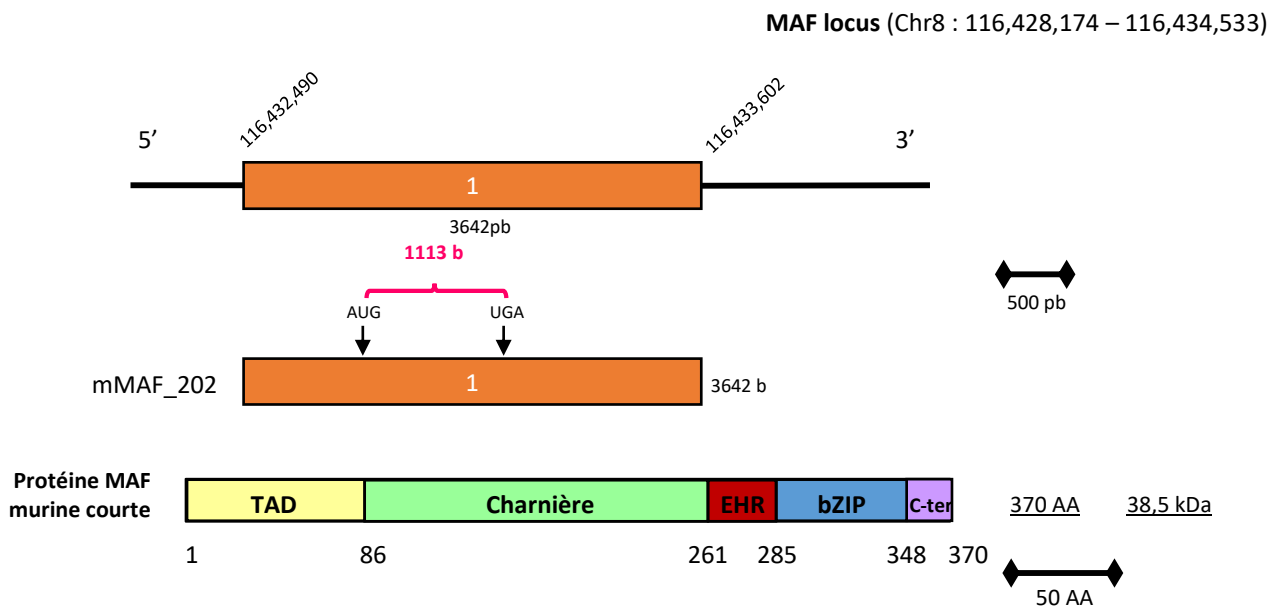


Figure 8 - Transcrit MAF_202 murin et protéine MAF murine courte

Le transcrit MAF_202 murin est appelé mMAF_202 dans cette étude. L'unique exon du variant mMAF_202 est représenté par un rectangle orange. Les séquences de 1 113 bases codant pour la protéine MAF murine courte sont indiquées par une accolade rose. La protéine MAF courte

murine est divisée en 5 domaines : le domaine de transactivation (TAD) en jaune, le domaine charnière en vert, le domaine d'homologie étendue (EHR) en rouge, le domaine de glissière à leucine (bZIP) en bleu et le domaine C-terminal en violet.

Un second transcrit, nommé MAF_201 (Ensembl!, ENSMUST00000069009) (**Figure 9**) a été découvert en 2002 au cours de l'identification des polypeptides interagissant avec le FT SOX9, impliqué dans la différenciation des chondrocytes et la formation du cartilage (Huang et al, 2002). La protéine issue du transcrit MAF_201 (appelé Lc-Maf dans cette étude) contient 10 AA supplémentaires à l'extrémité C-terminale que la protéine MAF courte et donc a une taille prédictive de 380 AA et 39,6 kDa. Par conséquent, cette protéine a été renommée MAF longue murine. La protéine MAF longue murine a montré une homologie plus importante avec la protéine codée par le FT *v-MAF* (Huang et al, 2002).

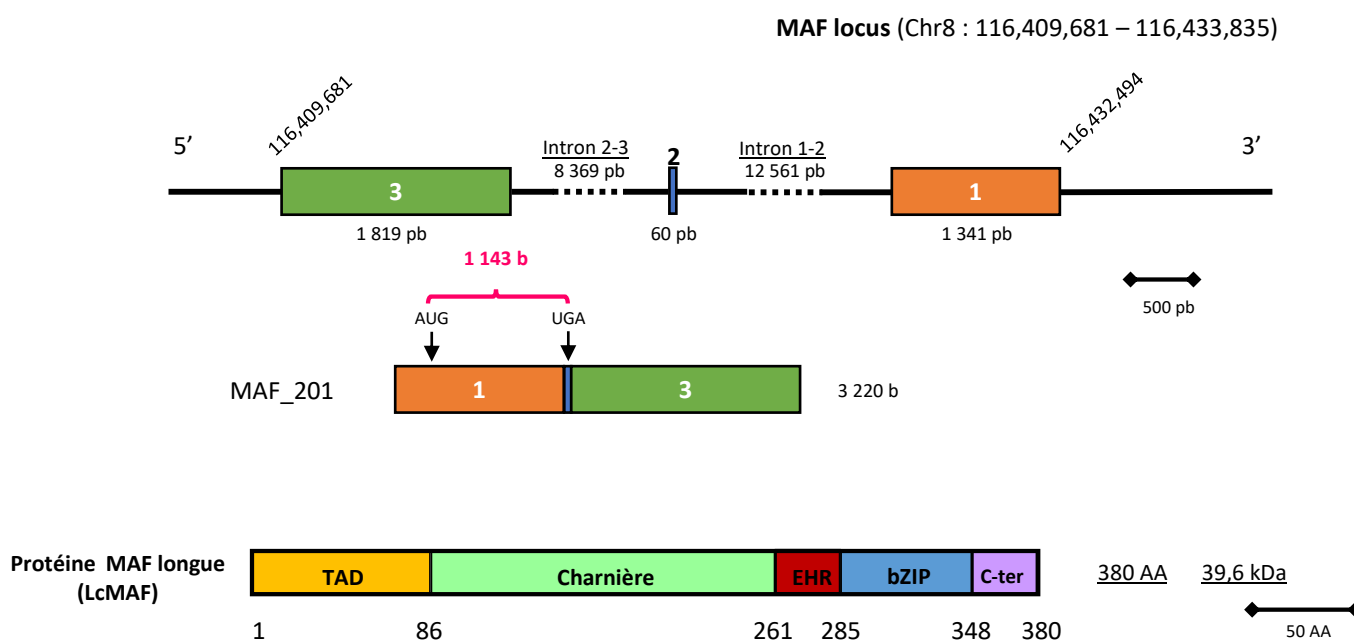


Figure 9 - Transcrit MAF_201 murin et protéine MAF murine longue

Les introns sont représentés par des lignes noires continues et en pointillés car leur taille est trop importante pour être représentés à l'échelle.

La différence de 10 AA entre les protéines MAF longue et courte suggère un mécanisme d'épissage différent entre les deux transcrits. En effet, le variant mMAF_203 est composé de 3 exons contrairement à l'isoforme mMAF_202 qui n'en contenait qu'un. Les exons 1, 2 et 3 mMAF_203 sont situés en amont de l'exon 1 de l'isoforme

mMAF_202. Après épissage des introns 1-2 et 2-3, la présence d'un codon stop précoce sur l'exon 2 résulte en une région codante de 1 143 bases. Cette région est ensuite traduite en une protéine de 39,6 kDa.

Chez l'homme, il n'existe aucune étude homologue à celles chez la souris mettant en évidence l'existence des isoformes de MAF. Parmi les études s'intéressant à l'expression de MAF chez l'homme, la majorité ne décrit pas les différentes isoformes de MAF. Ces isoformes sont uniquement décrites dans les bases de données. L'existence et l'analyse de différentes isoformes de MAF chez l'homme restent à être clarifiées.

3.2.1. Les modifications post-traductionnelles de MAF

Les TF sont des protéines régulatrices dont la fonction est d'activer ou d'inhiber la transcription de l'ADN en se liant à des séquences d'ADN spécifiques. Par conséquent, ils possèdent une activité qui est extrêmement régulée afin de maintenir une homéostasie. La régulation de leur activité peut se mettre en place *via* des mécanismes contrôlant leur synthèse mais également par des modifications post-traductionnelles (MPT) complexes. Chez l'homme, différentes études ont montré que l'activité du FT MAF est dépendante de la présence de certaines MPT telles que la phosphorylation, la sumoylation, l'ubiquitination, récapitulées en **Figure 10** issue de l'article présenté en Annexe 3.

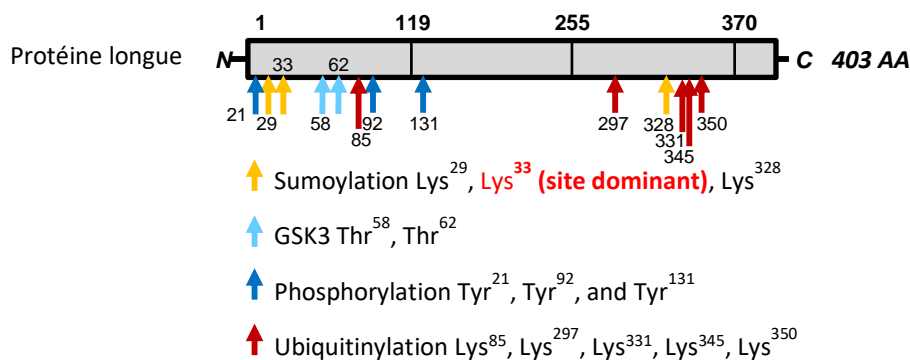


Figure 10 – Schéma récapitulatif des modifications post-traductionnelles des protéines c-MAF

Schéma modifié de Michée-Cospolite et al., 2022. Selon les descriptions issues de la base de données Uniprot (détaillées en Partie I), la protéine MAF longue humaine est utilisée comme matrice.

3.2.1.1. L'ubiquitination de MAF

L'ubiquitination correspond à la fixation d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine sur des résidus lysines accepteurs de la cible. Dans un premier temps, l'enzyme E1 « ubiquitin-activating » se lie à la protéine d'ubiquitine, l'active et la transfère à l'enzyme E2 « ubiquitin-conjugating », puis à l'enzyme E3 « ubiquitin-ligase ». L'enzyme E3 fixe la protéine d'ubiquitine activée sur sa cible et la protéine ubiquitylée est adressée au protéasome. La liaison entre l'ubiquitine et la protéine cible peut être inversée par une dé-ubiquitinase (DUb) (Passmore et Barford, 2004).

Le myélome multiple (MM) est une classe d'hémopathies malignes dérivées de plasmocytes sécréteurs d'Ac. Certaines formes de MM sont associées à une translocation du promoteur de l'IgH en t(14 ;16) ou en t(4;14). Lors de la translocation t(14 ;16), les régions promotrices de l'*IGH* sont dissociées du chromosome 14 et juxtaposées en amont du gène *MAF* sur le chromosome 16, induisant la transcription de MAF sous le contrôle des séquences régulatrices de l'*IGH* et donc sa surexpression dans les lignées de MM t(14 ;16) comparées aux lignées t(4 ;14) (Hurt et al., 2004 ; Qiang et al., 2016). Chez ces patients t(14 ;16), l'altération de la dégradation de MAF par la voie ubiquitine-protéasome peut avoir de lourdes conséquences sur leur traitement. Chez les patients MM t(4 ;14), le pronostic est amélioré après le traitement par un inhibiteur de la voie ubiquitine-protéasome (bortezomib) alors que ce traitement semble inefficace sur les patients t(14 ;16) (Qiang et al., 2016).

Dans le cas de MAF (**Figure 11**), son ubiquitination est catalysée par l'enzyme E3 ligase HERC4 au niveau des lysines K85 et K297 (Zhang et al., 2016) et par l'enzyme E2 ubiquitin-conjugating UBE2O qui participe à l'ubiquitination des résidus lysines K331 et K345 (Xu et al., 2017) et favorise sa dégradation par le protéasome. L'ubiquitination de MAF est inversée par l'enzyme DUb USP5 qui clive les protéines d'ubiquitine sur les résidus K308 et K347 (Wang et al., 2017). La DUb USP5 est capable de réduire l'ubiquitination de MAF médiée par l'E3 ligase HERC4. De façon intéressante, la

surexpression de MAF dans les lignées de MM est associée à une surexpression d'USP5.. Son inhibition par un ARN interférant induit une diminution de l'expression de MAF et l'apoptose des lignées de MM (RPMI 8226 et LP-1).

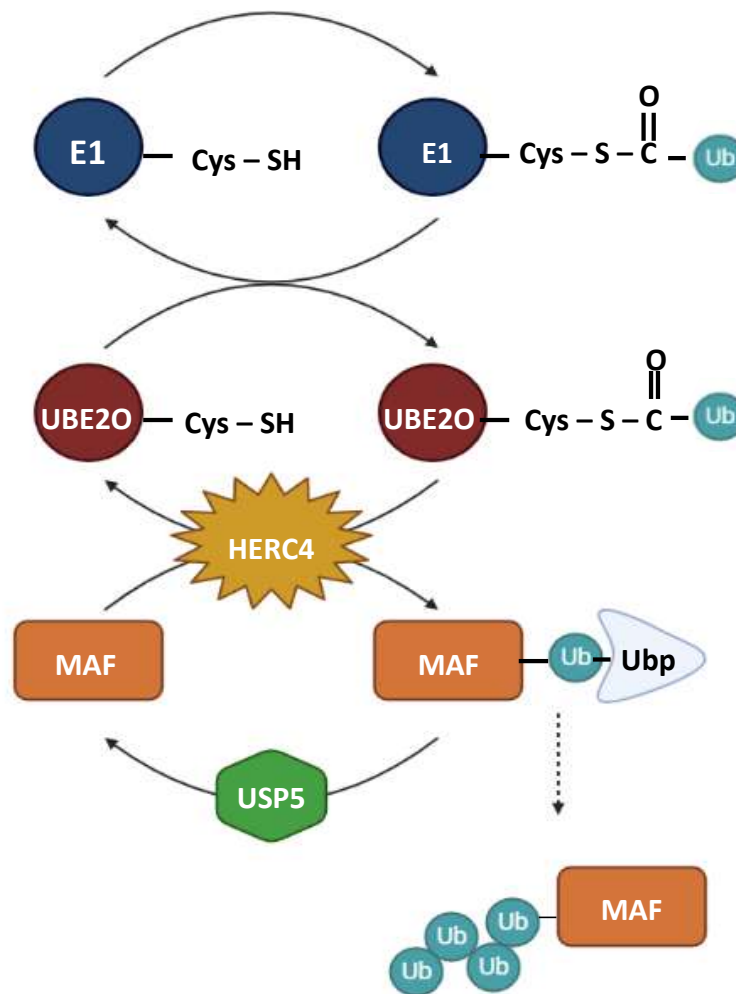


Figure 11 – Ubiquitination de MAF

3.2.1.2. La phosphorylation de MAF

Plusieurs études ont documenté le rôle de la phosphorylation de MAF en partie N-terminale pour son recrutement sur les promoteurs de ces cibles. Dans les LTh2 et LTh17, la phosphorylation des résidus Y21, Y92 et Y131 de MAF par la tyrosine kinase TEC est essentielle à sa fixation sur les sites MARE du promoteur de l'IL-4 et du

promoteur de l'IL-21 (Lai et al., 2012 ; Liu et al., 2015). La p38 MAPK phosphoryle MAF au niveau des résidus T58 et S109 et est indispensable pour leur liaison à l'ADN (Sii Felice et al., 2005). La sérine thréonine kinase GSK-3 phosphoryle MAF au niveau des résidus S54, S66, T58 et T62 (Rocques et al., 2007).

La phosphorylation de MAF peut avoir un rôle bénéfique ou délétère dans la physiopathologie de certaines maladies. Dans les lignées de MM, la phosphorylation de MAF par GSK-3 joue un rôle bénéfique en augmentant sa dégradation par la voie ubiquitine-protéasome, associée à une diminution de la prolifération des lignées de MM (Herath et al., 2014). Chez des patients atteints du syndrome Aymé-Gripp, les résidus ciblés par GSK-3 sont mutés. Un défaut de leur phosphorylation par GSK-3 conduit à une accumulation de MAF dans les fibroblastes cutanés, associé au développement du syndrome neurologique congénital caractéristique de cette pathologie (Niceta et al., 2015).

En revanche, la phosphorylation de MAF par la kinase CDK5 dans un modèle murin d'endotoxémie accentue la physiopathologie de cette maladie (Pfänder et al., 2021). En effet, la phosphorylation de MAF par la kinase CDK5 conduit à une diminution de sa stabilité et de la production d'IL-10 par les macrophages. En l'absence d'expression de CDK5 spécifiquement dans les macrophages, l'augmentation de l'expression de MAF et de la production d'IL-10 sont associés à une résolution de l'inflammation.

3.2.1.3. La SUMOylation de MAF

En plus de la phosphorylation et l'ubiquitination, la fixation d'une protéine « small ubiquitin-like modifier » (SUMO) peut influencer l'activité d'un FT. Les protéines SUMO sont semblables à l'ubiquitine, utilisant des systèmes de transport assez similaires pour modifier leurs cibles (Celen et Sahin, 2020). L'enzyme SUMO-E1 active la protéine SUMO et la transfère à l'enzyme SUMO-E2 ligase, EBC9. La protéine SUMO activée est ensuite transférée d'UBC9 aux protéines cibles par une SUMO-E3 ligase telles que celles de la famille PIASs. La SUMOylation peut être inversée par une « SUMO-deconjugating isopeptidase » de la famille des « sentrin/SUMO-specific proteases » (SENP/SUSP).

La protéine MAF est sumoylée par les enzymes SUMO-E2 ligase EBC9 et E3-ligase PIAS1 qui génèrent une protéine MAF sumoylée de 70 kDa (**Figure 12**, Lin et al., 2010, 20127678). Ces SUMO-ligases interagissent avec la lysine K33 présente dans le TAD de MAF situé en position N-terminale, ce qui induit une diminution de la transcription de l'IL-4 (Leavenworth et al., 2009 ; 19553542 ; Lin et al., 2010). La SUMOylation de la lysine K33 conduit à une diminution de sa fixation sur les promoteurs de l'*IL4* (Lin et al., 2010) et de l'*IL21* (Hsu et al., 2018). L'activité des SUMO-ligases peut être inversée par la « SUMO-deconjugating isopeptidase » SENP1 qui « dé-SUMOyle » MAF et restaure son activation de la transcription de l'IL-4 médiée par MAF.

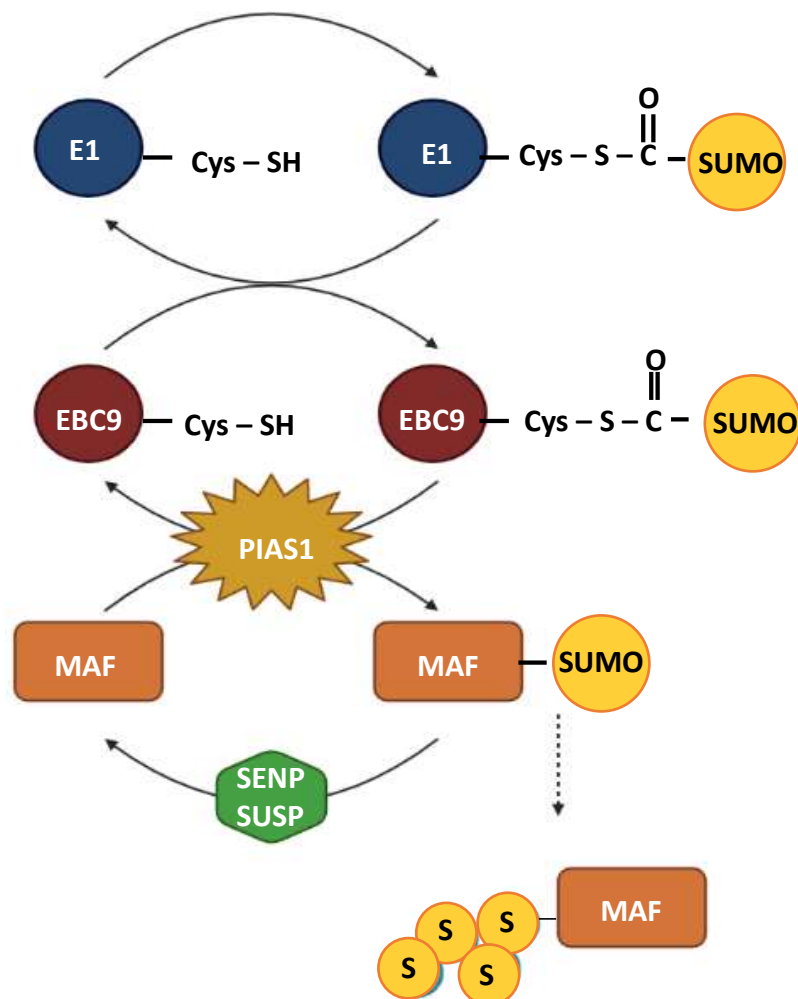


Figure 12 – Sumoylation de MAF

3.3. Rôle de MAF dans l'immunité

3.3.1. Régulation de la polarisation et la différenciation des cellules immunitaires

3.3.1.1. Régulation de la différenciation des LT

3.3.1.1.1. Rôle de MAF dans la différenciation LTh2

Les études pionnières de MAF dans l'immunité le décrivent comme un FT avec un rôle promoteur de la différenciation LTh2. Ainsi, Ho a mis en évidence une expression de MAF dans les lignées de LTh2 (D10, CDC35) mais pas dans les lignées de LTh1 (AR5, OF6 et D1) (Ho et al., 1996). MAF est capable de se fixer au promoteur de l'*IL4*, responsable de l'induction de la réponse LTh2. Parmi les cytokines spécifiques des LTh2 (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13), seule la transcription de l'IL-4 semble contrôlée par MAF (Kim et al., 1999). Par la suite, MAF est décrit comme un régulateur de la balance LTh1/LTh2. Même si son expression ectopique dans les LTh1 ne leur confère pas la capacité de produire de l'IL-4, cela diminue leur production d'IFN γ (Ho et al., 1998).. En pathologie, l'absence d'expression de MAF dans les T CD4⁺ est associée à une diminution des gènes LTh2 dont l'*IL4* et l'*IL5* (Gabrysova et al., 2018) et à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ (Mitchell et al., 2017). De façon intéressante, des LTh1 par l'IL-4 stimulés sont capables d'exprimer MAF et de produire de l'IL-10. Ce qui a pour conséquence de diminuer leur production d'IFN γ et d'autres cytokines spécifiques des LTh1. Ces études indiquent une boucle autocrine entre MAF et l'IL-4. L'IL-4 est capable d'induire l'expression de MAF et MAF induit à son tour, le maintien d'IL-4 mais aussi sa propre expression de façon indirecte. MAF induit également la production d'IL-10 et inhibe celle d'IFN γ .

3.3.1.1.2. Rôle de MAF dans la différenciation des LTfh

Les LTfh expriment fortement MAF. En son absence, les T CD4⁺ sont incapables de se différencier en LTfh *in vitro* (Andris et al., 2017) et d'exprimer les marqueurs qui les

caractérisent tels que *BCL6*, *CXCR5*, *PD-1*. *BCL6* est impliqué dans l'interaction LT/LB et *CXCR5* dans le trafic au sein des GC. Par ailleurs, MAF promeut l'expression de cytokines produites par les LTfh en se fixant directement sur les promoteurs de l'*IL4* (Lai et al., 2012 ; Liu et al., 2015) et de l'*IL21* (Hiramatsu et al., 2010 ; Liu et al., 2015).

3.3.1.1.3. Implication de MAF dans la différenciation des LTh17

Le FT MAF peut indirectement favoriser la différenciation en LTh17 en réprimant l'expression d'IL-2 par les LT CD4⁺ (Gabrysova et al., 2018). Son absence induit une augmentation de l'expression d'IL-2 et une diminution de la différenciation en LTh17. En parallèle, MAF est capable de réguler positivement la production d'IL-10 et de CTLA4 de cytokines par les LTh17 en se fixant sur leurs promoteurs respectifs (Ciofani et al., 2012). En revanche, il inhibe des gènes codant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α de leur récepteur IL1R. MAF est responsable de l'induction d'IL-21 (Bauquet et al., 2009 ; Sato et al., 2011) mais aussi celle d'IL-10, nécessaire pour limiter les réponses pro-inflammatoires chez la souris (Xu et al., 2009).

Les LTh17 peuvent produire d'autres cytokines ayant des propriétés pro-inflammatoires telles que l'IL-22 et l'IL-17A. Chez la souris, MAF se fixe au promoteur de l'IL-22 et empêche sa transactivation par d'autres FT associés aux LTh17 tels que ROR γ t et BATF (Rutz et al., 2011). Chez l'homme, l'absence d'expression de MAF dans les LT CD4⁺ lors de la différenciation des LTh17 supprime leur production des gènes associés aux LTh17 tels que l'*IL17A* (Tanaka et al., 2014, Gabrysova et al., 2018) et *RORC* (Gabrysova et al., 2018). MAF régule négativement la production d'IL-22 en se fixant directement sur son promoteur. Il régule indirectement la production d'IL-17A via la production d'IL-21.

3.3.1.1.4. Régulation de la différenciation des LTreg par MAF

Plusieurs sous-populations de Treg existent et se caractérisent par leur expression de certains FT. Les LTr1 n'expriment pas le FT « Forkhead box 3 » (FOXP3). Il existe trois sous-populations parmi les LTregs exprimant FOXP3: LTreg ROR γ t⁺, LTreg folliculaires BCL6⁺ (Tfr) et LTreg PPAR γ (localisés dans les adipocytes).

Dans les LTr1, MAF a été décrit pour sa co-fixation avec AHR sur les promoteurs de l'*IL21* et l'*IL10* chez la souris (Apetoh et al., 2010). MAF promeut la production d'IL-21 qui agit de façon autocrine pour induire l'expansion et la maintenance des LTr1 (Pot et al., 2009).

Le rôle de MAF est également documenté dans les autres sous-populations de LTreg tels que les LTreg ROR γ ⁺ qui constituent les producteurs majeurs d'IL-10 dans l'intestin. MAF est fortement exprimé dans les LTreg ROR γ ⁺ (Hussein et al., 2020). En l'absence d'expression de MAF, la différenciation de ces cellules est fortement diminuée (Hussein et al., 2020) ainsi que leur production d'IL-10. Ceci est responsable de l'accumulation de LTh17 producteurs de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-1 β), du développement de coliques spontanées (Xu et al., 2018 ; Imbratta et al., 2019) ou de dysbiose microbienne chez la souris (Neumann et al., 2019). MAF est donc essentiel pour la génération des LTreg ROR γ ⁺ et le contrôle de la réponse LTh17 inflammatoire.

Lors d'une délétion de MAF dans les LTreg FOXP3⁺ murins, 534 gènes sont différentiellement exprimés. Parmi ces gènes, l'expression d'*Il10* et de gènes associés à des phénotypes de LTreg incluant *Rorc* (LTreg ROR γ ⁺), *Bcl6* et *Cxcr5* (Tfr) sont diminués (Wheaton et al., 2017). En revanche, les gènes associés aux LTreg PPAR γ ⁺ (*Baft*, *Irf4*) ne sont pas modifiés en l'absence de MAF. Par ailleurs, alors que l'absence d'expression de MAF dans les LTreg conduit à une diminution de la proportion de LTreg ROR γ ⁺ et de leur production d'IL-10, cela n'a aucun impact sur la proportion des LTreg PPAR γ ⁺ et leur production d'IL-10

3.3.1.1.5. Rôle de MAF dans la différenciation des LT $\gamma\delta$

L'importance de MAF a été décrite dans les T gamma delta (T $\gamma\delta$). Les LT $\gamma\delta$ apparaissent en premier au cours du développement chez tous les animaux vertébrés. Leur différenciation se déroule en deux étapes. A la première étape, un signal faible du TCR induit une différenciation des progéniteurs lymphoïdes en LT $\gamma\delta$ et un signal fort, en LT $\alpha\beta$ (Fahl et al., 2014). A la seconde étape, un signal intermédiaire du TCR induit une différenciation des LT $\gamma\delta$ en producteurs d'IFN- γ et d'IL-4 alors qu'un signal faible

favorise des cellules productrices d'IL-17 (Zarin et al., 2015). Au niveau fonctionnel, les LT $\gamma\delta$ mettent en place une réponse immune rapide similaire à la réponse immunitaire innée, via la production de molécules cytotoxiques (perforines et granzymes) et de cytokines effectrices (IL-17, IFN- γ et IL-4).

Le FT MAF intervient dans la différenciation des LT $\gamma\delta$. En effet, l'absence de son expression dans les progéniteurs lymphoïdes bloque complètement la différenciation en LT $\gamma\delta$ IL-17⁺ et certains FT clés de cette sous-population, ROR γ T (codé par *Rorc*) et SOX13 sont sous-exprimés (Sagar et al., 2020 ; **Figure 13**).

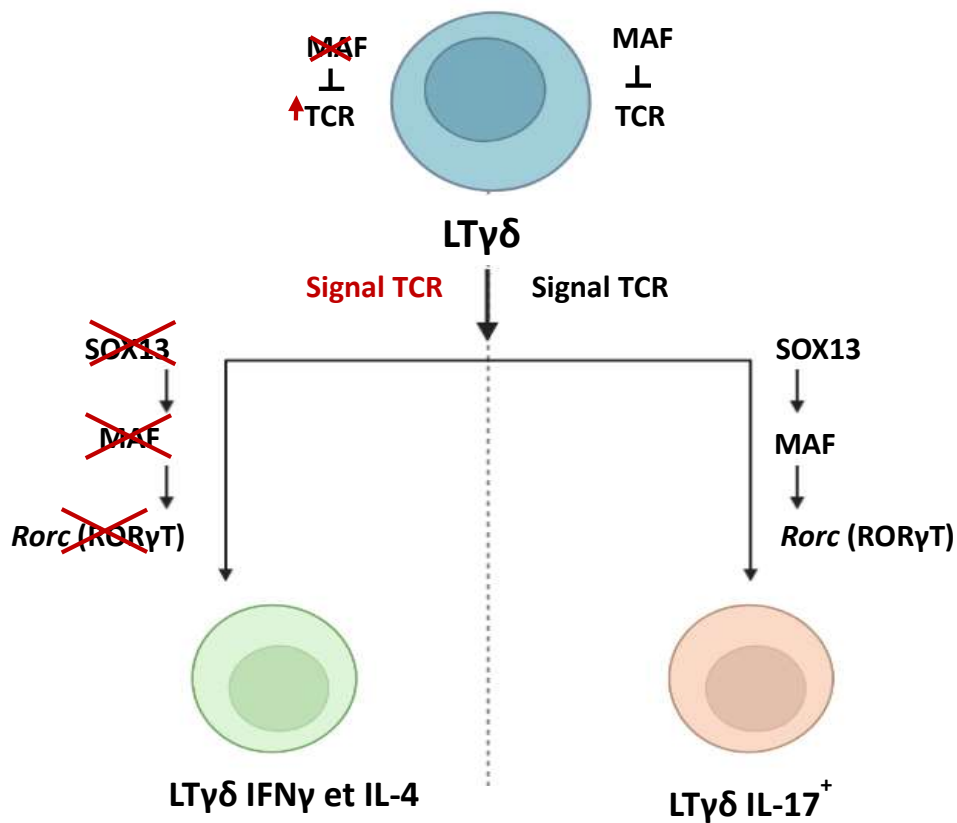


Figure 13 – Implication de MAF dans la différenciation en LT $\gamma\delta$ IL-17⁺

3.3.1.2. Régulation de la plasticité des cellules lymphoïdes innées (ILC)

Les ILC sont des cellules immunes qui contribuent à l'immunité tissulaire et qui ne présentent pas spécificité antigénique. Les progéniteurs des ILC peuvent se différencier en trois classes d'ILC :

- Les ILC1, caractérisés par leur expression du FT T-BET (*TBX21*) et de l'IFN γ ,

- Les ILC2 exprimant le FT GATA3,
- Les ILC3 qui expriment le FT ROR γ T.

MAF est fortement exprimé par les ILC3 comparativement aux ILC1 et ILC2 (Gury-BenAri et al., 2016, 27545347). Son expression est particulièrement importante dans les ILC3 qui expriment le récepteur naturel de cytotoxicité NKp46, ce qui n'est pas le cas de ceux exprimant le récepteur de chimiokine 6 (CCR6). Les ILC3 NKp46⁺ possèdent une identité moléculaire unique qui constitue un équilibre entre ILC1 et ILC3, *via* l'expression simultanée des FT clés de deux classes d'ILC : T-BET et ROR γ T. Dans certains microenvironnements cytokiniques, les ILC3 NKp46⁺ peuvent inhiber l'expression de ROR γ T et se convertir en ILC1, appelés « ex-ILC3 », exprimant T-BET et l'IFN γ (Vonarbourg et al., 2010 ; Artis et Spits, 2015).

MAF est décrit comme un régulateur de la balance entre ILC1 et ILC3. Il promeut l'expression des gènes communément associés aux différentes sous-populations d'ILC3 tels que ROR γ t ou l'*IL22* (Pokrovskii et al., 2019). En revanche, il limite la conversion des ILC3 en ILC1 (ex-ILC3) en se fixant directement sur le promoteur de *TBX21* et inhibe l'expression de T-BET (Parker et al., 2020) (**Figure 14**).

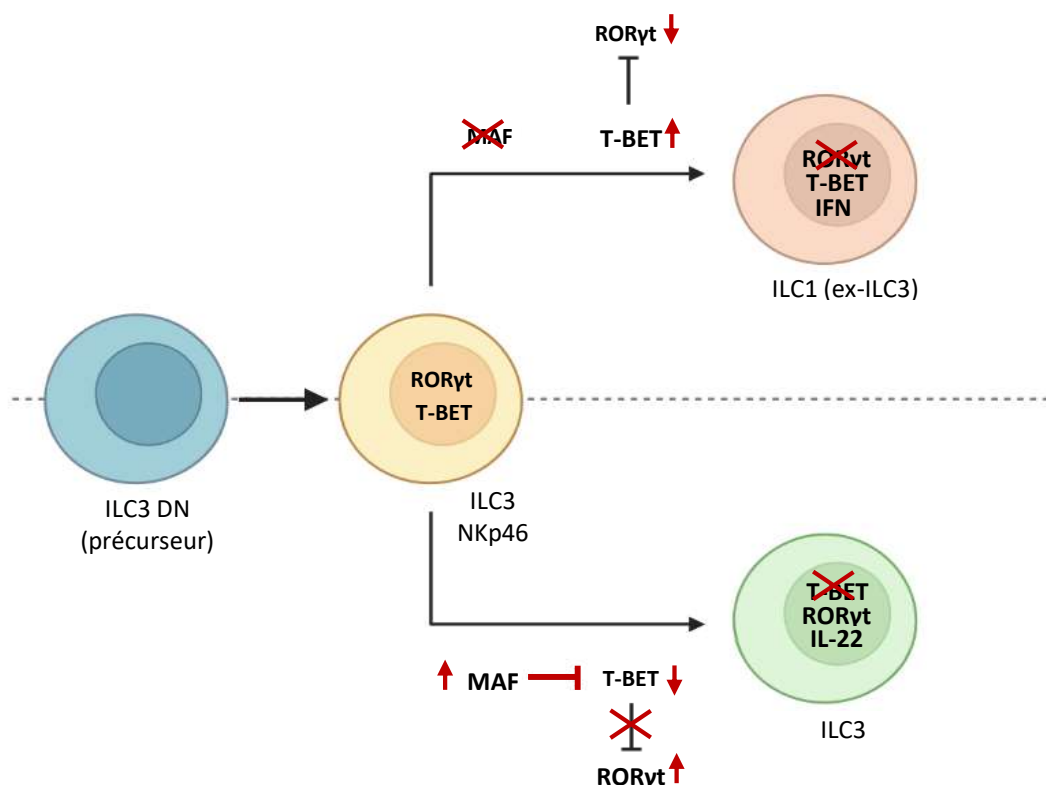


Figure 14 – Régulation de la plasticité entre ILC1 et ILC3 par MAF

3.3.1.3. Régulation de la polarisation des macrophages

En 2004, une classification M1/M2 des macrophages a été proposée selon celle des LT CD4⁺ (Mantovani et al., 2004). Les macrophages de type 1 (M1) conduisent des réponses pro-inflammatoires *via* la production de cytokines telles que l'IL-6, l'IL-12 et le TNF α . En revanche, les macrophages de type 2 (M2) conduisent des réponses anti-inflammatoires et réparent les tissus endommagés *via* la production d'arginase 1 (Arg1), d'IL-10 et de TGF- β (Biswas et al., 2010).

Dans les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM), l'expression de MAF est associée au type M2 (Liu et al., 2020). En absence d'expression de MAF (par siRNA MAF ou inhibiteur spécifique), l'expression d'*Il10* et d'*Arg1* est diminuée et celle d'*Il12* est augmentée. En parallèle, une expression ectopique de MAF dans des BMDM M1 induit leur expression d'*Il10* et d'*Arg1* ainsi que la diminution d'*Il12*, suggérant que MAF régule positivement l'acquisition du phénotype M2.

Dans le micro-environnement tumoral, les macrophages de type M2 appelés « TAMs » (TAMs pour tumor-associated macrophages) sont décrits pour agir favorablement sur la survie tumorale (Mills et al., 2016). En utilisant un modèle murin de développement tumoral (injection de cellules tumorales), l'expression de MAF a été associée à cette fonction (Liu et al., 2020). En l'absence de MAF, les gènes associés au type M2 sont réprimés, au profit des gènes associés au type M1. L'absence d'expression de MAF permet une augmentation des T CD8⁺ cytotoxiques, des LT CD4⁺ producteurs d'IFN γ (LTh1) et une réduction de la croissance tumorale.

A la fin d'une inflammation aiguë, survient une phase pendant laquelle le processus d'inflammation doit faire place au processus de réparation tissulaire. Les macrophages tissulaires (macrophages CD169⁺) jouent un rôle important dans cette conversion en changeant leur phénotype durant les différentes phases de l'inflammation (Wynn et Vanella, 2016). Durant la phase aiguë de l'inflammation, les macrophages tissulaires du colon CCL8⁺ CD169⁺ expriment fortement MAF et faiblement les gènes protecteurs des

tissus *Sipi* et *Slc7a11* (Kikuchi et al., 2020). Après la phase aigüe, ils diminuent leur expression de MAF et augmentent celle de *Sipi* et *Slc7a11* afin de mettre en place la réparation tissulaire. En plus de son implication dans la plasticité M1/M2, le FT MAF peut réguler la réponse inflammatoire des macrophages tissulaires du côlon sans les polariser vers un type M1 ou M2 mais en convertissant leur phénotype entre la phase d'inflammation aigüe et la phase réparatrice.

3.3.2. Régulation de la production d'IL-10 par MAF

3.3.2.1. MAF et production d'IL-10 par les LTreg

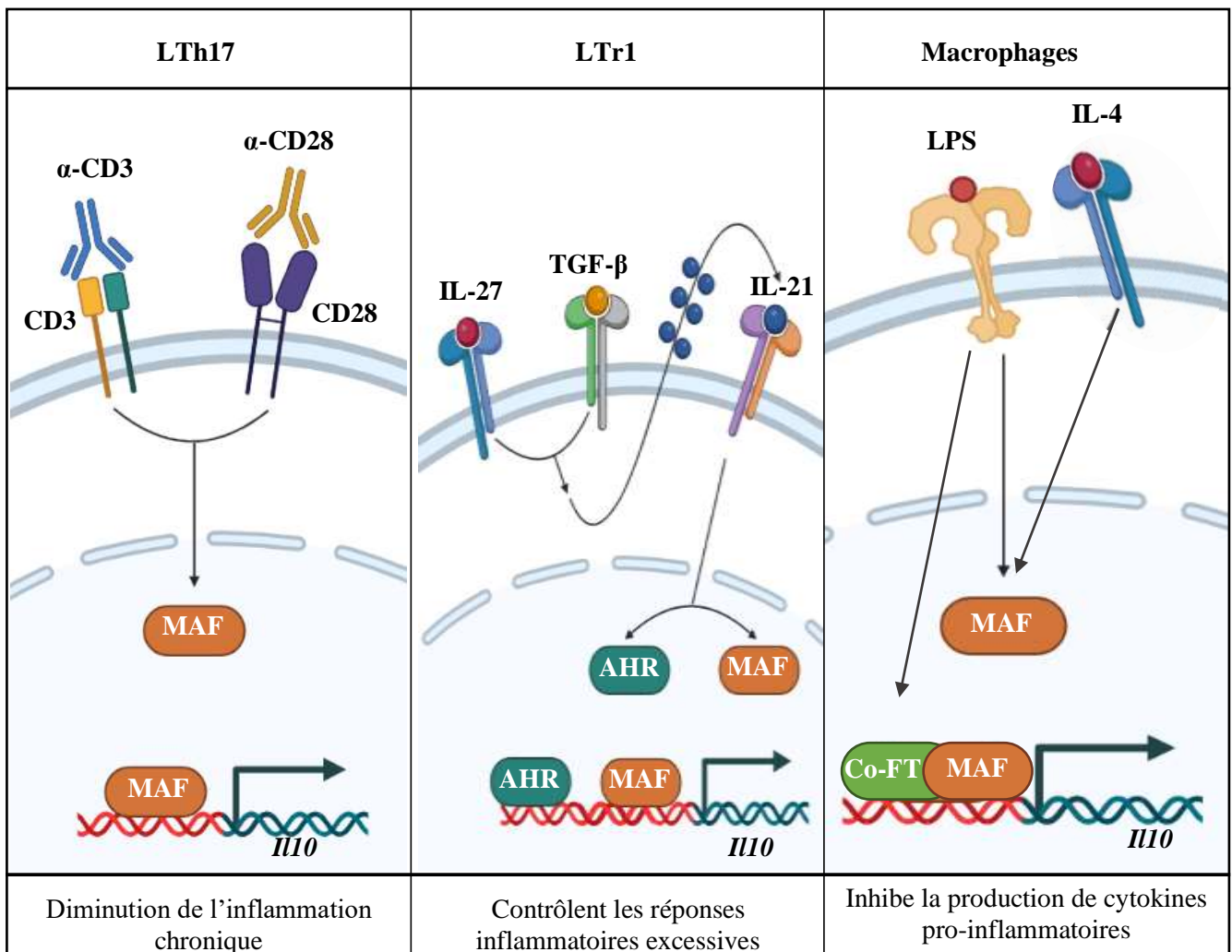
La production d'IL-10, associée à MAF dans plusieurs population de LTreg dont les LTr1 a été documentée (Apetoh et al., 2010). Des LT CD4⁺ naïfs stimulés par l'IL-27 et le TGF- β (décrits pour leur promotion des LTr1) se différencient en LTr1. Un suivi de l'expression de MAF, d'AHR et d'IL-10 montre une augmentation. La transfection d'ARN interférants (siRNA) dirigés contre le transcrite *Maf* bloque la production d'IL-10, indiquant un rôle prépondérant de MAF dans la production d'IL-10 par les LTr1. Dans un modèle murin, la surexpression sélective de MAF dans les LT CD4⁺ conduit spontanément à la production d'IL-10, qui est augmentée en réponse à l'IL-27 et au TGF- β . En plus d'être capable de se fixer aux promoteurs de l'*Il10* mais aussi de l'*Il21*, MAF peut être induit de façon autocrine par l'IL-21 dans les LTr1.

3.3.2.2. MAF et production d'IL-10 par les LTh17

Dans les LTh17 humains, MAF favorise la production d'IL-10 *via* sa fixation sur le promoteur de l'*Il10* (Ciofani et al., 2012). En réponse à une stimulation par l'anti-CD3 et l'anti-CD28, une partie des LTh17 sont capables de produire de l'IL-10 (LTh17 IL-10⁺), contrairement aux autres (LTh17 IL-10⁻) et peut être liée à la présence de MAF (Aschenbrenner et al., 2018). En effet, l'absence de MAF conduit à une réduction de l'expression d'IL-10 et des gènes associés aux LTh17 IL-10⁺ au profit de ceux associés aux LTh17 IL-10⁻ (*IFNG* et *IL22*).

3.3.2.3. MAF induit la production d'IL-10 par les macrophages

Dans les macrophages, MAF favorise la production d'IL-10. En effet, sa sur-expression inhibe la production d'IL-12 et induit celle d'IL-10 (Cao et al., 2002). Cette étude a également mis en exergue que MAF et l'IL-10 induisent mutuellement leur expression dans les macrophages pro-inflammatoires. L'absence d'expression de MAF dans les macrophages stimulés par le LPS conduit à une forte réduction de la production d'IL-10 comparés à ceux exprimant MAF, mais pas à une réduction totale indiquant la présence d'autres mécanismes de production d'IL-10 (Cao et al., 2005). En rétablissant l'expression de MAF *via* un adénovecteur, les macrophages stimulés sont à nouveau capables de produire de l'IL-10. En réponse à une stimulation par le LPS, MAF peut se



fixer sur le promoteur de l'*il10* dans les macrophages.

Figure 15 – Rôle de MAF dans la production d'IL-10 par les LT et macrophages

3.3.3. Rôle de MAF dans les LB

En 2018, une première étude (Liu et al., 2018) s'est intéressée à l'expression de MAF dans les LB murins et son rôle dans le modèle de l'arthrite. Ains, les auteurs ont mis en évidence sa faible expression constitutive dans les LB murins. En réponse à une stimulation des LB par le LPS, l'expression du FT MAF augmente et se fixe au promoteur de l'*Il10*. La diminution de l'expression de MAF par shRNA (ARN en épingle) réduit la production d'IL-10 par les LB stimulés.

Malgré ces résultats très prometteurs, il s'est avéré que l'outil utilisé pour la détection de MAF n'était pas adapté et correspondait à un Ac monoclonal dirigé contre MAFA (*Cell Signaling Technology, 79737*). Cela a pour conséquence d'invalider plusieurs résultats de l'étude. Malgré une forte homologie entre les protéines de cette famille, l'Ac utilisé reconnaît des résidus autour de l'alanine en position 345 de MAFA qui ne sont pas communs à MAF. Seule l'étude des transcrits MAF par RT-qPCR peut être conservée. En revanche, il est impossible de savoir si l'expression de la protéine MAF est impactée par la présence du shRNA et si l'impact observé sur l'IL-10 est dû à MAF. De même, l'utilisation de cet Ac invalide les résultats d'immunoprécipitation de la chromatine, impliquant que la relation entre MAF et l'IL-10 dans les LB reste à être déterminée.

Aucune autre étude n'a confirmé à ce jour ce rôle de MAF dans les LB murins ou humains. Néanmoins, une autre étude (Radomir et al., 2021) portant sur le rôle d'un récepteur auto-ligand appartenant à la famille de « signaling lymphocytic activating molecules » (SLAMF5 encore appelé CD84) dans le développement de l'EAE chez la souris, s'est intéressée à l'expression de MAF dans les LBreg IL-10⁺ murins et humains. En l'absence de l'expression de SLAMF5, le développement de l'EAE se fait plus tardivement et les symptômes sont atténués. Ces observations sont liées une augmentation des LBreg IL-10⁺, de leurs fonctions immunosuppressives vis-à-vis des LTh1 et LTh17 et de leur survie *via* l'expression de *Bcl2* et *Bcl-xl* (impliqués dans la survie du LB). En l'absence d'expression de SLAMF5, 277 gènes sont

différentiellement exprimés comparés aux LB normaux, dont le FT MAF qui est surexprimé. Ces observations sont confirmées par l'utilisation d'Ac ou inhibiteurs dirigés contre SLAMF5, qui conduit à une augmentation de son expression spécifiquement dans les LBreg IL-10⁺.

Chez l'homme, les LBreg IL-10⁺ présentent une expression de SLAMF5 plus importante que les B non-régulateurs non producteurs d'IL-10. De façon similaire à ce qui a été observé chez la souris, le blocage de l'expression de SLAMF5 dans les LB conduit à une augmentation de la survie des LBreg et de leur expression de MAF.

Cette étude (Radomir et al., 2021), publiée au cours de ma thèse, est la première à avoir montré une expression de MAF dans les LBreg IL-10⁺ humains issus du sang périphérique. Bien que MAF soit décrit comme un régulateur important de la production d'IL-10 dans plusieurs types de cellules immunitaires (T, macrophages, ILC), son rôle dans les LB reste encore méconnu, à ce jour.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Les fonctions distinctes des LB effecteurs (LBe) ont été décrites chez la souris après une co-culture avec des LTh1 producteurs de l'IFN γ ou avec des LTh2 producteurs d'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et de l'IL-10. En fonction des LT auxiliaires (LTh), une polarisation différentielle des LB est obtenue et on peut identifier des LB effecteurs nommés LB effecteurs de type 1 (LBe1) ou LB effecteurs de type 2 (LBe2) en fonction des cytokines qu'ils produisent (Harris et al., 2000). Une polarisation équivalente a été également décrite chez l'Homme où des LB naïfs ont été co-cultivés avec des LTh1 producteurs ou directement stimulés par de l'IFN γ , des Ac anti-BCR et des agonistes des TLR7/8 (Zumaquero et al., 2019).

Afin de mieux définir les fonctions effectrices distinctes des LB, les Dr Quentin Simon et Dr Alexis Grasseau (Simon et al., 2021) ont adapté le modèle décrit par Harris et al. à un système de co-culture autologue utilisant des lymphocytes humains issus du sang périphérique. Pour cela, des LB ont été mis en culture en présence CpG, de LT naïfs (CD4⁺ CD45RA⁺, T_{RA}) ou de LT mémoires (CD4⁺ CD45RO⁺, T_{RO}) activés par des anti-CD3 et anti-CD28. Les LB en co-culture avec les LT_{RA} favorisent leur prolifération alors que c'est un phénomène inverse qui est observé avec les LT_{RO}. Par ailleurs, dans la co-culture LB-LT_{RA}, la production de cytokines telles que CXCL10, CXCL1, IL-6 par les LT_{RA} a pu être mesurée. Les LB présentaient également une augmentation de l'expression de *CXCL10*. En revanche, lors de la co-culture LB-LT_{RO}, les LT_{RO} présentaient un profil associé aux LTh2 et LTreg (IL-10, IL-17A, IL-22) et les LB produisaient de l'IL-10. L'analyse de la composition en sous-classes de LB dans les LBe2/LBreg ne contiennent montre des différences bien établies. En effet, les LBe1 sont composés de B SM, DN et de PB commutés alors que les LBe2/LBreg sont composés de LB IgM⁺ et de PB non commutés producteurs d'IL-10.

En se basant sur ces analyses, les LB co-cultivés avec les LT_{RA} ont été renommés en LBe1 et ceux co-cultivés avec les LT_{RO} LBe2/LBreg.

Enfin, une analyse comparative du transcriptome des LBe1 et LBe2/LBreg a mis en évidence 225 gènes différentiellement exprimés entre les LBe1 et LBe2/LBreg, dont 161 qui sont surexprimés et 64, diminués dans les LBe2/LBreg par rapport aux LBe1

(Michée-Cospolite et al., 2022). Parmi les gènes associés à l'immuno-régulation, le *CTLA4*, les gènes du granzyme (*GZMB*, *GZMH*) et l'*IL10* sont surexprimés dans les LBe2/LBreg comparés aux LBe1, confirmant ainsi leur fonction régulatrice. Parmi les FT différentiellement exprimés, le FT *MAF* est surexprimé dans les LBe2/LBreg comparés aux LBe1. En outre, une analyse intégrative comparant les cibles de MAF identifiées par ChIP couplé à du séquençage (ChIP-seq) dans les LTh17 (Ciofani et al., 2012) et les 225 gènes différentiellement exprimés entre les LBe1 et Be2/LBreg a révélé que parmi eux, 46 correspondaient à des cibles de MAF. L'ensemble de ces résultats suggèrent que c-MAF pourrait être un potentiel candidat permettant l'identification moléculaire universelle de la fonction régulatrice des LB.

En s'intéressant à son expression dans les LB issus du sang périphérique, mon prédécesseur, le Dr Alexis Grasseau a mis en évidence :

- la faible expression de MAF à l'état basal,
- qu'une simple activation du BCR ou du TLR9 permettait une induction faible de MAF dans les LB,
- que l'activation concomitante des voies BCR et TLR9 en présence d'IL-2 permet d'induire une forte expression de MAF.

De plus, des résultats préliminaires ont suggéré un enrichissement de l'expression du FT BLIMP1 dans les LB exprimant MAF fortement et qui est associé à l'expression de l'IL-10.

Les objectifs de ma thèse avaient pour but de répondre aux questions suivantes :

- 1. MAF est-il exprimé dans les LB issus de sources différentes (organe lymphoïde secondaire ou sang périphérique) ?**
- 2. Son expression est-elle liée à la différenciation des LB?**
- 3. L'expression de MAF est-elle associée à la production d'IL-10 dans les LB ?**

Afin de répondre à ces objectifs, ce manuscrit se décline en trois parties :

1- Une meilleure définition des isoformes humaines de MAF et une validation des outils pour sa détection

A ce jour, aucune étude n'a permis une description complète des variants et isoformes de MAF. La première étape de ce travail a été une analyse *in silico* de MAF afin de mieux définir les multiples variants issus de mécanismes d'épissages et les isoformes issues de modifications post-traductionnelles. Le nombre de combinaisons possibles entre les différents épissages et les différentes modifications post-traductionnelles, ainsi que l'existence potentielle d'isoformes prédictives rendent sa détection et l'analyse de son expression complexe. La seconde étape a été de mener une sélection et validation des différents outils de détection de MAF avant de réaliser une étude de son expression dans les LB.

2- Une étude de l'expression de MAF dans les LB

Dans un premier temps, nous avons exploré l'expression de MAF dans les LB issus de deux compartiments différents : le sang périphérique et un organe lymphoïde secondaire, l'amygdale, où les LB sont activés *in vivo* par l'Ag et les voies TLR.

Les travaux antérieurs ont montré que son expression est corrélée avec celle de BLIMP1 (marqueur de différenciation terminale des LB) en réponse à une stimulation *in vitro* par du CpG, des anti-BCR en présence d'IL-2. Ensuite, nous nous sommes interrogés sur l'expression de MAF au cours de la différenciation terminale des B dans un organe lymphoïde secondaire et des LB dans le sang. Puis, nous avons confirmé nos observations *ex vivo*, en utilisant un modèle de différenciation des LB *in vitro* par la stimulation préalablement décrite.

3- Une étude corrélative de l'expression conjointe de MAF et d'IL-10 dans les LB

Parmi tous les mécanismes d'action documentés dans les cellules, nous avons tenté d'établir une corrélation entre la production d'IL-10 et l'expression de MAF dans les LB.

MATERIEL ET METHODES

1. ANALYSES *IN SILICO* DE MAF

1.1. Base de données utilisées pour la description des variants et isoformes de MAF

Les informations concernant les variants MAF ont été obtenus dans la base de données Ensembl avec le numéro d'identification ENST00000326043.5 pour MAF_201, ENST00000393350.1 pour MAF_202 et ENST00000569649.1 pour MAF_203.

Les informations concernant les protéines MAF ont été obtenues dans la base de données Uniprot avec le numéro d'identification O75444-1 pour l'isoforme MAF longue, O75444-2 pour l'isoforme MAF courte et H3BP11 pour l'isoforme MAF medium.

1.2. Prédiction de la structure tertiaire de MAF

La structure tertiaire de MAF a été prédite avec l'outil AlphaFold Protein Structure Database version 2022-06-01 (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). AlphaFold calcule un score de confiance par résidu compris entre 0 et 100. Un score inférieur à 50 correspond à une prédiction non fiable et un score à partir de 70 correspond à une prédiction fiable.

1.3. Alignement des protéines

Les différents alignements globaux des isoformes de MAF ont été réalisés avec Snapgene 5.3.1 selon la méthode de Needleman-Wunsch. La méthode de Needleman-Wunsch décrite en 1970 (Needleman et Wunsch, 1970) est la méthode couramment utilisée pour effectuer un alignement global maximal de deux séquences.

1.4. Prédiction des modifications post-traductionnelles

1.4.1. Prédiction des sites de phosphorylation

Les sites de phosphorylation de MAF ont été prédits avec l'outil NetPhos version 3.1 (Blom et al., 1999) avec ou sans prédiction spécifique des kinases impliquées (Blom et al., 2004). Cet outil calcule un score de confiance entre 0 et 1, le 0 correspondant à une prédiction peu fiable et 1 à une prédiction d'une grande fiabilité. Les sites retenus présentent tous un score de confiance supérieur à 0,5.

1.4.2. Prédiction des sites d'ubiquitination

Les sites d'ubiquitination de MAF ont été prédits en utilisant l'outil GPS-Uber version du 2021-11-07 (Wang et al., 2022). Les sites retenus avaient tous un score de confiance supérieur à 0,8.

1.4.3. Prédiction des sites de SUMOylation

Les sites de SUMOylation de MAF ont été prédits par l'outils GPS-SUMO version du 2022-09-01 (Zhao et al ., 2014, 24880689). Les sites retenus avaient tous un score de confiance supérieur à 0,8.

1.4.4. Prédiction des sites de glycosylation

Les sites de N-glycosylation et O-glycosylation ont été prédits en utilisant respectivement les outils NetNGly version 1.0 (Gupta et Brunak, 2002, 11928486) et NetOGly version 4.0 (Steentoft et al., 2013, 23584533). Les sites présentés ont tous montré un score de confiance supérieur à 0,5.

2. CULTURE CELLULAIRE

2.1. Lignées lymphocytaires RAJI, RAMOS et RPMI 8226

Les cellules RAJI et RAMOS sont des lignées dérivées de LB provenant de lymphome de Burkitt humain. Les cellules RPMI 8226 sont des plasmocytes provenant d'un myélome multiple humain. Chaque lignée cellulaire a été cultivée en milieu RPMI 1640 (*Eurobio*) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (*Eurobio*) préalablement décomplémenté (à 56°C) et 2 mM de Glutamax (*Gibco*). Les lignées ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ en flasque Falcon® 750 mL (*Dutscher*) durant 72h.

2.2. Lignée épithéliale HSG

Les cellules HSG (Human Submandibular Gland) étaient à l'origine issues d'une glande sous-maxillaire humaine. Elles sont actuellement considérées comme dérivées de la lignée cellulaire HeLa. Les cellules HSG ont été cultivées, en milieu DMEM (*Dutscher*) supplémenté avec 10 % de SVF préalablement décomplémenté (à 56°C), à une concentration de 10⁵ cellules/mL, à 37°C avec 5% de CO₂ en plaque 24 puits Falcon® (353936, *Dutscher*) durant 24h à 36h, jusqu'à obtention d'une confluence à 70%.

2.3. Purification et culture des LB primaires

2.3.1. Purification des lymphocytes LB périphériques

Les LB ont été isolés à partir de résidus de cytophérèse délivrés par l'Etablissement Français du Sang (EFS). Après récupération du sang dans le résidu, les cellules ont été séparées par centrifugation à 750 g durant 30 min à température ambiante (TA) selon un gradient de densité et en utilisant un tampon de séparation lymphocytaire (Pancoll, *PAN-Biotech*) afin d'obtenir les cellules mononucléées du sang périphérique (« Peripheral Blood Mononuclear Cells », PBMC). A partir des PBMC, les LB ont été purifiés en utilisant le kit REAlease® CD19 MicroBead, human (*Miltenyi Biotec*) selon le protocole du fabricant. La pureté des LB a été vérifiée par cytométrie en flux par un marquage avec le panel d'Ac (*Beckman Coulter*) décrit en **Tableau 2**.

Tableau 2 – Panel de validation de la pureté des LB

Anticorps	Clones
CD19	J3-119
CD3	UCHT1
CD56	N901
CD14	RM052
CD61	SZ21

Toutes les expériences ont été réalisées avec des LB ayant une pureté $\geq 95\%$.

2.3.2. Purification des lymphocytes LB d'amygdales

Les amygdales ont été collectées à partir d'amygdalectomie. Les cellules mononucléées de l'amygdale (TMC) ont été purifiées par centrifugation à 750 g durant 30 min à TA, *via* un gradient de densité en utilisant un tampon de séparation lymphocytaire (Pancoll). Les TMC purifiés ont été dilués dans du SVF à une concentration de $10 \cdot 10^6$ TMC/mL. 10 mL de globules rouges de mouton (Defibrinated Sheep Blood SR0051B, *Thermo Scientific*) conservés à 4°C ont été préalablement pré-incubés dans une solution d'Alserver (114 mM de dextrose, 27 mM de citrate de sodium, 71 mM de chlorure de sodium, 1 M d'acide citrate) à TA durant 5 min et rincés deux fois dans du PBS par centrifugation à 750 g durant 10 min à TA. Le culot de globules rouges de mouton après centrifugation est re-suspendu dans la neuraminidase (*Sigma Aldrich*) à une concentration de 1 U/mL à 37°C durant 1h. Les globules rouges traités à la neuraminidase ont été lavés quatre fois dans du PBS par centrifugation à 750 g durant 10 min, dilués dans 50 mL de milieu RPMI 1640 complet, puis incubés avec les TMC dilués (à volume égal de préparation de globules rouges et de TMC) durant 10 min à 37°C. Les LB ont ensuite été isolés des LT liés aux globules rouges par gradient de densité (Pancoll). La pureté des LB a été vérifiée par cytométrie en flux par un marquage CD19 (J3-119, *Beckman Coulter*) et CD5 (BL1a, *Beckman Coulter*). Toutes les analyses ont été réalisées avec des LB ayant une pureté $\geq 95\%$.

2.3.3. Modèle de Différenciation des LB

Les LB du sang périphériques purifiés ont été mis en culture en plaque 96 puits (*Dutscher*) à raison de $2 \cdot 10^5$ B dans 200 μL /puits dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF décomplémenté, 2 mM de Glutamax, 200 U/mL de pénicilline (*Panpharma*) et 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine (*Sigma*). Les LB sont stimulés durant 3,5 jours en présence de CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (0,25 μM , *Invivogen*), d'interleukine-2 humaine recombinante (rh-IL-2) (20 ng/mL, *ImmunoTools*), d'anti-IgM/IgG (2 $\mu\text{g/mL}$, *Jackson ImmunoResearch*), d'anti-IgA (2 $\mu\text{g/mL}$, *Jackson ImmunoResearch*). A ce cocktail de base, a été ajouté de l'interleukine-21 (40 ng/mL, *ImmunoTools*) ou de l'interféron alpha (10 ng/mL, *ImmunoTools*).

2.3.4. Modèle B10

Les LB du sang périphérique purifiés ont été mis en culture en plaque 96 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ B dans 200 μL /puits dans du milieu RPMI supplémenté comme dans le modèle de différenciation. Les LB ont été stimulés durant 2 jours en présence de CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (1 μM), d'interleukine-2 humaine recombinante (rh-IL-2) (20 ng/mL,) ou d'anti-CD40 (1 mg/mL) (MAB-59, *Beckman Coulter*).

3. BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.1. Plasmide

Nous avons contacté l'équipe du Dr Xiliang Mao travaillant sur MAF dans le myélome multiple afin d'obtenir un plasmide contenant MAF (pMAF-HA) (Wang et al., 2017 ; Xu et al., 2017) .

3.1.1. PCR et gel d'électrophorèse

Des amorces ciblant les deux transcrits (MAF_ALL) et des amorces spécifiques du transcrit MAF_202 et du transcrit MAF_201 (tableau) ont été utilisés pour la PCR (*Tableau 3*).

Gène	Sens	Séquence
MAF_ALL	Sens	CTGGCAATGAGCAACTCCGA
MAF_ALL	Anti-sens	GATGAGACGGCCGCACTG
MAF_201	Sens	AGCAGCGACAACCCGTC
MAF_201	Anti-sens	GTCAGGGGTAGGTGGTTCTC
MAF_202	Sens	AGCAGCGACAACCCGTC
MAF_202	Anti-sens	TAGAACTAGCAAGCCCACACC

Tableau 3 – Amorces utilisées pour la détection des transcrits MAF

La PCR a été réalisé à partir de 50 ng de plasmide pMAF-HA avec la 10X DreamTaq Green Buffer (*Thermo Scientific*) en utilisant le thermocycleur GeneAmp PCR system 9700, selon le programme décrit en *Tableau 4*.

Tableau 4 – Description du programme de PCR

Nombre de cycles	Température	Durée
1	95° C	10 min
5	95° C	30 secondes
	61° C	30 secondes
	72° C	30 secondes
35	95° C	30 secondes
	56° C	30 secondes
	72° C	30 secondes
1	72° C	5 min

Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 2 % contenant du GelRed à 1X (*Interchim*), agent incalcent de l'ADN. Puis, ils ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse (Power PAC 3000, *BioRad*) durant 50 min à 150 V. Les gels ont été révélés en utilisant le système ChemiDoc™ XRS (logiciel Quantity One®, *Biorad*).

3.1.2. Transfection

Les cellules HSG ont été cultivées en plaques 12 puits (*Dutscher*) jusqu'à l'obtention d'une confluence à 70%. Les cellules ont ensuite été remises en incubation à une concentration de $2,2 \cdot 10^5$ cellules/mL dans le milieu DMEM supplémenté durant une nuit. Le lendemain, 500 ng de plasmide vide pcDNA 3.1 Zeo (*Thermo Fisher Scientific*) ou de plasmide pMAF202-HA décrit dans l'article de Wang et al., 2017 et fourni par le Dr Xiliang Mao (Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, China) a été transfectés dans les HSG en utilisant la Lipofectamine 3000 (*Thermo Fisher Scientific*) préalablement préparée dans un milieu OPTIMEM (*Thermo Fisher Scientific*) sans sérum selon le protocole du fabricant. Les HSG transfectées ont été à nouveau incubées à 37°C avec 5% de CO₂ durant 48h. Les HSG transfectées ont été récupérées par traitement à la trypsine-EDTA (*Pan Biotek*), puis lavées par centrifugation à 300 g durant 10 min avec du Hank's balanced salt solution (HBSS) (*Dutscher*).

3.1.3. Séquençage

Le séquençage a été réalisé par la société Eurofins Genomics, à partir de 500 ng de plasmide pMAF-HA en utilisant l'amorce sens MAF_ALL ou l'amorce anti-sens MAF_ALL, une amorce spécifique du promoteur T7 fréquemment associé au promoteur cytomégalo virus (CMV) dans les vecteurs pcDNA 3.1. et une amorce spécifique de la séquence de polyadénylation (bGH) qui permet que l'ARNm généré possède une queue poly(A) et soit fonctionnel (*Tableau 5*). Les résultats du séquençage ont été analysés par avec Snapgene version 5.3.1.

Tableau 5 –Description des amorces utilisées pour le séquençage de pMAF-HA

Amorces	Séquence	Cible
T7 spécifique	TAATACGACTCACTATAGGG	Promoteur T7 fréquemment associé au promoteur CMV du pcDNA 3.1
MAF_ALL Sens	CTGGCAATGAGCAACTCCGA	Exon 1 – NT 825 à 844
MAF_ALL Anti-sens	GATGAGACGGCCGCACTG	Exon 1 – NT 945 à 966
bGH poly(A)	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Séquence de terminaison poly(A) des ARNm importante pour leur traduction en protéines

3.1.4. Digestion enzymatique

1 µg de plasmide pMAF-HA a été digéré durant 15 min à 37° C avec les enzymes de restriction EcoRI (Anza™11, *Thermo Fisher Scientific*) et/ou XbaI (Anza™12, *Thermo Fisher Scientific*) selon le protocole du kit Anza™ Buffer Set. Le plasmide non digéré, et les produit des digestions simples (EcoRI ou XbaI) ou double (EcoRI + XbaI) ont été ensuite déposés sur gel d'agarose 2% contenant de de GelRed à 1X, puis séparés en fonction de leur taille par électrophorèse (Power PAC 3000, *Bio-Rad*) durant 90 min à 150 volts. Les gels ont été révélés en utilisant le système ChemiDoc™ XRS (logiciel Quantity One®, *Biorad*).

3.2. Extraction des ARN et Dosage

Les ARNs ont été purifiés en utilisant le kit RNeasy® Plus Micro (*Qiagen*) selon le protocole du fabricant. Les ARN purifiés ont été dosés au Nanodrop 2000c à l'aide du logiciel Nanodrop 2000 Software version 1.6.198, puis 100 à 400 ng d'ARN ont été rétro-transcrits en utilisant la SuperScrip IV Reverse Transcriptase (*Life Technologies*) des random primers à 2,5 µM (*Promega*) selon le protocole du fabricant à l'aide du Thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (*Applied Biosystems*).

3.3. PCR quantitative (qPCR)

Les dosages d'expression par PCR quantitative de MAF (MAF_201 et MAF_202) ou du contrôle endogène (GAPDH) sont réalisés à partir de sondes *Taqman* spécifiques des gènes d'intérêt (**Tableau 6**) marquées par le « reporter » FAM et le « quencher » MGB, du TaqMan™ Gene Expression Master Mix et à l'aide du QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR utilisant le logiciel QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Software version 1.3.

Tableau 6 – Sondes Taqman™ utilisées pour la quantification de MAF et de l'endogène

Gène	Référence	Position
GAPDH	Hs02758991	
MAF_ALL	Hs04185012	950
MAF_201	Hs00193519	1948
MAF_202	Hs02576418	6193

L'expression des transcrits, donnée en expression relative, a été normalisée par rapport l'expression de la GAPDH (ΔC_t) et analysée selon la formule : $2^{-\Delta C_t} \times 10^5$ pour les lignées RAMOS et RPMI 8226, pour les B primaires à l'état basal issus du sang et de l'amygdale et pour les B stimulés *in vitro* selon les 3 conditions du modèle de différenciation et selon le modèle B10.

4. EXPRESSION PROTEIQUE

4.1. Cytométrie

4.1.1. Discrimination phénotypique des LB en fonction de leur stade de différenciation

A cause des multiples bifurcations au cours de la différenciation des LB, différentes stratégies ont été développées afin de discriminer les LB selon leur stade différenciation. Il est possible de séparer les LB en fonction des différents marqueurs de surface qu'ils expriment différemment au cours de la différenciation tels que le CD19, CD38, le CD27,

l'IgD et la production d'IgM. Les phénotypes des différentes sous-populations de LB sont récapitulés dans le *Tableau 7*.

Tableau 7 – Tableau récapitulatif des phénotypes des LB au cours de leur différenciation

	CD19	CD27	CD38	IgD	IgM	Localisation
LB NA	+	-	Int	Fort	+	Sang et OLS
LB DN	+	-	-	-	+/-	Sang et OLS
LB USM	+	+	int	+	fort	Sang et OLS (MZ et follicule)
LB SM	+	+	faible	-	-	Sang et OLS
PB _{NC}	faible	fort	fort	faible	fort	Sang et OLS
PB _C	faible	fort	fort	-	-	Sang, OLS et MO
PC _{NC}	faible	fort	fort	faible	fort	Sang et OLS
PC _C	faible	fort	fort	-	-	Sang, OLS et MO

LB NA : B mature naïf ; **LB DN** : B mémoire double-négatif ; **LB USM** : B mémoire non commuté ; **LB SM** : B mémoire commuté ; **PB** : plasmablaste ; **PC** : plasmocyte ; **NC** : non commuté ; **C** : commuté ;

En cytométrie en flux, les sous-populations de LB peuvent être discriminées selon ces différents marqueurs dans les OLS et dans le sang périphérique en utilisant les marqueurs suivants : CD3, CD19, CD27, CD38, IgD et IgM.

Dans l'amygdale, les sous-populations de LB sont discriminées en plusieurs étapes (*Figure 16*). Dans un premier temps (①), les LB sont discriminés des LT grâce à leur expression du CD19 antagoniste à celle du CD3 (marqueur des LT). Ensuite (②), les LB CG, les PB et les LB non-PB non-CG sont séparés selon leur expression de CD38 et d'IgD. Par la suite (③), les différents LB mémoires sont séparés selon leur expression de CD27 et d'IgD. En parallèle (④), il est possible d'identifier les PB ayant commutés et ceux n'ayant pas commutés selon leur expression d'IgM.

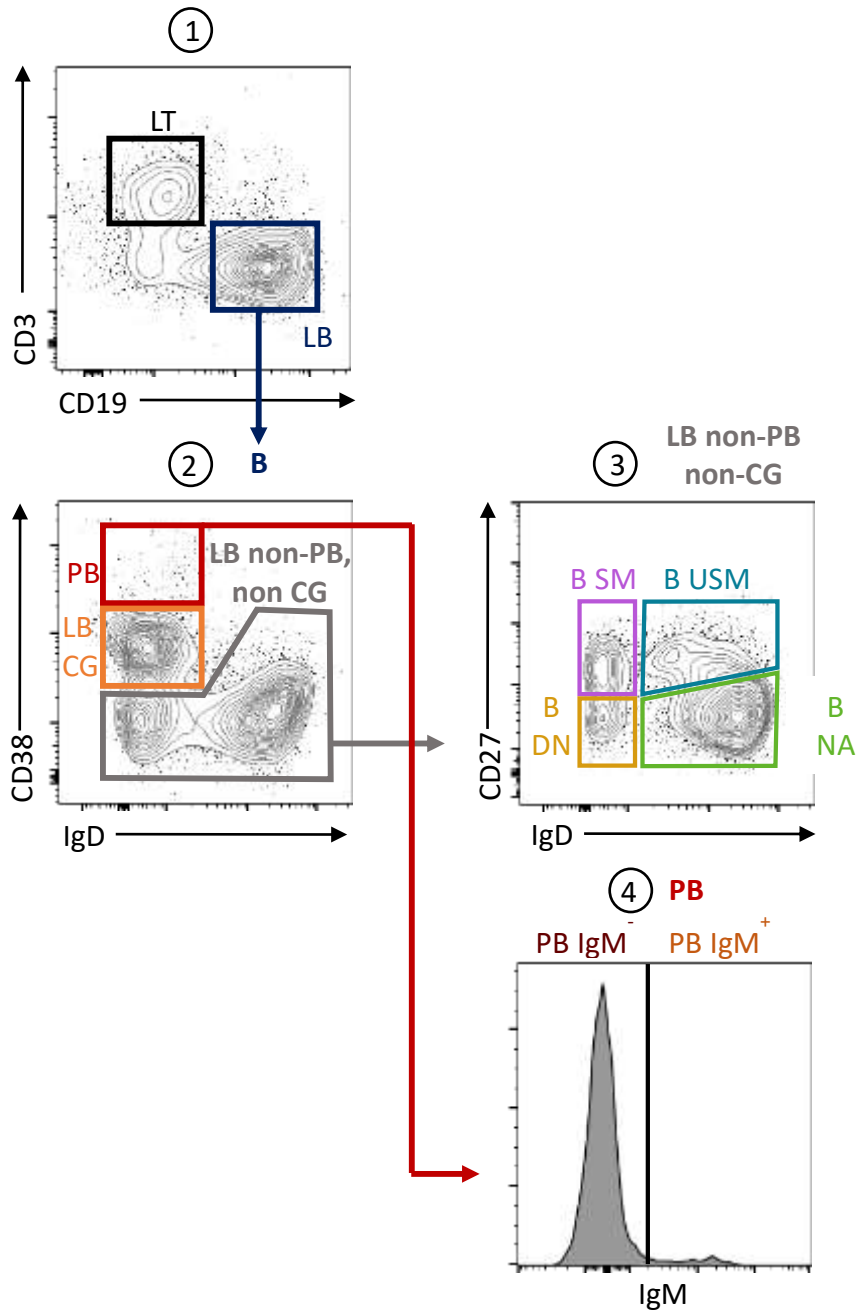


Figure 16 – Stratégie de discrimination des sous-populations de LB dans l’amygdale

Dans le sang périphérique, il n’y a pas de CG. Nous avons donc 5 sous-populations de LB à discriminer selon l’expression des mêmes marqueurs de surface que précédemment (**Figure 17**). Après la sélection des LB en utilisant le marqueur CD19 (①), les PB sont sélectionnés grâce leur très forte expression de CD27 et CD38 (②). Parmi les LB qui

ne sont pas identifiés en tant que PB (B non-PB), l'expression de CD27 et d'IgD permet de discriminer les LB NA, les LB USM, les LB SM et les LB DN (③).

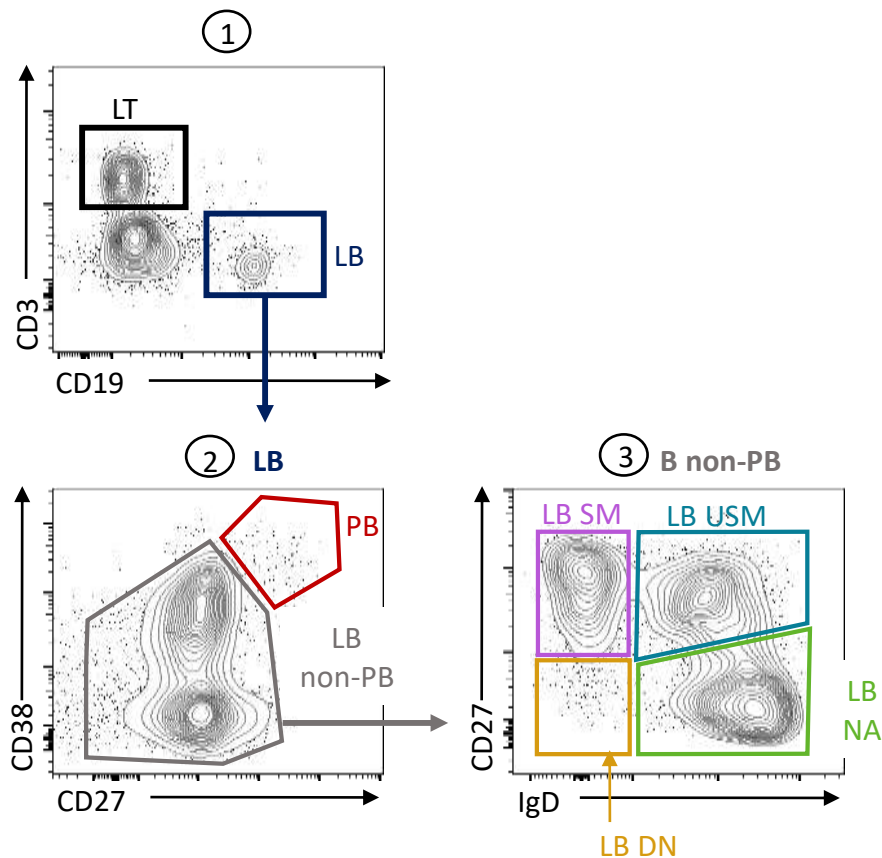


Figure 17 - Stratégie de discrimination des sous-populations de LB dans le sang

4.1.2. Marquage MAF

Les cellules ont été perméabilisées avec tampon Fix/Perm (Transcription Factor Buffer Set, *BD*) durant 40 min à 4°C, puis lavées par centrifugation à 450 g à 4°C avec le tampon Perm/Wash (Transcription Factor Buffer Set) et incubées dans ce même tampon avec un Ac anti-c-Maf (clone T54-853, *BD Biosciences*) à une concentration de 6,6 µg/mL.

4.1.3. Marquage extracellulaire dans les LB primaires

Les cellules ont d'abord été incubées en PBS durant 30 min à 4°C avec le panel d'Ac de surface (*Beckman Coulter*) décrit dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 – Marquage extracellulaire des LB

Amygdale		Sang	
Marqueur	Clones	Marqueur	Clones
CD19	J3-119	CD19	J3-119
CD27	1A4CD27	CD27	1A4CD27
CD38	LS198-4-3	CD38	LS198-4-3
IgD	IA6-2	IgD	IA6-2
IgM	SA-DA4		

4.1.4. Marquage intracellulaire dans les LB primaires

4.1.4.1. Marquage MAF

Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation à 450 g à 4°C en PBS puis perméabilisées comme décrit précédemment. Elles sont ensuite incubées avec l'Ac anti-c-Maf (clone T54-853) à une concentration de 6,6 µg/mL.

4.1.4.2. Marquage IL-10 et MAF/IL-10

Durant 4 h, les LB sont stimulés à 37°C en présence de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (50 ng/µL, *Merck Millipore*), ionomycine (1 µg/mL, *Merck Millipore*) et brefeldine A (10 µg/mL, *Merck Millipore*). Les LB sont d'abord incubés durant 30 min avec les Ac CD19, CD27, CD38 et IgD dans du PBS à TA pour le marquage extracellulaire. Les B sont ensuite lavés par centrifugation à 450 g durant 5 min à TA, puis perméabilisés dans un tampon CytoFix/Perm (CytoFast Fix/Perm, *Biolegend*) durant 20 min à TA. Les cellules sont lavées par centrifugation à 450 g durant 5 min à TA dans le tampon CytoPerm/Wash (CytoFast Fix/Perm, *Biolegend*), puis incubés avec l'Ac anti-IL-10 (JES3-9D7, *Biolegend*) ou les Ac anti-MAF + anti-IL-10 durant

20 min à TA dans le même tampon. Les LB sont lavés par centrifugation à 450 g durant 5 min à TA en PBS.

4.1.5. Acquisition des données de cytométrie

L'acquisition est réalisée avec un cytomètre Navios II (Beckman Coulter) en utilisant le logiciel Navios™ data acquisition and analysis software version 1.3. Les analyses sont ensuite effectuées avec les logiciels Kaluza Analysis (v 2.1), puis FlowJo (v 10.8.0).

4.2. Western Blot

4.2.1. Extraction de protéines et Dosage

Les cellules ont été lavées par centrifugation à 300 g en PBS à TA, puis lysées avec le tampon RIPA Lysis Buffer (*Thermo Scientific*) supplémenté avec 1 % de Protease Inhibitor Cocktail (*Sigma Aldrich*) durant 10 min à 4° C sur un agitateur rotatif (*Thermo Scientific*). Le lysat cellulaire a été ensuite centrifugé à 14 000 g durant 15 min à 4°C. Le lysat protéique (surnageant) a ensuite été séparé des débris cellulaires (culot), puis conservé à – 80 °C jusqu'à l'étape suivante.

Le dosage des lysats protéiques a été réalisé en plaque 96 puits (*Thermo Fisher Scientific*) selon le protocole du kit Micro BCA™ protein assay (*Thermo Fisher Scientific*) en utilisant le lecteur de plaque Multiskan Go microplate spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*) et le logiciel associé Skan It version 3.2 (*Thermo Fisher Scientific*). Les calculs permettant d'obtenir la concentration protéique des lysats à partir de l'absorbance et la concentration de la gamme étalon ont été réalisés sur Microsoft Excel.

4.2.2. Electrophorèse, Transfert et Marquage

20 µg de protéines extraites ont été traitées avec du tampon réducteur Laemmli 2X (1,8 % de β-mercaptoéthanol ; *Sigma Aldrich*) pour les lignées et 10 µg de protéines traitées avec un tampon Laemmli 5X pour les B primaires, puis séparées sur SDS-PAGE avec

une solution à 10 % d'acrylamide/bis (37,5:1) (*Biorad*) par électrophorèse verticale (Mini-PROTEAN® Tetra, *Biorad*) à 120 V durant 20 min puis à 160 V, 45 min. Les protéines séparées ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF de 0,2 µm (*Biorad*) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec Trans-Blot® SD (*Biorad*) à 20 V pendant 90 min. Après lavage au Tris Buffered Saline 0,1% Tween (*Sigma*) (TBST), la membrane a été bloquée pendant 1h dans du TBST contenant 5% de lait écrémé déshydraté (pour c-MAF) ou 5% de BSA (*Sigma*) (pour GAPDH) à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée dans une solution d'Ac de lapin, rabbit polyclonal anti-MAF αM1 (polyclonal 1, *ProteinTech*), rabbit polyclonal anti-MAF αM2 (polyclonal 2, *Active Motif*), rabbit polyclonal anti-MAF αM3 (polyclonal 3, *Invitrogen*) ou rabbit monoclonal anti-MAF BLR045F (*Bethyl*) à respectivement à 0,7 µg/mL (polyclonal 1), 5 µg/mL (polyclonal 2 et 3) et 1 µg/mL (monoclonal) dans du TBST contenant 1 % de lait écrémé déshydraté pendant 2 h à température ambiante (αM1) ou pendant une nuit à 4°C (BLR045F, αM2 et αM3). L'Ac secondaire utilisé était un Ac anti-Rabbit Donkey IgG (H+L) conjugué à la peroxydase (*Sigma Aldrich*) à 0,2 µg/mL dans 1 % de lait écrémé déshydraté TBST pendant une h à température ambiante. L'Ac rabbit polyclonal anti-GAPDH (*Abcam*) couplé à la HRP à 0,1 µg/mL dans du TBST contenant 1% de BSA et la membrane a été incubés pendant une nuit.

Les membranes PVDF ont été révélées par chimioluminescence (avec le substrat Immobilon Fort Western HRP, *Merck Millipore*) en utilisant le système ChemiDoc™ XRS (*Biorad*, logiciel Quantity One®).

4.3. Immunoprécipitation

Les cellules RPMI 8226 ont été lysées à l'aide du tampon IP Lysis/Wash Buffer fourni dans le kit Pierce™ Direct IP (*Thermo Scientific*). A partir d'1 mg du lysat total des cellules, la protéine MAF a été immunoprécipitée à l'aide de l'Ac anti-MAF monoclonal BLR045F (*Bethyl*) ou de l'Ac polyclonal αM1 (*ProteinTech*), tous deux à 35 µg/mL dans le Coupling Buffer 1X, selon le protocole du kit Pierce™ Direct IP Kit (*Thermo Scientific*). L'immunoprécipitat obtenu a ensuite été traité avec un tampon non réducteur du kit Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer (5X) (0,3M Tris•HCl, 5% SDS, 50%

glycerol), puis séparé sur SDS-PAGE avec une solution à 10 % d'acrylamide/bis (37,5:1) par électrophorèse verticale à 120 V durant 20 min puis à 160 V, 45 min. Les protéines séparées ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF de 0,2 μm à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec Trans-Blot® SD à 20 V pendant 90 min. Les membranes ont été incubées avec soit l'Ac anti-MAF monoclonal BLR045F, soit avec l'Ac polyclonal αM1 selon le protocole de western-blot expliqué précédemment.

5. Logiciel d'analyses statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Prism Graphpad version 8.0.2.

RESULTATS

PARTIE I : VALIDATION DE DIFFERENTS OUTILS POUR LA DETECTION DE MAF

Parmi les nombreuses études autour de la protéine MAF menées chez l'Homme, seules trois s'intéressent aux différents variants transcriptionnels et des isoformes protéiques de MAF et peu d'entre elles les décrivent clairement. La première étude à décrire deux variants de MAF s'appuie essentiellement sur la base de données GenBank (AF055376.1) (Chesi et al., 1998). Une seconde étude dans les macrophages décrit deux isoformes humaines de MAF appelées « MAF long » et « MAF court » selon les informations relatives à l'isoforme murine découverte par Kurshner et Morgan (Cao et al., 2005). Une troisième étude n'apporte aucune indication sur la source de données utilisée pour la description des deux isoformes appelés ici « c-MAF-a » pour l'isoforme longue et « c-MAF-b » pour l'isoforme courte (Aschenbrenner et al., 2018). L'impact de leur surexpression respective est analysée sur la production d'IL-10 par les Th17 IL-10⁻. Par ailleurs, il pourrait exister une troisième isoforme de MAF, décrite dans une revue selon les informations prédictives présentes dans les différentes bases de données (Imbratta et al., 2020) mais n'a jamais été confirmée expérimentalement.

Ainsi, face à ce manque d'informations dans la littérature, nous avons réalisé des analyses à partir de plusieurs bases de données et d'outils de prédiction de MPT (phosphorylation, sumoylation, ubiquitination et glycosylation) pour mieux définir les variants et isoformes du FT MAF. Ensuite, nous avons mis en place une approche expérimentale qui permet de les détecter avec différents outils et de les caractériser.

1. EXPLORATION *IN SILICO* DES VARIANTS ET ISOFORMES DE MAF

1.1. Variants et isoformes de MAF résultant de différents mécanismes d'épissage

Le gène *MAF* humain est situé sur le chromosome 16 position q23.2. Deux variants du gène *MAF* humain ont été décrits dans la littérature (Chesi et al., 1998) selon la base de données Genbank. Selon la base de données Ensembl, le variant *MAF_201* de 2 646 bases est identifié comme le transcrit court (Ensembl, ENST00000326043.5) et le variant *MAF_202* de 6 384 bases comme le transcrit long (Ensembl, ENST00000393350.1) (**Figure 18**).

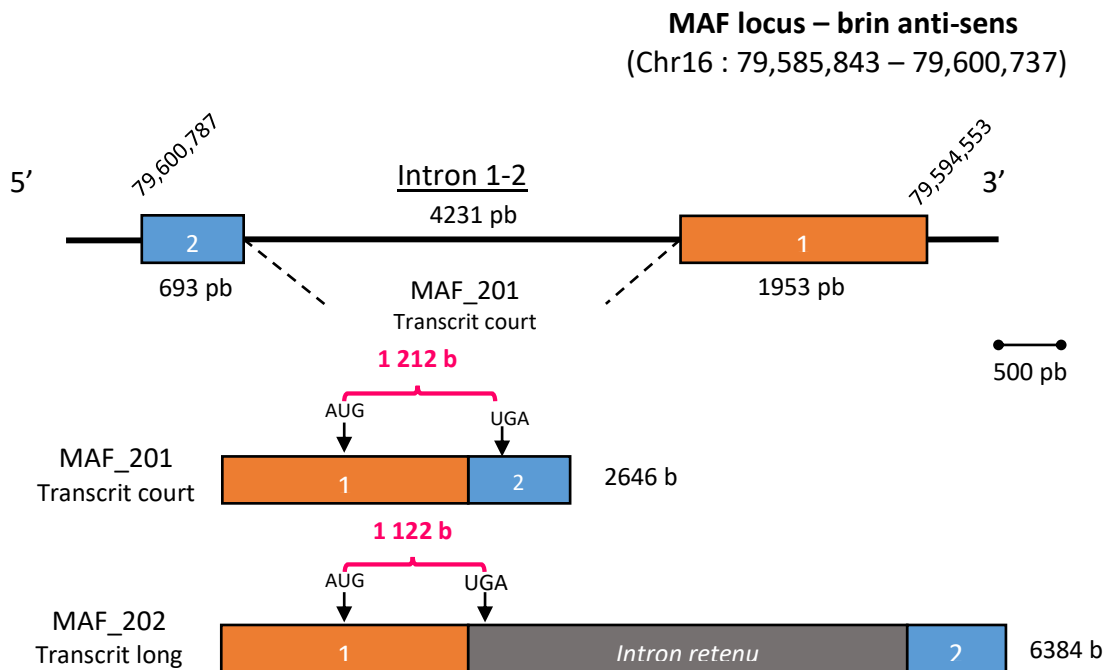


Figure 18 – Représentation des transcrits *MAF_201* et *MAF_202* humains.

L'intron 1-2 représenté par une ligne noire entre les deux exons est soit épissé (lignes en pointillés) dans le variant *MAF_201*, soit retenu (rectangle gris) dans le variant *MAF_202*. La séquence codante ou cadre ouvert de lecture (ORF) est représenté par une accolade rose.

Le transcrit long *MAF_202* est obtenu par un mécanisme de rétention de l'intron 1-2. Le transcrit court *MAF_201* est composé des exons 1 (1953 bases) et 2 (693 bases). Sa séquence codante de 1 212 bases est traduite en une protéine longue contenant 403 acides aminés (AA), soit une masse moléculaire prédictive de 42,0 kDa. Plus précisément, l'exon 1 code la région comprenant les AA 1 à 373 de la protéine longue et l'exon 2 code les AA 374 à 403.

La rétention de l'unique intron dans le transcrit *MAF_202* induit la présence d'un codon stop prématuré. Par conséquent, l'ORF de 1 122 bases est traduit en une protéine

tronquée de 373 AA, codée uniquement par l'exon 1, dont la masse moléculaire prédictive est de 38,5 kDa (*Figure 19*).

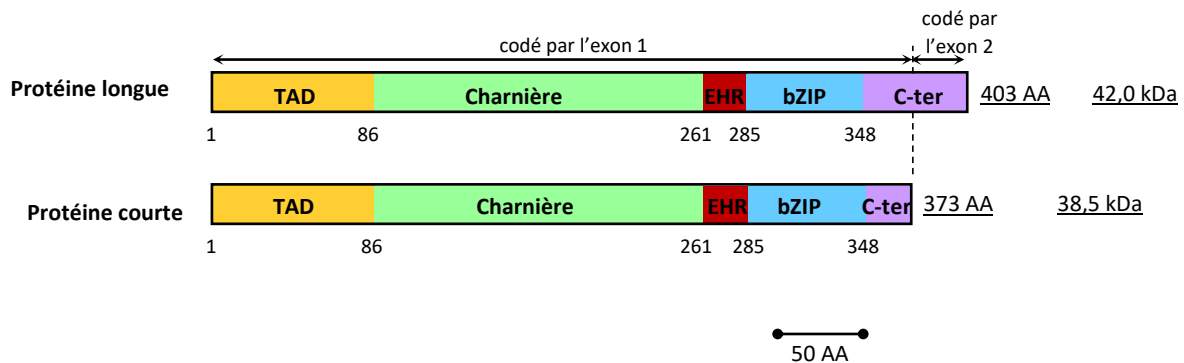


Figure 19 - Représentation des protéines MAF humaines codées par les variants MAF_201 et MAF_202.

D'après la base de données Ensembl, le variant MAF_203 (ENST00000569649.1) de 2 029 bases, documenté dans une seule revue (Imbratta et al., 2020), serait composé de l'exon 1 (1953 bases) et d'un autre exon nommé ici 2' (99 bases) (*Figure 20*).

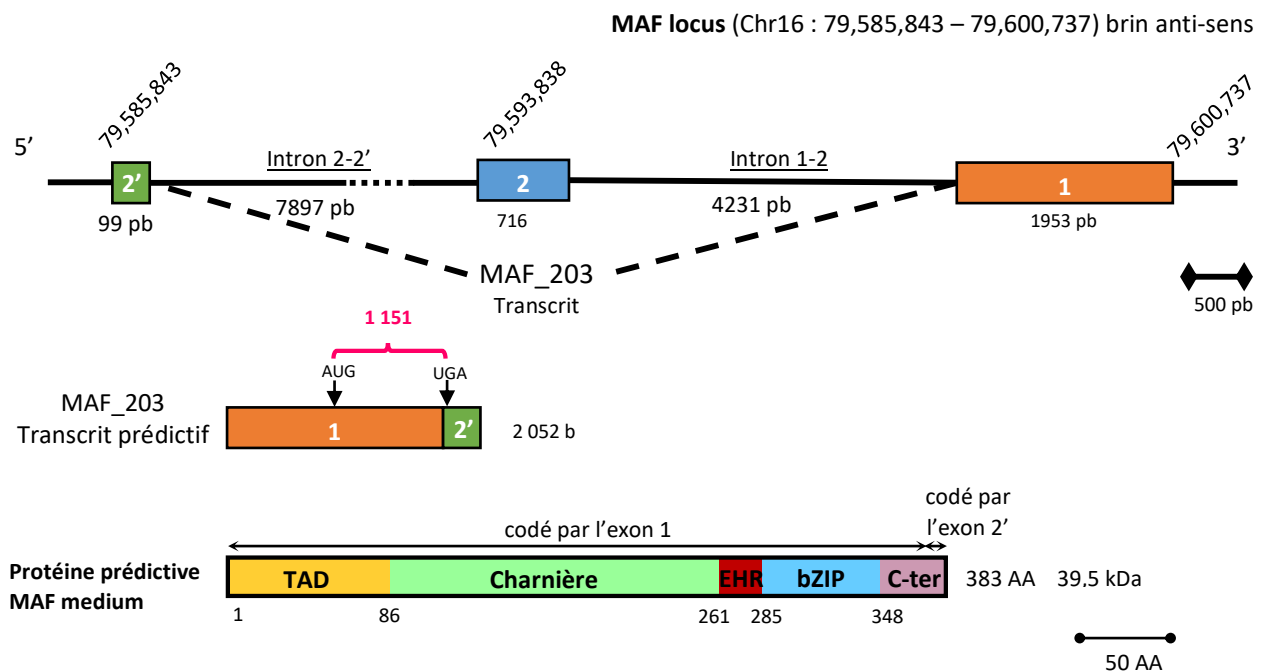


Figure 20 - Représentation du transcript MAF_203 et de la protéine prédictive correspondante.

Les pointillés de l'intron 2-2' indiquent qu'il a été représenté sans tenir compte de l'échelle, due à sa taille.

L'ORF de 1151 bases du transcrit MAF_203 sont traduites en une protéine nommée ici, MAF medium de 383 AA, soit une masse moléculaire prédictive de 39,5 kDa. La protéine MAF medium contiendrait 10 AA de plus que la protéine courte, suggérant une potentielle homologie avec la protéine longue murine codée par le transcrit murin MAF_201 (**3.2. Transcrits et protéines MAF décrites**) (Huang et al, 2002). A nouveau, l'exon 1 code pour les AA 1 à 373 et l'exon 2' pour ces 10 AA. Le rôle de la protéine MAF medium reste non défini.

1.2. Analyse comparative des protéines MAF longue et courte

Afin de savoir si les protéines MAF longue et MAF courte peuvent avoir des rôles différents, nous avons réalisé une analyse comparative de leurs séquences protéiques. Un alignement des séquences d'AA a été fait selon la méthode Needleman-Wunsch qui évalue l'homologie sur toute la longueur des deux séquences protéiques (**Figure 21**).

```

C 1  MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDPDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS
L 1  MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDPDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS

C 71  PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHLQGGFDGYARGAQQQLAA
L 71  PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHLQGGFDGYARGAQQQLAA

C 141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAAQSGAGPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGSAAASA
L 141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAAQSGAGPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGSAAASA

C 211 GGAGGAGGGGPASAGGGGGGGGGGGGAAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRF SDEQLVTMSVRELNRQLRG
L 211 GGAGGAGGGGPASAGGGGGGGGGGGGAAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRF SDEQLVTMSVRELNRQLRG

C 281 VSKEEVIRLKQKRRRLKNRGYAQSFRKRVQQRHVLESEKNQLLQQVDHLKQEISRLVRERDAYKEYEK
L 281 VSKEEVIRLKQKRRRLKNRGYAQSFRKRVQQRHVLESEKNQLLQQVDHLKQEISRLVRERDAYKEYEK

C 351 LVSSGFRENGSSSDNPSSPEFFM-----
L 351 LVSSGFRENGSSSDNPSSPEFFITEPTRKLEPSVGYATFWKPQHRVLT SVFTK

```

Figure 21 - Alignement protéique de MAF court et MAF long.

Les séquences protéiques de MAF court (C) et MAF long (L) ont été alignées Snapgene. Les AA identiques sont représentés en noir et ceux manquants ou différents en rouge. Les tirets représentent des AA manquants. Les différents domaines des protéines MAF sont indiqués en jaune (TAD), en vert (Charnière), en rouge (EHR), en bleu (bZIP) et en violet (C-ter).

Comme attendu, l'alignement des séquences a révélé des différences au niveau du domaine C-terminal codé par les AA 372 à 403 mais pas au niveau des domaines TAD et bZIP impliqués dans les interactions avec l'ADN et les partenaires, suggérant des cibles et des partenaires similaires entre les isoformes courte et longue. Cette différence de 31 AA dans le domaine C-ter pourrait aussi être responsable d'une conformation spatiale différente entre les isoformes, ce qui pourrait impacter l'accessibilité des sites d'interactions.

1.3. Homologie homme/souris

Les isoformes de MAF ont d'abord été mise en évidence chez la souris. La description des isoformes murines de MAF (Kurshner et Morgan, 1995; Huang et al, 2002) et humaines (Ensembl !) indiquent des masses moléculaires semblables. Etant donné que de nombreuses études de MAF sont réalisées chez la souris, nous avons réalisé des alignements globaux des protéines humaines et murines. Les alignements (*Figure 22*), dont les conclusions sont récapitulées dans le *Tableau 9*, révèlent que les protéines codées par les transcrits MAF_203 humain et MAF_201 murin sont semblables à 97,8 % et celles codées par les transcrits MAF_202 humain et murin présentent une similitude à hauteur de 98,1 %. Aucune correspondance à la protéine longue humaine n'a été trouvée chez la souris.

A

1 MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS
1 MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS

71 PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHQLOGGFDGYARGAQQQLAA
71 PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHQLOGGFDGYARGAQQQLAA

141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVVSAVIAAAAAQSGAAPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGGASASA
141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVVSAVIAAAAAQSGAGPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGSAAASA

211 SGAGGAGGGGPASA --- GGGGGGGGGGTAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRFSDQLVTMSVRELNRQLRG
211 GGAGGAGGGGPASAGGGGGGGGGGGTAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRFSDQLVTMSVRELNRQLRG

278 VSKEEVIRLKQKRRTLKNRGYAQSCRFRVQQRHVLESEKNQLLQOVDHLKQEISRLVRERDAYKEKEYE
281 VSKEEVIRLKQKRRTLKNRGYAQSCRFRVQQRHVLESEKNQLLQOVDHLKQEISRLVRERDAYKEKEYE

348 LVSNGFRENGSSSDNPSSPEFFM
351 LVSSGFRENGSSSDNPSSPEFFM

B MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS
MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLIAGGSLSTPMSTPCSSVPPS

71 PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHQLOGGFDGYARGAQQQLAA
71 PSFSAPSPGSGSEQKAHLEDYYWMTGYPQQLNPEALGFSPEDAVALISNSHQLOGGFDGYARGAQQQLAA

141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVVSAVIAAAAAQSGAGPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGSAAASA
141 AAGAGAGASLGGSGEEMGPAAAVVSAVIAAAAAQSGAAPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGGASASA

211 GGAGGAGGGGPASAGGGGGGGGGGGTAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRFSDQLVTMSVRELNRQLRG
211 SGAGGAGGGGPASA --- GGGGGGGGGGTAGAGGALHPHHAAGGLHFDDRFSDQLVTMSVRELNRQLRG

281 VSKEEVIRLKQKRRTLKNRGYAQSCRFRVQQRHVLESEKNQLLQOVDHLKQEISRLVRERDAYKEKEYE
278 VSKEEVIRLKQKRRTLKNRGYAQSCRFRVQQRHVLESEKNQLLQOVDHLKQEISRLVRERDAYKEKEYE

351 LVSNGFRENGSSSDNPSSPEFFMYPRESSTVM
348 LVSSGFRENGSSSDNPSSPEFFMCVVCALFIL

Figure 22 – Alignement des protéines MAF humaines et murines

(A) Alignement des protéines MAF courtes humaine et murine. (B) Alignement la protéine MAF longue murine et la protéine MAF medium humaine. Les protéines humaines sont soulignées. Les AA identiques sont représentés en noir et les AA manquants ou différents en rouge.

Tableau 9 – Transcrits et protéines MAF : Homologie entre l’Homme et la souris

Espèce	Nom	Transcrits				Protéines			Homologie
		Taille ARNm (bases)	Exons (nombre)	Taille exons (bases)	ORF	Nom	Taille (AA)	Taille (kDa)	
Humain	MAF_201	2646	2	1953 716	1212	MAF long	403	42,0	
	MAF_202	6384	1	1953	1122	MAF court	373	38,5	98,1 %
	MAF_203	2052	2	1953 99	1152	MAF medium	383	39,5	97,8 %
Murin	MAF_201	3223	3	1341 60 1819	1143	LcMAF (MAF long)	380	39,5	97,8 %
	MAF_202	3642	1	3642	1113	MAF court	370	38,5	98,1 %

Les résultats de l’alignement de la protéine MAF courte humaine avec la protéine MAF courte murine sont indiqués en beige et ceux de l’alignement de la protéine MAF medium humaine avec la protéine MAF longue murine, en jaune.

1.4. Modifications post-traductionnelles de MAF

Dans l’introduction, nous avons présenté les MPT connues des protéines MAF (ubiquitination, sumoylation et phosphorylation) et leurs implications majeures dans la fonction et la dégradation du FT. Par conséquent, nous avons utilisé différents outils de prédiction pour mettre en évidence d’autres sites de MPT de MAF.

1.4.1. Mise en évidence de sites potentiels de phosphorylation de MAF

L’outil de prédiction de sites de phosphorylation NetPhos version 3.1 (Blom et al., 1999 ; Blom et al., 2004) permet de prédire des sites de phosphorylation sur des sérines, thréonines et tyrosines pour 17 kinases dont GSK-3, p38 MAPK, CDK5 et PKA, décrites pour leur régulation de l’activité de MAF (**Figure 10**). L’outil NetPhos 3.1 réalise une prédiction à partir de protéines présentant des sites consensus de phosphorylation similaires dans les bases de données et attribue un score de 0 à 1, qui correspond à la probabilité que les sites de phosphorylation soient vrais et phosphorylés par la kinase associée. Les scores supérieurs à 0,5 correspondent à une prédiction définie comme étant acceptable.

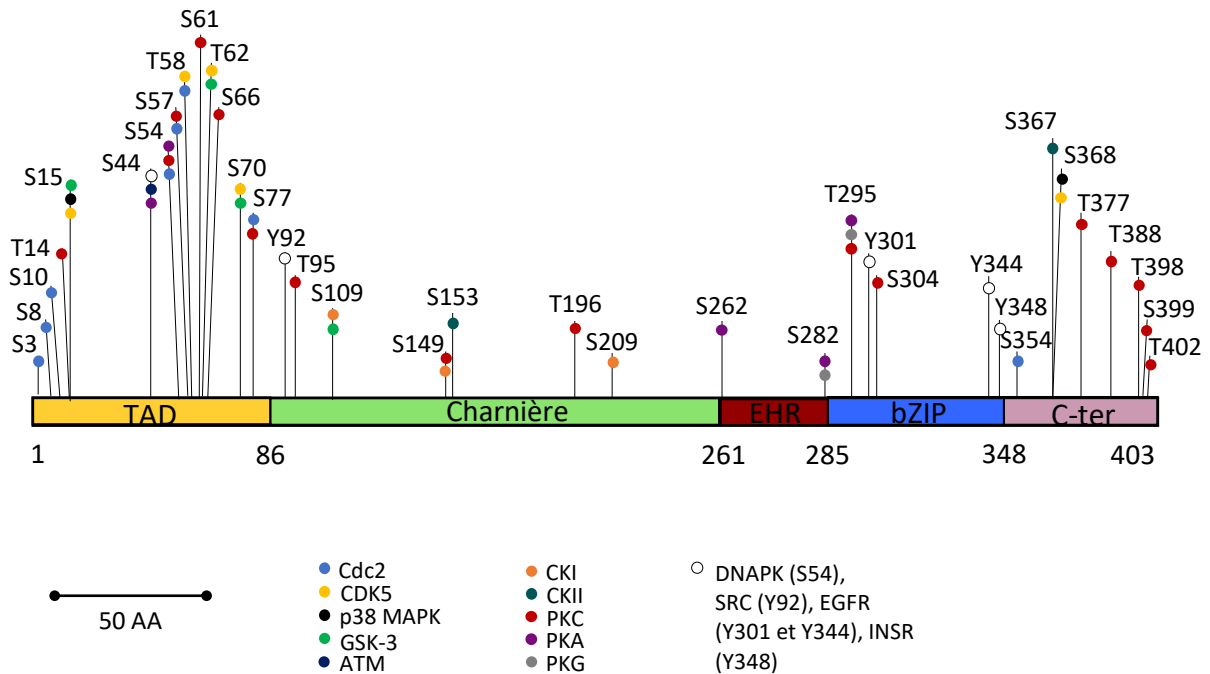


Figure 23 - Sites prédictifs de phosphorylation de MAF et kinases associées

La protéine MAF longue de 403 AA est utilisée comme matrice.

S : sérine ; **T** : thréonine ; **Y** : lysine ; **cdc2** : kinase dépendante de la cycline 1 ; **PKC** : protéine kinase C ; **PKA** : protéine kinase A ; **PKG** : protéine kinase G ; **CDK5** : kinase dépendante de la cycline 5 ; **GSK3** : glycogène synthase kinase 3 ; **p38 MAPK** : protéines kinases activées par les mitogènes p38 ; **DNAPK** : protéine kinase dépendante de l'ADN ; **ATM** : protéine mutée dans le syndrome d'ataxie télangiectasie ; **CKI** : caséine kinase 1 ; **CKII** : caséine kinase 2 ; **EGFR** : récepteur du facteur de croissance épidermique ; **INSR** : récepteur à l'insuline.

L'utilisation de cet outil permet de mettre en évidence 30 sites potentiels de phosphorylation de MAF avec des kinases associées et des scores de confiance supérieurs à 0,5 (**Figure 23**, **Tableau A1** en Annexe 4). Parmi les 30 sites mis en évidence, 16 sites sont phosphorylés par la kinase PKC et 9 par la kinase Cdc2. Parmi les sites prédits, 5 sites (S54, S62 et S66 phosphorylés par GSK-3, S58 par la p38 MAPK et Y92 par la kinase TEC) préalablement décrits dans les LT (Rocques et al., 2007 ; Lai et al., 2012 ; Liu et al., 2015) sont phosphorylés par d'autres kinases tels que le résidu S54 qui peut être phosphorylé par les kinases PKC, PKA et Cdc2 et le résidu T58 phosphorylé par les kinases CDK5 et Cdc2. Les résidus S66, T62 et Y92 peuvent être phosphorylés respectivement par les kinases PKC, CDK5 et SRC.

En parallèle, cet outil identifie aussi des sites de phosphorylation sans associer de kinase. Selon le même procédé, un score de confiance est attribué. 16 sites parmi les 30 préalablement prédits ont pu être mis évidence avec des scores de confiance élevés (supérieurs à 0,7) et 4 sites supplémentaires, avec des scores de confiance supérieurs à 0,8 (**Figure 24, Tableau A2** en Annexe 4).

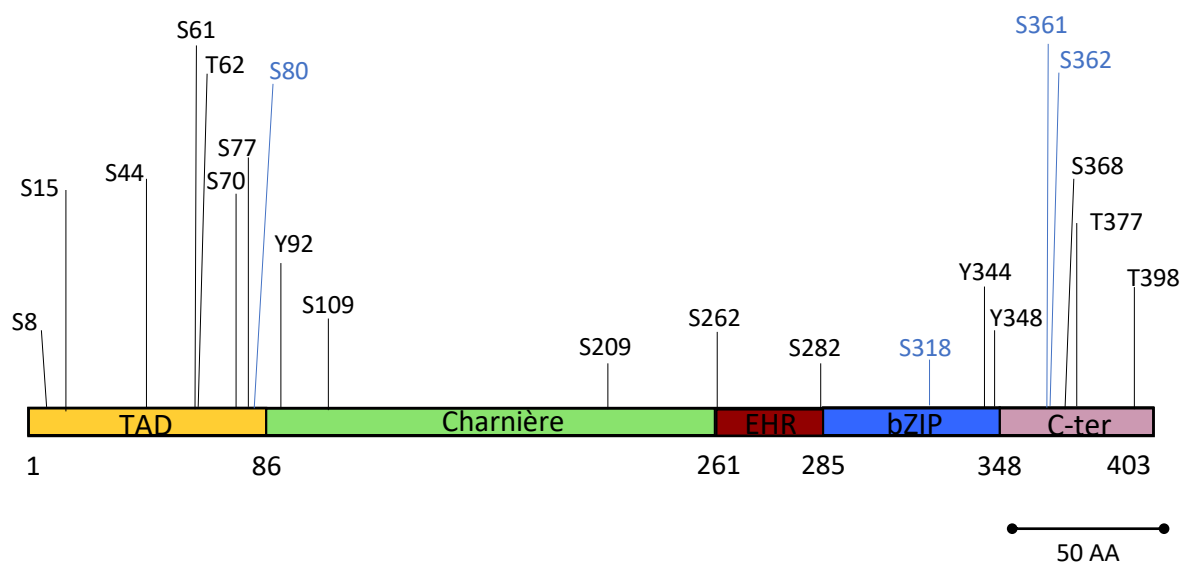


Figure 24- Sites prédictifs de phosphorylation de MAF

Les sites indiqués en noir correspondent aux sites communs avec la précédente prédiction (avec une kinase identifiée) et ceux en bleu correspondent aux sites supplémentaires qui n'apparaissent pas dans la précédente prédiction.

En conclusion, ces résultats suggèrent une multitude d'isoformes phosphorylées. Un groupement phosphoryl a une taille approximative d'1 kDa, suggérant des masses moléculaires variables entre 1 et 34 kDa supplémentaires dépendant du nombre de sites phosphorylés. En regard de l'implication de la phosphorylation dans la stabilité et l'activité de MAF, ces données suggèrent des modulations importantes de ces deux paramètres.

1.4.2. Confirmation des sites connus de SUMOylation de MAF

Nous avons utilisé un outil permettant la prédiction de résidus sumoylés sur la protéine MAF (GPS-SUMO, Zhao et al., 2014) afin de mettre en évidence d'autres sites de SUMOylation, toujours en attribuant un score de confiance basé sur le même procédé de calcul.

Le site de SUMOylation en position K33, décrit pour son atténuation de la fixation de MAF sur le promoteur de l'*IL4* dans les T CD4⁺ et les deux autres sites en position K29 et K331 prédits grâce au logiciel ELM dans l'étude de Lin (Lin et al., 2010) ont été confirmés par l'outil GPS-SUMO avec des scores de confiance très élevés (scores $\geq 0,8$; **Tableau A3** en Annexe 4).

La protéine MAF SUMOylée par la SUMO-1 (en position K33) présente une masse moléculaire de 70 kDa (Lin et al., 2010).

1.4.3. Mise en évidence de sites potentiels d'ubiquitination de MAF

Afin de mettre en évidence les sites d'ubiquitination de MAF, l'outil GPS-Uber (Wang et al., 2022) a été utilisé. Il permet d'identifier les résidus potentiellement ubiquitylés par les ubiquitine-ligases E3 (**Figure 25**, **Tableau A4** en Annexe 4) en attribuant un score de confiance (calculé comme précédemment).

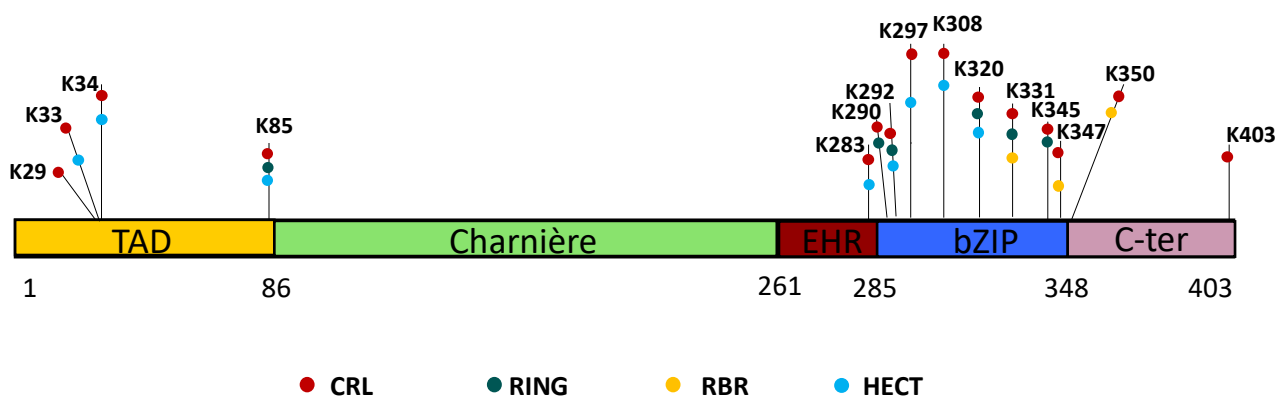


Figure 25 - Schéma représentatif des sites prédictifs d'ubiquitination

Parmi les 15 sites d'ubiquitination par les E3 ubiquitine-ligases ont été prédits sur la protéine MAF dont 13 par les ligases de la famille « CULLIN RING» (CRL), 8 par les ligases de la famille HECT, 3 par celles de la famille « RING between RING » (RBR) et 6 par celles de la famille RING. Parmi ces 15 sites, 3 d'entre-eux sont déjà décrits dans la littérature (K85, K331 et K297) (Xu et al., 2017 ; Zhang et al., 2016) et 3 sont communs aux sites de sumoylation (K29, K33 et K331). Les sites d'ubiquitination présents sur le domaine bZIP en position K292, K297, K308 et K347 sont entourés de plusieurs sites de phosphorylation (T295, Y301, Y304 et Y344), suggérant une interrelation de ces processus.

En conclusion, ces données suggèrent une grande variété d'isoformes ubiquitinylées de MAF, suggérant des masses moléculaires variables de MAF et une fine régulation de sa stabilité *via* sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome.

1.4.4. Mise en évidence de sites potentiels d'O- et N-glycosylation de MAF

Nous nous sommes intéressés aux processus de O- et N-glycosylation de la protéine MAF. Le TAD est un domaine riche en sérine (**Figure 21**; Blank et Andrews, 1997) et constitue une zone propice à l'O-glycosylation. Deux outils NetOGlyc version 4.0 (Steentoft et al., 2013) et NetNGlyc version 1.0 (Gupta et Brunak, 2002) basés sur des scores de confiance, ont été utilisés. 13 sites d'O-glycosylation (score supérieur à 0,7) situés dans le TAD de la position S3 à S80, 6 autres dans domaine charnière de S149 à S223 et 1 au début du domaine bZIP en position S304 ont été mis en évidence (**Tableau A5** en Annexe 4, **Figure 26**). Deux autres sites d'O-glycosylation dans le domaine C-ter en position T377 et S383 non présents sur l'isoforme courte de MAF sont mis en exergue. En parallèle, deux sites de N-glycosylation ont été prédits par l'outil NetNglyc dans le domaine C-ter en position N359 et N365.

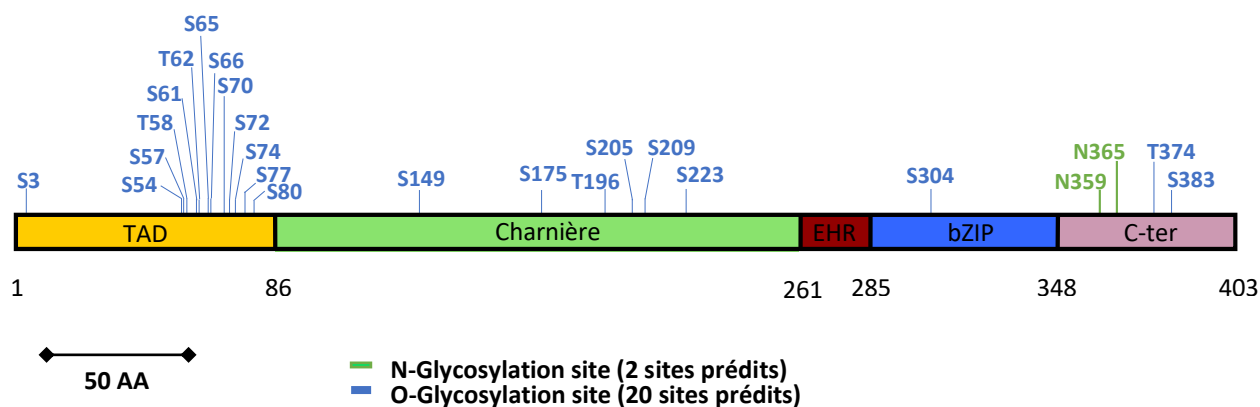


Figure 26 - Représentation schématique des sites prédictifs d'O- et N-glycosylation des protéines c-MAF, en utilisant la protéine longue comme matrice.

Cette analyse révèle une dominance de O-glycosylation comparé à la N-glycosylation sur la protéine MAF. La prédiction de nombreux sites de glycosylation de MAF au niveau des domaines impliqués dans l'interaction avec l'ADN et les protéines partenaires (TAD et bZIP), suggèrent que la capacité de transactivation, la formation de dimères avec des partenaires et la stabilité des protéines MAF pourraient être impactées par des MPT.

L'existence de différents variants et isoformes complexifie l'analyse du FT MAF. En prenant en compte le nombre de sites prédictifs de MPT et la diversité des MPT des protéines MAF, il pourrait y avoir une multitude d'isoformes possibles. Ces résultats suggèrent également que les protéines MAF pourraient avoir des masses moléculaires différentes en fonction des MPT et du nombre de sites modifiés.

1.5. Structure tertiaire des protéines MAF

A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence la structure tertiaire de MAF. Seule la structure de MAFG, appartenant de la famille des MAF court, a été mise en évidence par cristallographie (Kurokawa et al., 2009). Au sein de la famille MAF, les domaines

EHR et bZIP sont décrits pour leur haute conservation (Imbratta et al., 2020), indiquant qu'ils sont semblables entre MAF et MAFG.

Nous avons utilisé l'outil AlphaFold DB (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) qui permet une prédiction de la structure tertiaire de MAF (*Figure 27*, **Tableau A6** en Annexe 5) basé sur un score de confiance associé à chaque AA. Alpha Fold DB identifie et aligne la protéine d'intérêt aux protéines similaires dans la base de données Protein Data Bank. Cela permet de mettre en place une structure prédictive basée sur les protéines similaires dont la structure est connue. Le score obtenu (pLDDT) correspond à la distance entre chaque AA de la structure prédite et celui correspondant dans les structures de protéines similaires. Le score obtenu est compris entre 0 à 100 et indique la fiabilité de la prédiction (Tableau A6). Plus le score est élevé, plus la prédiction est fiable. Le modèle de l'outil AlphaFold catégorise ensuite les scores en 4 groupes (*Figure 27*), permettant de visualiser la structure en fonction du score de confiance obtenu.

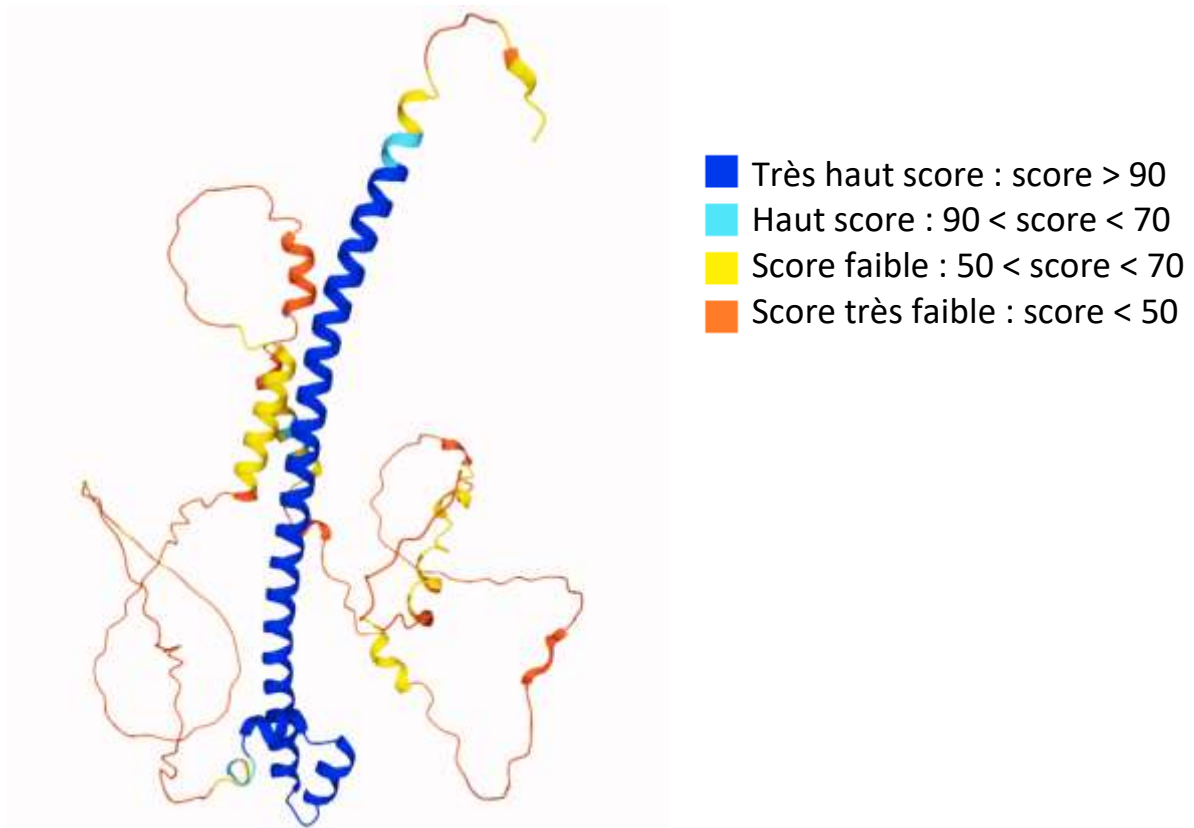


Figure 27 – Structure tertiaire prédictive de MAF

Le résultat de cette prédiction structurale a montré un haut score de confiance (>70) pour les AA en position 259 à 355 correspondant aux régions communes avec MAFG (EHR et bZIP) (**Tableau A6** en Annexe 5). En revanche, le score de prédiction structural est faible (< 50) pour les AA correspondant à la partie N-ter du domaine charnière et aux domaines TAD et C-ter. Ces données indiquent que la structure prédite au niveau des domaines TAD, C-ter et charnière (côté N-ter) a peu de chance de correspondre à la structure réelle de MAF, suggérant que cette partie de la séquence de MAF n'a pas d'équivalents dont la structure tertiaire est connue.

2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS MAF DANS LES LIGNEES DE LB HUMAINS

Selon l'équipe de Kang, l'analyse de l'expression globale du FT MAF est réalisée en utilisant des amorces ciblant l'exon 1 qui est commun aux différents variants chez l'homme (Kang et al., 2017). Dans l'optique de mettre au point l'analyse de l'expression des transcrits MAF, nous avons utilisé différentes sondes *TaqMan*TM commerciales pour cibler l'expression par RT-qPCR, ceci dans deux lignées de LB, l'une issue de lymphome de Burkitt (RAMOS) et l'autre, de myélome multiple (MM) plasmocytaire (RPMI 8226).

Dans cette dernière, les plasmocytes présentent des translocations du locus de l'*IGH*. La translocation t(14 ;16) dissocie la région intronique des séquences amplificatrices (« enhancer ») de l'*IGH* sur le chromosome 14 et induit leur juxtaposition au niveau du locus du gène *MAF* sur le chromosome 16 (Chng et al., 2007; Natkunam et al., 2009). La transcription du gène *MAF* est réalisée sous le contrôle des séquences enhancers de l'*IgH* (Chesi et Bergasgel, 2011). Cela conduit à une surexpression de MAF et définit cette lignée comme un contrôle positif idéal.

2.1. Présentation des sondes utilisées pour détecter les variants MAF

Pour cette étude, nous avons utilisé une sonde MAF_ALL ciblant l'exon 1 (commun à tous les transcrits), une sonde spécifique du transcrit MAF_201 ciblant la jonction entre l'exon 1 et l'exon 2 et une sonde spécifique du transcrit MAF_202 ciblant la fin de l'intron 1-2 et le début de l'exon 2 (**Figure 28**).

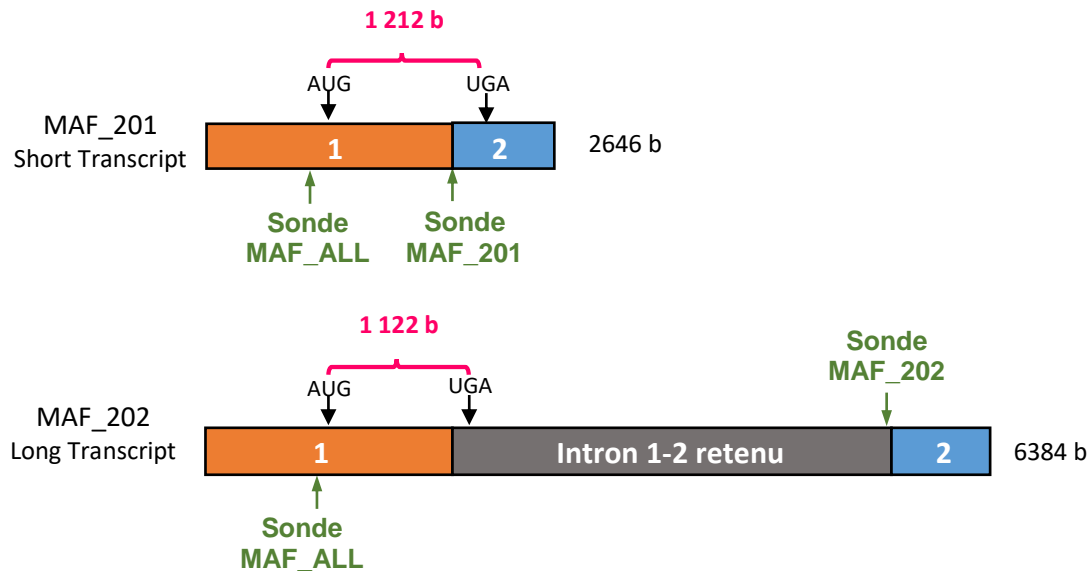


Figure 28- Représentation du positionnement des 3 sondes TaqMan™ sur les transcrits MAF_201 et MAF_202.

Le positionnement de chaque sonde est indiqué par une flèche. Sur le schéma, la sonde MAF_ALL cible le nucléotide 950, la sonde MAF_201, le nucléotide 1948 et la sonde MAF_202, le nucléotide 6193.

2.2. Analyse de l'expression de MAF dans les lignées RAMOS et RPMI 8226

Les histogrammes suivants présentent les résultats obtenus par RT-qPCR pour les 2 lignées cellulaires. L'expression globale des transcrits MAF et celle de chaque transcrit dans la lignée de lymphome de Burkitt (RAMOS) et la lignée de MM (RPMI 8226) ont été analysées par RT-qPCR (**Figure 29**).

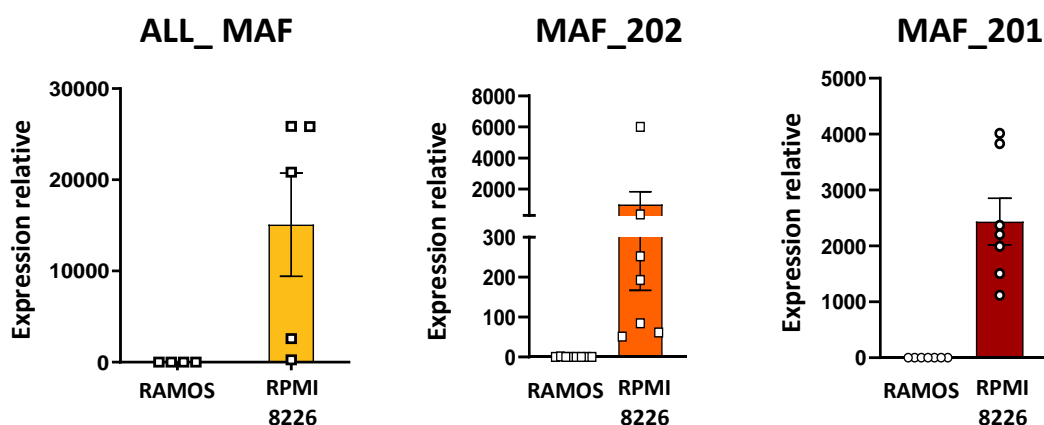


Figure 29 - Expression des transcrits MAF dans les lignées dérivées de LB

Analyse de l'expression relative du gène MAF (GAPDH, gène de référence) et celles de ses 2 variants MAF_201 et MAF_202 par RT-qPCR dans les lignées RAMOS et RPMI 8226. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. N= 5 (expression globale du gène) et N= 7 (expression des 2 variants).

Aucun transcrit MAF n'est exprimé dans la lignée RAMOS. Seule la lignée RPMI 8226 exprime les deux transcrits, MAF_201 et MAF_202.

3. VALIDATION DES OUTILS DE DETECTION DE LA PROTEINE MAF

Nous avons mis en œuvre plusieurs approches utilisant différents clones d'Ac (polyclonaux et monoclonaux) pour détecter les protéines MAF par cytométrie en flux et par western blot avec ou sans immunoprécipitation (IP) en amont.

3.1. Présentation des Ac

3.1.1. Les Ac de cytométrie en flux

La détection des protéines MAF chez l'Homme a été réalisée en utilisant 2 clones : T54-853 et sym0F1. Le premier Ac monoclonal anti-MAF (T54-853) met en évidence l'expression globale de MAF dans les LTreg de type 1 (Apetoh et al., 2010), les macrophages (Van den Bosch et al., 2014) et les LT CD4⁺ (Alhers et al., 2022). L'Ac monoclonal sym0F1 reconnaît les deux isoformes de MAF obtenues après la

surexpression du transcrit MAF_201 ou MAF_202 dans les LTh17 IL-10⁻ (Aschenbrenner et al., 2018).

3.1.2. Les Ac de western blot

3.1.2.1. L'Ac polyclonal anti-MAF α M1

De nombreuses études murines et humaines ont utilisé un Ac polyclonal anti-MAF (α M1) dans les Th2 (Wu et al, 2018, 30446383), les Th (Hewitson et al., 2020) et les lignées de MM, RPMI 8226, LP-1 et MM.1 (Xu et al, 2020). L'Ac α M1 reconnaît la région des AA en position 246 à 264 des protéines c-MAF longue et courte. Dans le laboratoire, le Dr Grasseau a aussi utilisé cet Ac et a mis en évidence une protéine MAF de 50 kDa dans les B périphériques stimulés.

3.1.2.2. L'Ac monoclonal anti-MAF BLR045F

Plusieurs études utilisent l'Ac monoclonal BLR045F pour la détection de MAF par immunohistochimie dans les macrophages (Granai et al, 2020) et par cytométrie en flux dans les Breg murins et humains (Radomir et al, 2021). L'épitope reconnu par cet Ac correspond aux AA en position 125 à 175 dans le domaine charnière de MAF. D'après le fournisseur (*Bethyl Laboratories*), l'Ac reconnaît deux protéines de 48 et 36 kDa dans la lignée RPMI 8226.

3.1.2.3. L'Ac polyclonal anti-MAF α M2

A ce jour, aucune étude ne mentionne l'utilisation d'un Ac ciblant la partie C-terminale qui discrimine les isoformes longues et courtes de MAF. Par conséquent, nous avons opté pour un troisième Ac : anti-MAF polyclonal (α M2). D'après le fournisseur (*Active Motif*), l'épitope reconnu se situe en aval de l'AA en position 373. Cet Ac ne devrait détecter que l'isoforme longue de la protéine MAF ayant une masse moléculaire prédictive de 42 kDa.

3.1.2.4. L'Ac polyclonal anti-MAF α M3

Un troisième Ac polyclonal (α M3) reconnaissant les AA en position 1 à 50 dans le domaine TAD a été choisi. Il devrait détecter une protéine à 40 kDa selon les données du fournisseur (*Invitrogen*). La forte conservation du TAD entre les membres de la sous-famille des MAF longs présume de la détection croisée de MAFA (37 kDa), MAFB (36 kDa) et NRL (26 kDa) (*Figure 30*).

```

MAF  1  MASELAMNSDLPTSPLAMEYVNDFDLMKFVKKKEPVET-DRIISQCGRL  50
MAFA 1  MAEELAM-GAELPSSPLAIEVYNDFDLMKFVKKKEPVA----ERFQHGRL  45
MAFB 1  MAEELSM-GPELPTSPLAMEVYNDFDLLKFDVKKEPLGRAERPGRPCTRL  49
NRL   1  -----MALPPSPLAMEVYNDFDLMKFVKKREPSSEGR-----  34

```

Figure 30 - Alignement des protéines MAF appartenant à la sous-famille des MAF longs de l'AA 1 à 50 du domaine TAD

Alignement global des protéines MAF, MAFA, MAFB et NRL des AA 1 à 50 réalisé avec Snappene. Les AA identiques sont représentés en noir et les AA manquants ou différents par un tiret rouge. La protéine MAF (en gras) est utilisée comme matrice.

Les quatre Ac anti-MAF de western blot préalablement décrits sont récapitulés dans le *Tableau 10* et la localisation des épitopes qu'ils reconnaissent sur la protéine MAF courte est indiqué sur la *Figure 31*.

Nom	Clone	Fournisseur	Cible	Utilisation
<i>T54-853</i>	Monoclonal (T54-853)	BD		Cytométrie
<i>Sym0F1</i>	Monoclonal (Sym0F1)	ThermoFisher		
<i>BLR045F</i>	Monoclonal (BLR045F)	Bethyl Laboratories	AA 125-175	Western Blot
<i>αM1</i>	Polyclonal	ProteinTech	AA 246-264	
<i>αM2</i>	Polyclonal	Active Motif	Après AA 373	
<i>αM3</i>	Polyclonal	Invitrogen	AA 1-50	

Tableau 10 - Tableau récapitulatif des différents Ac anti-MAF

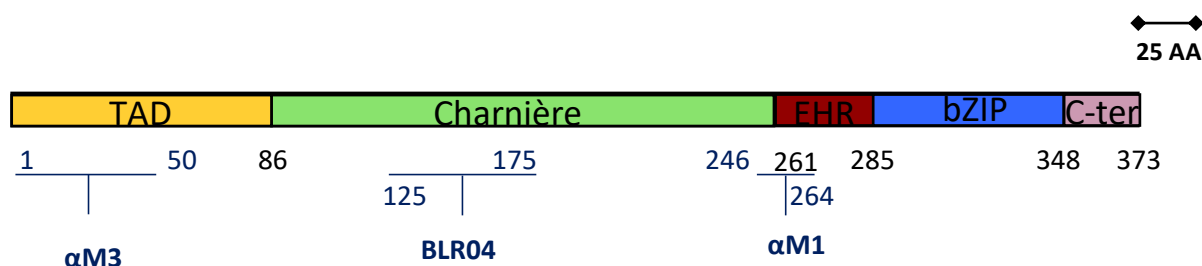


Figure 31 - Représentation des cibles des Ac anti-MAF de Western Blot

La protéine courte de 373 AA est utilisée comme matrice pour l'identification des cibles des Ac anti-MAF BLR045F, α M1, α M2, α M3.

3.2. Présentation de la méthodologie mise en place pour valider la spécificité des Ac

Nous avons précédemment mis en évidence que ce FT présente différents variants transcriptionnels et de nombreuses MPT (décrites et prédictives) laissant présager de l'existence de plusieurs isoformes protéiques. Afin de réaliser une étude de l'expression de MAF dans les LB, une validation expérimentale des différents Ac anti-MAF a été mise en oeuvre (*Tableau 10*).

Pour cela, nous avons contacté l'équipe du Dr Xiliang Mao afin d'obtenir un plasmide contenant le gène codant pour la protéine MAF fusionnée avec une séquence codant pour l'hémagglutinine (HA) (pMAF-HA) (Wang et al., 2017 ; Xu et al., 2017). Malheureusement, l'équipe ne nous a pas fourni d'informations concernant le variant, ou les enzymes de restriction utilisées pour l'insertion.

Par conséquent, afin de savoir quel variant transcriptionnel de MAF a été cloné dans ce plasmide pMAF-HA, nous avons réalisé une amplification *via* des amorces ciblant MAF par PCR en utilisant :

- un couple d'amorces « MAF_ALL » ciblant l'exon 1 présent dans tous les transcrits MAF (taille amplicon : 138 pb)
- et des couples ciblant soit le variant MAF_201 (taille amplicon : 209 pb), soit le variant MAF_202 (taille amplicon : 118 pb) (*Figure 32*).

Les amorces MAF_201 amplifient une séquence située à la jonction des exons 1 et 2, et les amorces MAF_202, une région non codante en 3' (3' UTR) située à la jonction de l'intron et l'exon 2.

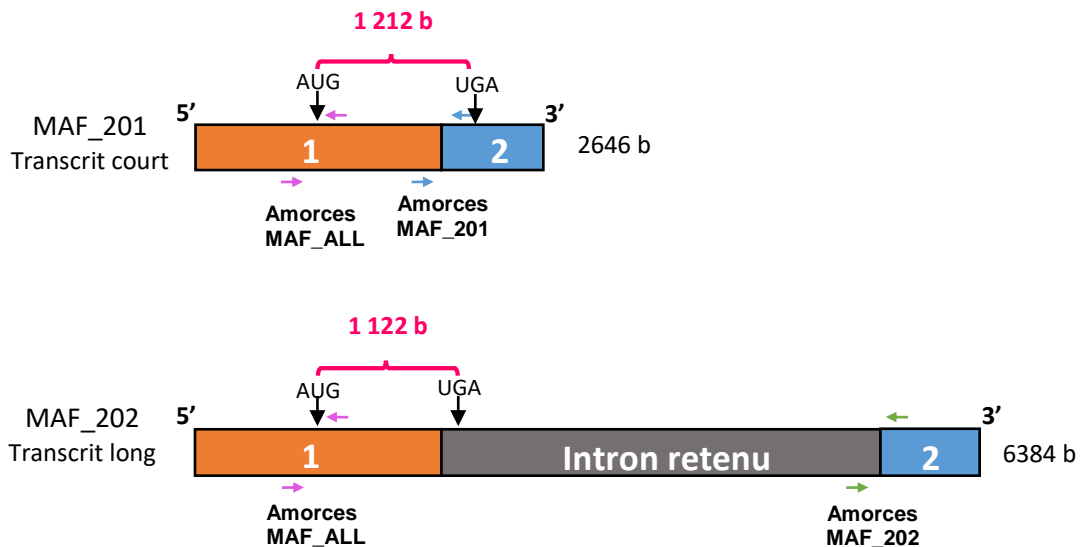


Figure 32 - Localisation des couples d'amorces sur les transcrits MAF_201 et MAF_202.

Le plasmide pMAF-HA contient le variant MAF_202 (*Figure 33*). Par conséquent, le plasmide, renommé pMAF202-HA, sera utilisé pour la validation des Ac spécifiques de la protéine MAF courte.

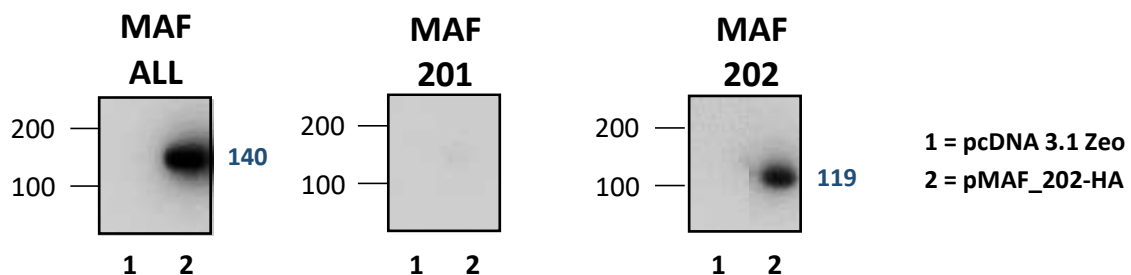


Figure 33 – Identification du variant MAF inséré dans le plasmide pMAF-HA

Le plasmide vide (pcDNA 3.1 Zeo) et le plasmide pMAF-HA ont été amplifiés par PCR en utilisant les différentes amorces. Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 2 %.

Un séquençage du plasmide a été réalisé. Le séquençage l'absence du promoteur T7 connu pour être associé au promoteur du cytomégalo virus (CMV) dans les plasmides pcDNA 3.1 Zeo (*Figure 34*). En outre, le promoteur EF-1 α est présent dans le plasmide

pMAF202-HA, or il ne l'est pas dans les plasmides pcDNA 3.1 Zeo. Ces données indiquent que le plasmide dans lequel MAF_202 a été inséré n'est pas un pcDNA 3.1 Zeo.

Le séquençage confirme les résultats de la PCR (**Figure 33**). En effet, l'ADNc cloné dans le plasmide correspond à MAF_202. Le séquençage a également mis en évidence que :

- la séquence codant l'hémagglutinine (HA) est positionnée du côté N-terminal de la séquence codante de MAF_202,
- une partie de la séquence 3' UTR de MAF_202 est présente dans le plasmide pMAF202-HA (région ciblée par les amorces MAF_202),

L'analyse des résultats du séquençage permet donc d'établir une carte partielle du plasmide pMAF202-HA (**Figure 34**).

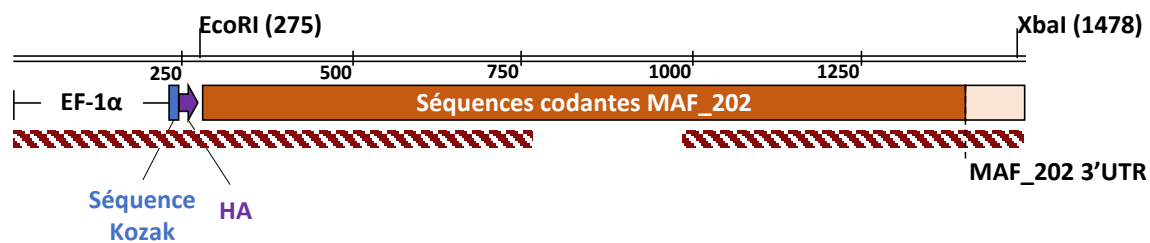


Figure 34 - Carte partielle du plasmide pMAF202-HA obtenu par séquençage.

L'échelle en nombre de base (b) est indiquée par les nombres présents sous les deux lignes parallèles. Les régions séquencées sont identifiées par les rectangles hachurés et sont alignées sous la séquence de MAF_202 et sa séquence 3'UTR provenant de la base de données Ensembl!. Les enzymes de restriction situées à chaque extrémité de l'insert MAF_202 et leur position exacte sont indiquées au-dessus de la séquence.

Cette analyse révèle les sites de deux enzymes de restriction situées aux extrémités de l'insert MAF_202 (région codante de MAF_202 + région 3' UTR) : EcoRI et XbaI qui ont probablement permis le clonage de l'insert.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons donc réalisé une digestion du plasmide avec chaque enzyme séparément ou combinées (EcoRI + XbaI, taille du produit de digestion attendu : 1 204 pb) (**Figure 35**).

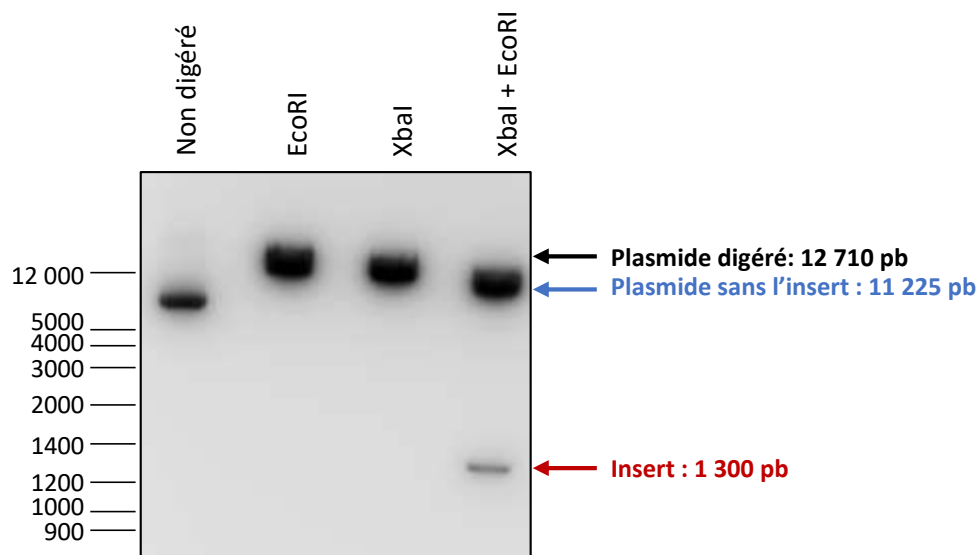


Figure 35 – Digestion enzymatique du plasmide pMAF202-HA.

Le plasmide pMAF202-HA a été digéré soit avec l'enzyme EcoRI seule, soit avec l'enzyme XbaI seule, soit par une double digestion EcoRI + XbaI. La taille estimée des fragments est indiquée à droite en rouge pour l'insert, en bleu pour le plasmide sans l'insert et en noir pour le plasmide digéré par une seule enzyme.

Les résultats des digestions simples (soit avec EcoRI, soit avec XbaI) ont révélé qu'EcoRI et XbaI présentent chacun un site unique au sein du plasmide pMAF202-HA. En effet, une seule bande a été observée dans les deux digestions simples (taille estimée à 12 710 pb). Les résultats de la double digestion (EcoRI + XbaI) ont montré une taille estimée de l'insert à 1 300 pb et du plasmide vide à 11 225 pb. La taille observée de l'insert après digestion est très proche de celle identifiée par le séquençage à 1 204 pb. Ces résultats confirment que le plasmide dans lequel l'ADNc MAF_202 a été cloné ne correspond pas au pcDNA 3.1 Zeo, car le plasmide vide pcDNA 3.1 Zeo a une taille de 5 428 pb alors que le plasmide ici présente une taille estimée supérieure à 11 000 pb. Ce résultat confirme que les enzymes XbaI et EcoRI ont été utilisées pour le clonage de l'insert MAF_202.

Cette étape de caractérisation a permis d'obtenir plus d'information sur l'outil que nous souhaitons utiliser pour valider la spécificité de reconnaissance des Ac anti-MAF.

3.3. Validation de la spécificité des Ac anti-MAF

Afin de valider les Ac reconnaissant l'isoforme courte de la protéine MAF, la lignée HSG (n'exprimant pas MAF) a été transfectée avec le plasmide (pMAF202-HA) pour induire une surexpression de MAF ou avec le plasmide vide (pcDNA3.1 Zeo) en tant que contrôle négatif. (**Figure 36**).

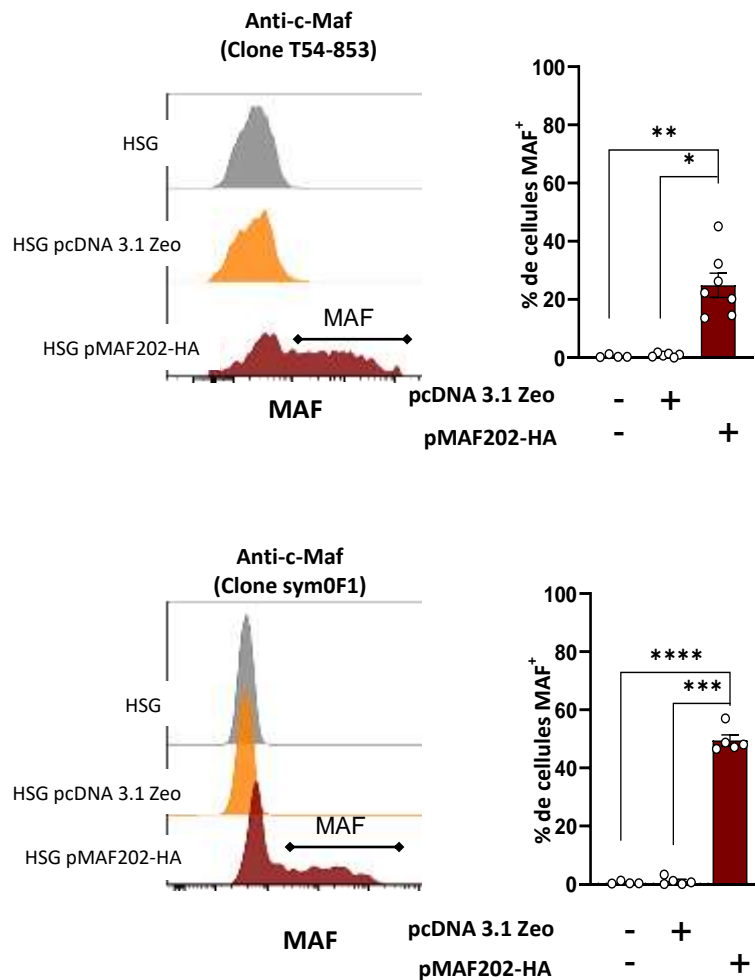


Figure 36 - Validation de la spécificité des Ac de cytométrie en flux pour la détection de la protéine MAF courte.

A gauche : Images représentatives de l'expression de MAF dans les HSG avant ou après transfection avec le plasmide vide (pcDNA 3.1 Zeo) ou le plasmide pMAF202-HA. **A droite :** Graphiques représentant l'expression de MAF dans les HSG (HSG non transfectées : N=4 ; HSG transfectées (Ac anti-MAF T54-853 : N=7 et Ac anti-MAF sym0F1 : N=5)

2 jours après la transfection des cellules HSG, l'expression de MAF a été évaluée dans les HSG par cytométrie en flux en utilisant les Ac anti-MAF T54-853 et sym0F1. Comparativement aux cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide, les cellules transfectées avec le vecteur pMAF202-HA et marquées avec les 2 Ac présentent une détection de l'expression de MAF.

En parallèle, une étude par la technique de western-blot en conditions réductrices a été menée sur ces mêmes cellules en utilisant les Ac anti-MAF α M1, α M2, α M3, BLR045F (**Figure 37**). Etant donné la présence d'une séquence codant pour l'HA dans le plasmide (**Figure 34**), nous avons utilisé un Ac anti-HA qui permet de détecter indirectement MAF et constitue un contrôle positif de sa détection.

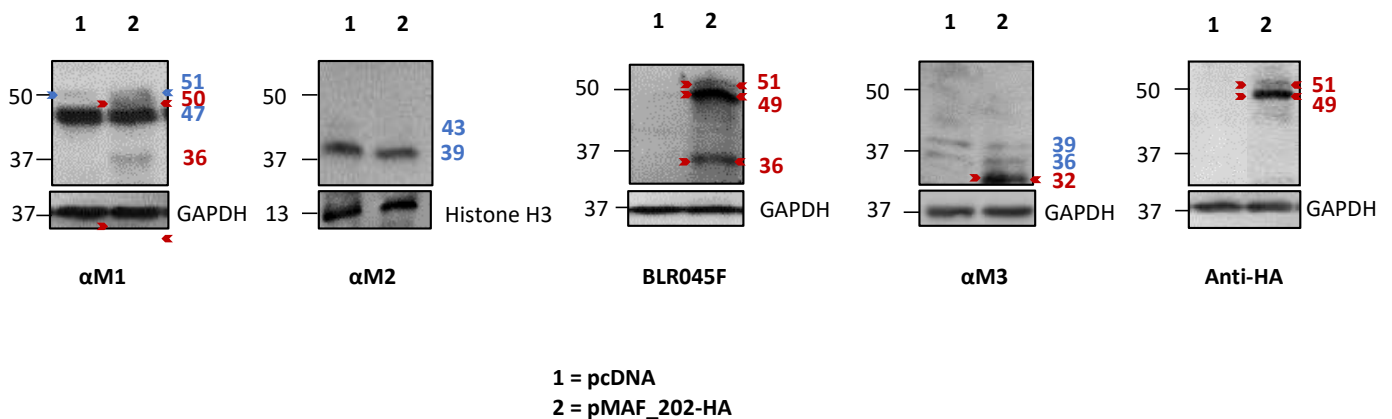


Figure 37 - Validation des Ac de Western Blot pour la détection de la protéine MAF courte

Les masses moléculaires estimées indiquées en bleu correspondent à des protéines détectées de façon aspécifique, celles en rouge correspondent à des protéines détectées uniquement dans les HSG pMAF202-HA. Les Ac anti-MAF utilisés sont indiqués sous les gels et ceux utilisés pour les protéines endogènes (GAPDH et Histone H3) sont indiqués à droite.

L'Ac α M1 reconnaît deux protéines aspécifiques détectées à 47 et 51 kDa dans les HSG transfectées avec le plasmide pMAF202-HA ou le plasmide vide pcDNA 3.1 Zeo (**Figure 37**). Deux protéines à 36 kDa et 50 kDa ne sont reconnues que dans les HSG transfectées avec le plasmide pMAF202-HA avec l'Ac α M1. L'Ac α M2, utilisé en tant que contrôle négatif de l'expression de MAF court, reconnaît deux protéines aspécifiques sont détectées à 39 et 43 kDa dans les HSG qu'elles soient transfectées ou non avec le plasmide pMAF202-HA. L'Ac monoclonal BLR045F reconnaît 3 protéines uniquement dans les HSG transfectées avec le plasmide pMAF202-HA à 51 kDa, 49

kDa et 36 kDa. L'Ac α M3 révèle 3 protéines dont 2 non spécifiques à 36 kDa et 39 kDa et 1 protéine détectée uniquement dans les HGS transfectées avec le plasmide pMAF202-HA à 32 kDa. Bien que la protéine à 32 kDa ne soit reconnue que dans les HSG transfectées avec le plasmide pMAF202-HA, la masse moléculaire de cette protéine est inférieure aux masses moléculaires observées ou prédictives de MAF court et ne correspond à aucune isoforme connue de MAF. L'Ac anti-HA détecte 2 protéines uniquement dans les HSG transfectées avec le plasmide pMAF202-HA à 49 kDa et 51 kDa, présentant des masses moléculaires identiques à celles observées avec l'Ac anti-MAF BLR045F. L'absence de détection d'une protéine à 36 kDa par l'anti-HA suggère qu'il pourrait y avoir une isoforme où l'étiquette HA est clivée. Cela suggère que la protéine MAF pourrait être soumise à un clivage en région N-terminale qui induirait la perte de l'étiquette HA.

Ces résultats ont mis en évidence que la protéine MAF courte (codée par le transcrit MAF_202) présente un décalage entre la masse moléculaire prédictive de 38,5 kDa et celles observées entre 36 kDa, 49 kDa et 51 kDa. Le décalage entre la masse moléculaire prédictive 38,5 et celle observée à 36 kDa pourrait s'expliquer la variabilité présente dans l'estimation de la taille des protéines. Le décalage de masse moléculaire entre les différentes isoformes pourrait provenir de la présence de l'étiquette HA qui ajoute 3 kDa à la taille de la protéine et des MPT préalablement décrites sur la séquence protéique de MAF. Aucun des Ac anti-MAF testés dans cette partie n'a révélé de protéines à 70 kDa, correspondant à une isoforme sumoylée.

Le décalage de masse moléculaire de la protéine MAF courte pourrait s'expliquer par une ou plusieurs MPT. Une mono-ubiquitination de MAF (+ 8,6 kDa) peut induire une protéine d'une masse moléculaire de 47,1 kDa (proche de la protéine observée à 49 kDa). Le nombre important de sites de phosphorylation sur la protéine MAF suggère que le décalage de masse moléculaire des isoformes à 51 et 49 kDa pourrait être dû à un nombre sites phosphorylés plus important pour l'isoforme à 51 kDa que celle à 49 kDa.

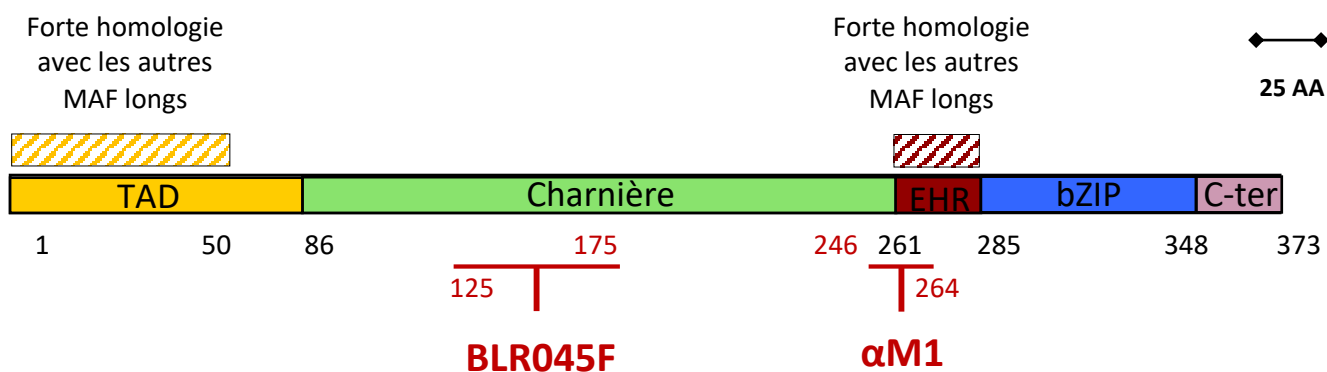


Figure 38 – Localisation des cibles des Ac anti-MAF capable de reconnaître la protéine MAF courte.

Ces résultats ont donc permis de valider la spécificité de l'Ac anti-MAF BLR045F. Malgré l'invalidation de sa spécificité *via* l'expression d'une protéine MAF recombinante dans la lignée HSG, nous avons continué l'évaluation de la spécificité de l'Ac αM1 par d'autres stratégies au cours de l'étude (*Figure 38*).

3.4. Evaluation de la spécificité des Ac anti-MAF pour la protéine MAF longue

La spécificité des Ac αM1 et BLR045F n'a pas été évaluée pour la reconnaissance de la protéine MAF longue. L'alignement que nous avons réalisé en *Figure 21*, nous a permis d'analyser la conservation des épitopes reconnus par les Ac. Les résultats de l'alignement des protéines MAF courte et MAF longue (*Figure 21*) confirment que les séquences protéiques sont identiques de l'AA 1 à 372 et donc au niveau des épitopes reconnus par les Ac BLR045F et αM1. Par conséquent, ces Ac devraient également reconnaître la protéine MAF longue. De plus, étant donné la présence de l'épitope reconnu par l'Ac αM2 sur la protéine MAF longue, il est possible que cet Ac puisse reconnaître cette isoforme de façon spécifique.

3.5. Analyse de l'expression de MAF court dans différentes lignées dérivées de LB

Après la stratégie de validation des Ac anti-MAF par cytométrie en flux et western blot dans les lignées HSG transfectées, l'expression de la protéine MAF a été évaluée dans

les lignées RAMOS et RPMI 8226 (**Figure 39**) dans lesquelles nous avons préalablement étudié l'expression des transcrits MAF_201 et MAF_202 (**Figure 29**).

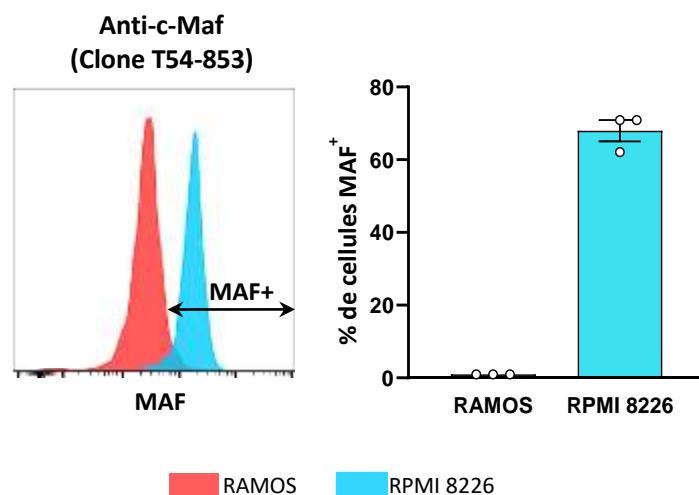


Figure 39- Etude de l'expression de MAF dans des lignées dérivées de LB par cytométrie de flux.

Gauche: Image représentative de l'expression de MAF dans les lignées RAMOS et RPMI 8226.
Droite : Graphique représentant la moyenne de trois expériences. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM (N=3).

MAF est très faiblement exprimé dans la lignée RAMOS ($0,96 \% \pm 0,01$) et fortement exprimé dans la lignée RPMI 8226 ($67,96 \% \pm 2,93$).

L'expression de MAF a été évaluée dans les deux lignées par western blot en conditions réductrices, en utilisant les deux Ac anti-MAF préalablement validés, BLR045F et α M1. Lors de sa validation, l'Ac BLR045F reconnaissait trois isoformes de la protéine MAF courte (36 kDa, 49 kDa et 51 kDa) (**Figure 37**). Dans la lignée RPMI 8226, deux isoformes ont été détectées avec cet Ac à 41 kDa et 49 kDa (**Figure 40**).

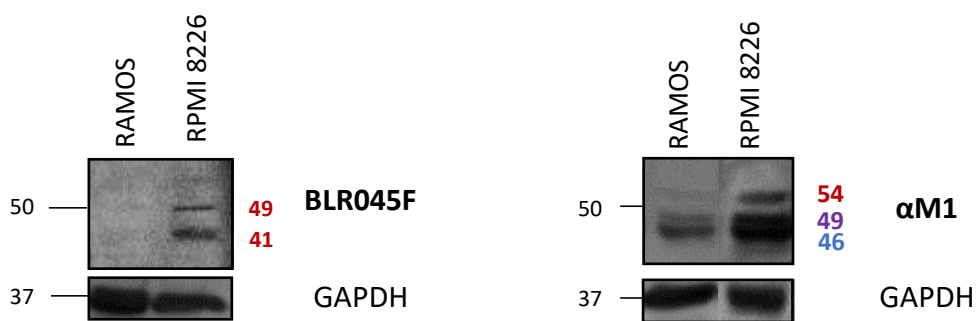


Figure 40 - Etude de l'expression de MAF dans des lignées dérivées de LB par western blot. (N=4). Les masses moléculaires indiquées en bleu correspondent à des protéines détectées de façon aspécifique, en rouge, à celles détectées de façon spécifique et en violet à celle dont la spécificité est incertaine.

Dans la lignée RAMOS, la détection par l'Ac α M1 révèle deux protéines à 46 et 49 kDa alors que les données précédentes ont montré une absence d'expression des transcrits et ne absence d'expression en cytométrie, suggérant une reconnaissance aspécifique de ceux deux protéines. Dans les RPMI 8226, l'isoforme à 54 kDa semble particulièrement exprimée comparé aux RAMOS, suggérant qu'elle pourrait correspondre à MAF. La présence de la protéine à 49 kDa dans les RAMOS suggère qu'elle serait également détectée de façon aspécifique dans la lignée RPMI 8226. Cependant, une isoforme de même masse moléculaire est aussi détectée de façon spécifique par l'Ac BLR045F, suggérant que la protéine détectée à 49 kDa pourrait correspondre à MAF. Il est donc impossible de conclure avec certitude sur la détection spécifique ou aspécifique de cette isoforme avec l'Ac α M1 dans la lignée RPMI 8226.

Les résultats des western-blots suggèrent que la protéine à 49 kDa détectée par l'Ac α M1 et l'Ac BLR045F pourrait correspondre à une même isoforme de MAF.

3.6. Etude des isoformes reconnues par les Ac anti-MAF

Bien que reconnaissant tous les deux des épitopes situés dans le domaine charnière, l'Ac monoclonal BLR045F et l'Ac polyclonal α M1 reconnaissent deux isoformes de MAF dans les RPMI 8226 dont l'une avec une masse moléculaire identique entre les deux Ac

(49 kDa) et les autres avec les masses moléculaires différentes entre les deux Ac. De ce fait, nous nous sommes demandé si les deux Ac reconnaissent les mêmes isoformes de MAF.

Pour l'évaluer, MAF a été immunoprécipité à partir d'un lysat protéique de cellules RPMI 8226, à l'aide de l'Ac BLR045F ou l'Ac α M1. Chaque immunoprécipitat a ensuite été analysé par western blot en conditions dénaturantes non-réductrices (**Figure 41**). Les conditions expérimentales de la réalisation du western-blot sont différentes de celles utilisées précédemment car nous n'avons pas utilisé de conditions réductrices (conservation des ponts disulfures), ce qui aura pour conséquence de modifier les masses moléculaires des isoformes.

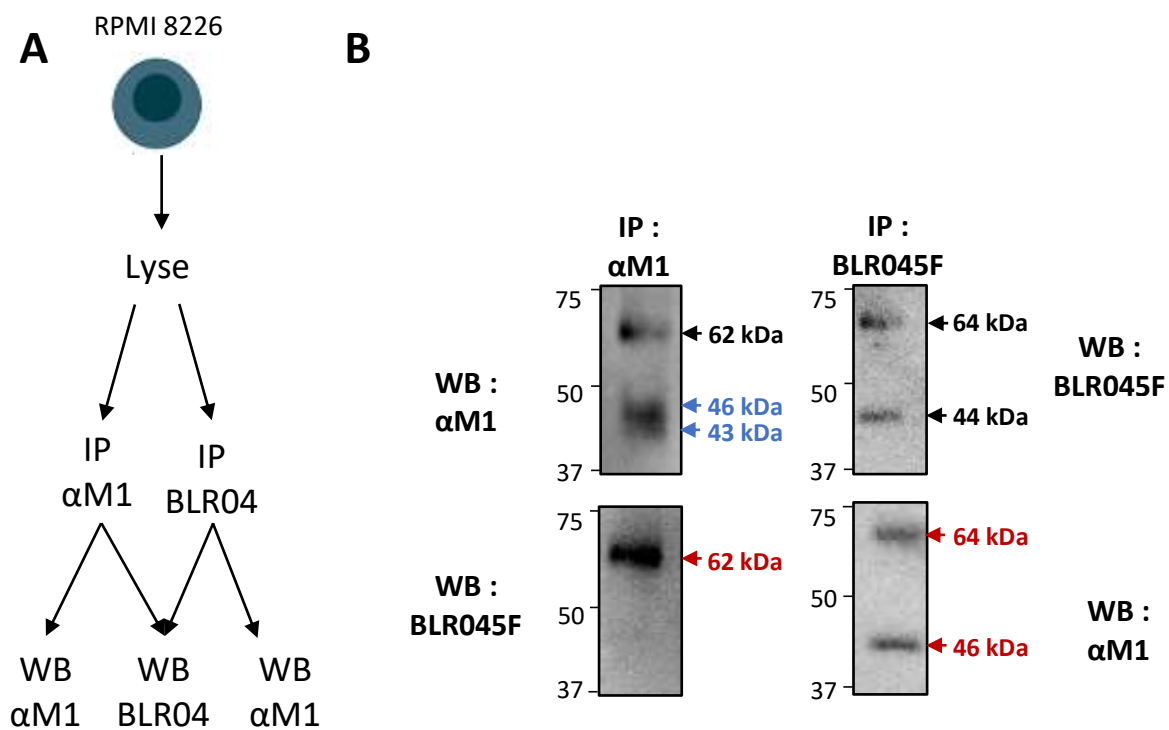


Figure 41 – Etude des isoformes de MAF dans la lignée RPMI 8226.

(A) Stratégie d'immunoprécipitation et de révélation par western blot. (B) Western blot après immunoprécipitation de MAF avec les Ac anti-MAF α M1 ou BLR045F. Les protéines détectées de façon aspécifique sont indiquées en bleu. Les protéines MAF immunoprécipitées et révélées par le même Ac anti-MAF sont indiquées en noir, et celles révélées par détection croisée en rouge. N=3

Lorsque MAF est immunoprécipité avec l'Ac α M1, trois protéines sont révélées par l'Ac α M1 à 43 kDa, 46 kDa et 62 kDa alors qu'une seule à 62 kDa est révélée par l'Ac BLR045F dans l'immunoprécipitat α M1, confirmant que celles à 43 et 46 kDa sont reconnues de manière aspécifique. Seule la protéine révélée à 62 kDa est reconnue par les deux Ac correspond à MAF. Lorsque MAF est immunoprécipité avec l'Ac BLR045F, l'utilisation des deux Ac anti-MAF révèle une isoforme à 64 kDa, ce qui confirme la reconnaissance d'une même isoforme par les deux Ac. Une seconde isoforme de MAF, identifiée à 44 kDa par l'Ac BLR045F et 46 kDa par α M1. Cette isoforme n'est détectée que lorsque MAF est immunoprécipité par BLR045F. L'absence de détection de cette isoforme dans l'immunoprécipitat α M1 pourrait indiquer que l'Ac α M1 a une sensibilité plus faible pour cette isoforme et ne le reconnaît que lorsqu'elle est enrichie par immunoprécipitation.

4. CONCLUSION

L'étude *in silico* a permis de proposer une description plus claire des variants et des isoformes de MAF chez l'Homme que celles proposées jusqu'alors. Toutefois, cette description nécessite encore d'être complétée. En effet, la prédiction de MPT dont certaines sont décrites pour moduler l'activité de MAF a mis en lumière de nouvelles pistes à explorer expérimentalement afin de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'activité de ce FT.

Grâce à cette description et plus spécifiquement celle de la protéine MAF courte codée par le variant MAF_202, nous avons validé plusieurs outils pour la détection de MAF qui sont capables de détecter la protéine native (cytométrie en flux et IP), partiellement et complètement linéarisée (western blot). La validation des Ac par une expression ectopique de MAF dans la lignée HSG a permis de définir les masses moléculaires attendues de MAF. Cependant, ces masses moléculaires sont différentes de celles observées dans les lignées dérivées de B, rendant l'analyse de l'expression de MAF assez complexe par western-blot. Néanmoins, l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires (RT-qPCR, cytométrie et western-blot), nous a permis de conclure à

une absence d'expression de MAF dans la lignée RAMOS et de confirmer sa forte expression dans la lignée de RPMI 8226.

La forte expression de MAF dans les lignées de MM plasmocytaire n'est pas une caractéristique restreinte aux lignées ayant une translocation au niveau du gène *MAF*. Sa forte expression est également décrite dans les lignées LP-1, JIM-3 et OPM-2 issues de MM plasmocytaires qui n'ont pas la translocation t(14 ;16) (Hurt et al., 2004). *A contrario*, l'absence de son expression a été associée à d'autres lignées de LB moins différenciés, issues de lymphome de Burkitt, (DAUDI et RAJI) (Natkunam et al., 2009). En accord avec ces données, nos résultats suggèrent que l'expression de MAF pourrait être associée au stade de différenciation des LB.

PARTIE II : EXPLORATION DE L'EXPRESSION DE MAF DANS LES LB PRIMAIRES HUMAINS

Les études autour de la protéine MAF ont été restreintes aux LT et aux macrophages. Au laboratoire, grâce au travail effectué par le Dr. Grasseau, l'expression de MAF a été étendue aux LBreg. En effet, sa surexpression dans les LBreg comparés LBe1 a suggéré son potentiel rôle dans la fonction régulatrice des LB. Son expression est absente des LB du sang périphérique, mais peut être induite lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* via leur BCR et leur TLR9. Des résultats préliminaires semblaient indiquer que son expression est majoritaire dans des stades avancés de la différenciation des LB.

Ainsi, l'évolution de l'expression de MAF en fonction du stade différenciation a été évaluée dans les LB de sang périphérique et les LB d'amygdale, et confirmée dans un modèle de différenciation *in vitro* des LB de sang périphérique.

1. EXPRESSION DE MAF DANS LES LB PRIMAIRES

1.1. La protéine MAF est faiblement exprimée à l'état basal dans les LB

Dans un premier temps, l'expression des transcrits MAF_201 et MAF_202 a été évaluée par PCR quantitative. Comme présenté dans la **Figure 42**, ces 2 transcrits sont très peu exprimés dans les LB à l'état basal qu'ils soient issus du sang périphérique ou de l'amygdale. Toutefois, l'expression de MAF_202 semble plus importante dans l'amygdale que dans les LB périphériques.

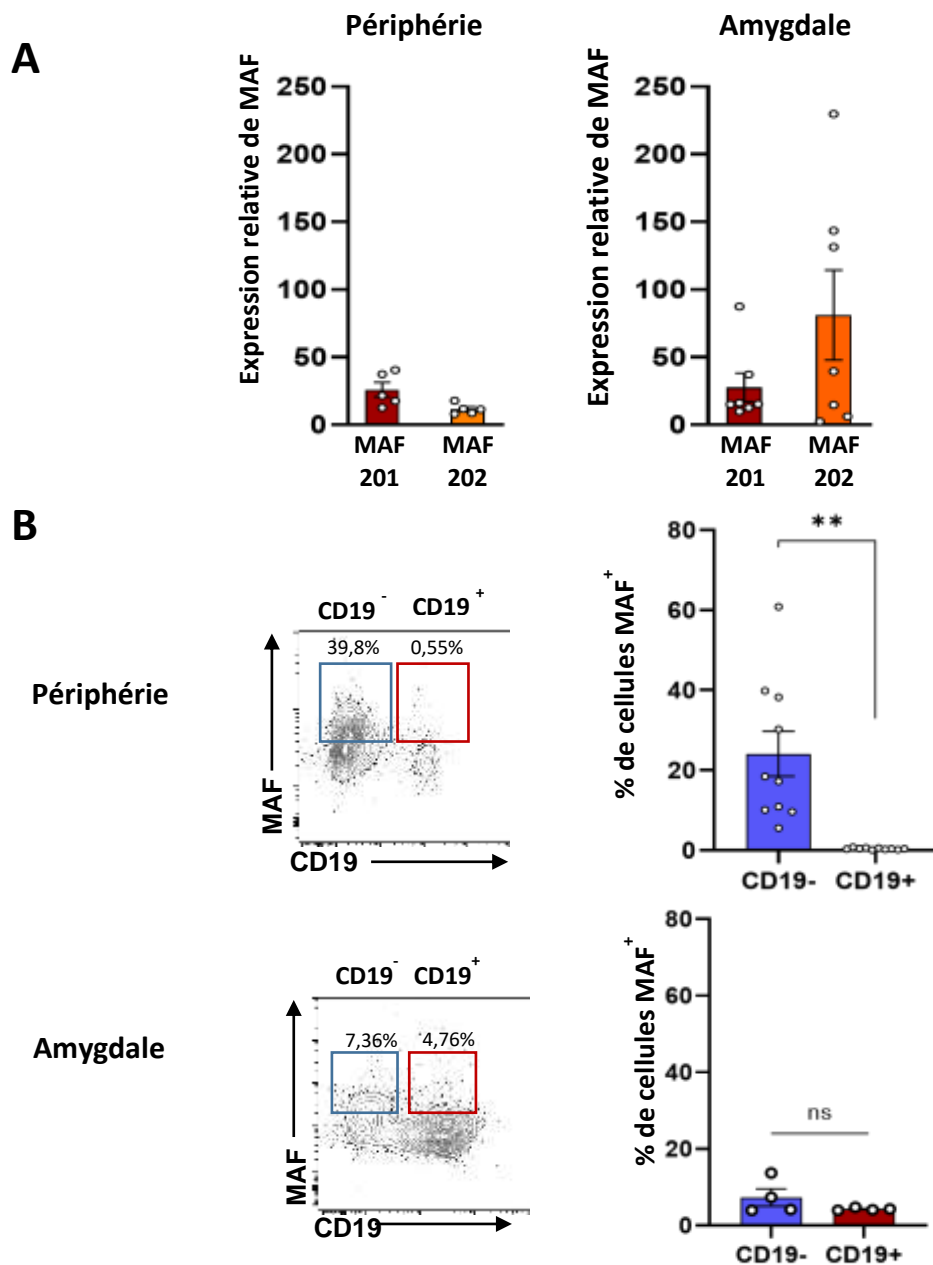


Figure 42 - Etude de l'expression de MAF dans les LB d'amygdale et du sang périphérique.

(A) Quantification des transcrits MAF dans les LB d'amygdale et les LB de sang périphérique.

Une analyse de l'expression relative des variants MAF_201 et MAF_202 dans les LB (GAPDH, gène de référence) a été réalisée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. N= 5 (LB du sang périphérique) et N= 7 (LB d'amygdale).

(B) Expression de la protéine MAF dans les LB d'amygdale et du sang périphérique.

A gauche : Image représentative de l'expression de MAF dans les cellules mononucléées du sang périphérique (en haut) et d'amygdale (en bas). **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les cellules mononucléées non-LB (cellules de sang périphérique, N=10 et cellules d'amygdale, N= 4)

L'expression de la protéine MAF a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant l'Ac anti-MAF T54-853. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les tests statistiques réalisés sont des tests de Wilcoxon (ns= non significatif, ** = p-value < 0,01).

L'expression de MAF a été analysée par cytométrie en flux dans les deux compartiments (**Figure 42**). Très peu de LB expriment MAF qu'ils soient issus du sang périphérique (0,38 % \pm 0,06) ou d'amygdale (4,27 % \pm 0,17).

L'expression des isoformes de MAF a été réalisée par western blot en utilisant les deux Ac anti-MAF préalablement validés (**Figure 43**).

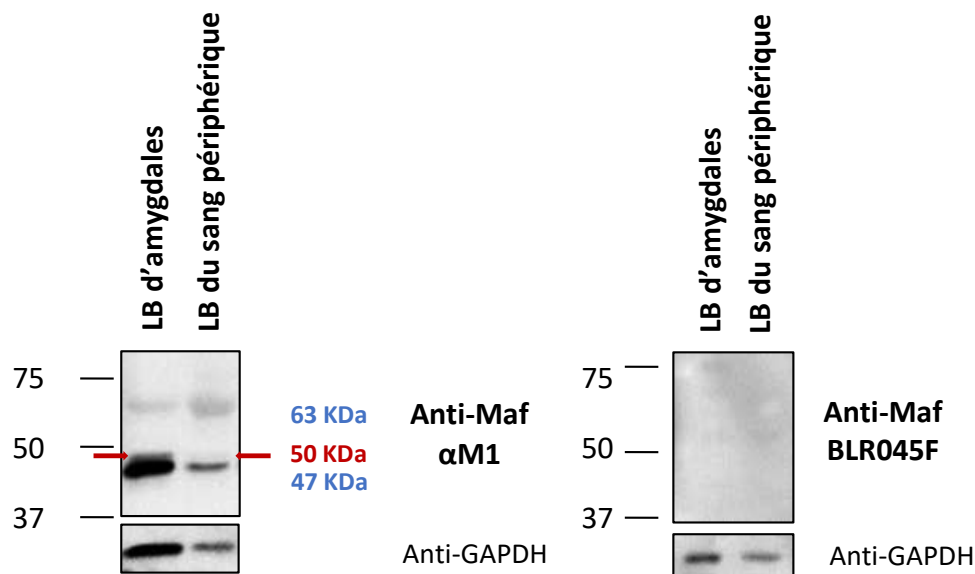


Figure 43 - Expression protéique de MAF dans les LB d'amygdale et du sang périphérique

Les protéines reconnues de façon aspécifique sont indiquées en bleu. La protéine MAF est indiquée en rouge.

En utilisant l'Ac anti-MAF α M1, deux protéines non spécifiques sont révélées à 47 kDa et 63 kDa. Concordant avec les observations en cytométrie en flux, la protéine MAF est détectée très faiblement à 50 kDa dans les LB du sang périphérique alors que son expression est plus forte dans les LB d'amygdale. L'expression de MAF n'est détectable ni dans les B de sang périphérique, ni dans ceux d'amygdales en utilisant l'Ac anti-MAF BLR045F, suggérant que la proportion de LB exprimant MAF est trop faible pour être détectée par cet Ac. L'absence de marquage par l'Ac BLR045F est donc en accord avec les résultats observés en cytométrie.

Ces résultats confirment les données de cytométrie qui mettent en évidence qu'un faible pourcentage de cellules exprime MAF dans les LB à l'état basal quelle que soit leur origine.

1.2. MAF pourrait être exprimé lors de la différenciation terminale des LB en PB

A l'état basal, une faible proportion de LB du sang périphérique et d'amygdale expriment la protéine MAF, suggérant qu'elle soit restreinte à une sous-population de LB. Nous avons analysé l'expression de MAF dans différentes sous-populations de LB issus des deux compartiments (*Figure 44*).

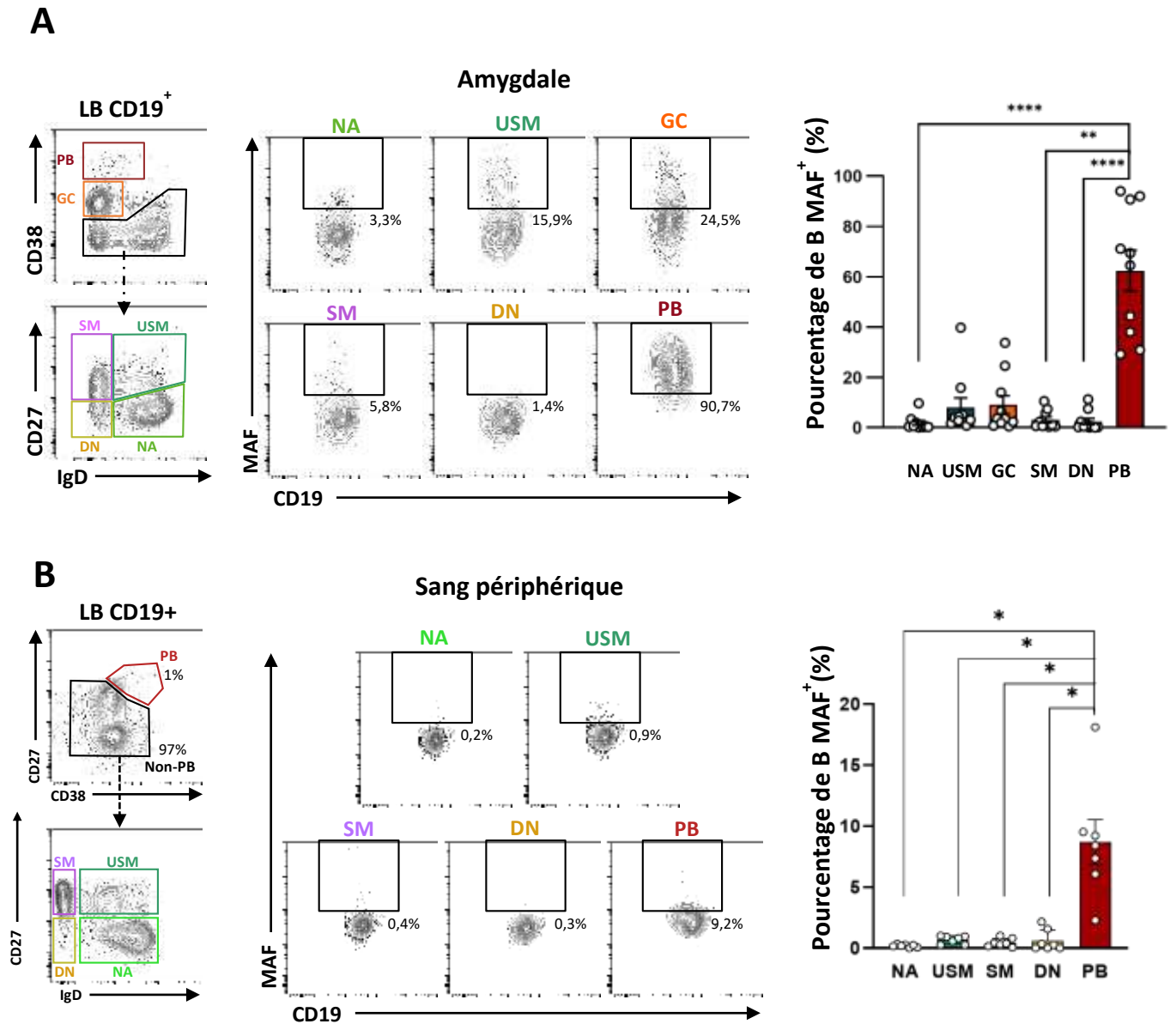


Figure 44 - Etude de l'expression de MAF en fonction du stade de différenciation des LB

(A) Exploration de l'expression de MAF en fonction du stade de différenciation des LB d'amygdales. **A gauche :** Stratégie de sélection permettant d'identifier les sous-populations de LB d'amygdale. **Au milieu :** Images représentatives de l'expression de MAF dans les sous-populations de LB d'amygdales. **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les différentes sous-populations de LB d'amygdales (N=10). Les moyennes \pm SEM des proportions de cellules MAF⁺ sont indiquées sur le graphique à droite.

(B) Exploration de l'expression de MAF en fonction du stade de différenciation des LB de sang périphérique. **A gauche :** Stratégie permettant d'identifier les sous-populations de LB de sang périphérique. **Au milieu :** Images représentatives de l'expression de MAF dans les sous-populations de LB de sang périphérique. **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les sous-populations de LB de sang périphérique (N=7). Les moyennes \pm SEM des proportions de LB exprimant MAF parmi ces sous-populations sont indiquées sur le graphique à droite.

Les tests statistiques réalisés sont des tests appariés de Friedman (ns = non significatif ; *= p-value <0,05 ; ** = p-value < 0,01 et **** = p-value < 0,0001).

Afin de discriminer les LB en fonction de leur stade de différenciation, un ensemble de marqueurs (CD38, CD27, IgD) a été utilisé. Ainsi, nous avons pu évaluer l'expression de MAF dans les LB naïfs (NA, CD27⁻ IgD⁺), mémoires non commutés (USM, CD27⁺ IgD⁺), mémoires commutés (SM, CD27⁺ IgD⁻), mémoires double-négatifs (DN, CD38⁻ CD27⁻ IgD⁻), des centres germinatifs (CG, CD38⁺ CD27^{+/-} IgD⁻) et les plasmablastes (PB, CD38^{fort} CD27^{fort}) (**Figure 44**).

Dans l'amygdale, le pourcentage de LB exprimant MAF est plus élevé dans les USM (8 % ± 3,75), les CG (9,13% ± 3,61) et les PB (62% ± 8) que dans les DN (2,43% ± 1,22) et les NA (1,8% ± 0,92). L'expression de MAF augmente au cours de la différenciation des cellules en PB, suggérant que MAF pourrait être impliqué dans la différenciation plasmocytaire des LB dans l'amygdale.

Nous avons ensuite analysé l'expression de MAF dans LB de sang périphérique (**Figure 44**). Parmi les LB dans le sang périphérique, seuls les PB expriment MAF.

1.3. L'expression de MAF est similaire dans les PB IgM⁺ ou IgM⁻

Etant donné que MAF n'est pas exprimé par tous les PB, nous nous sommes intéressés à son expression dans de deux sous-populations de PB en fonction expression d'IgM par cytométrie en flux: les PB commutés (PB IgM⁻) ou non (PB IgM⁺) (**Figure 45**).

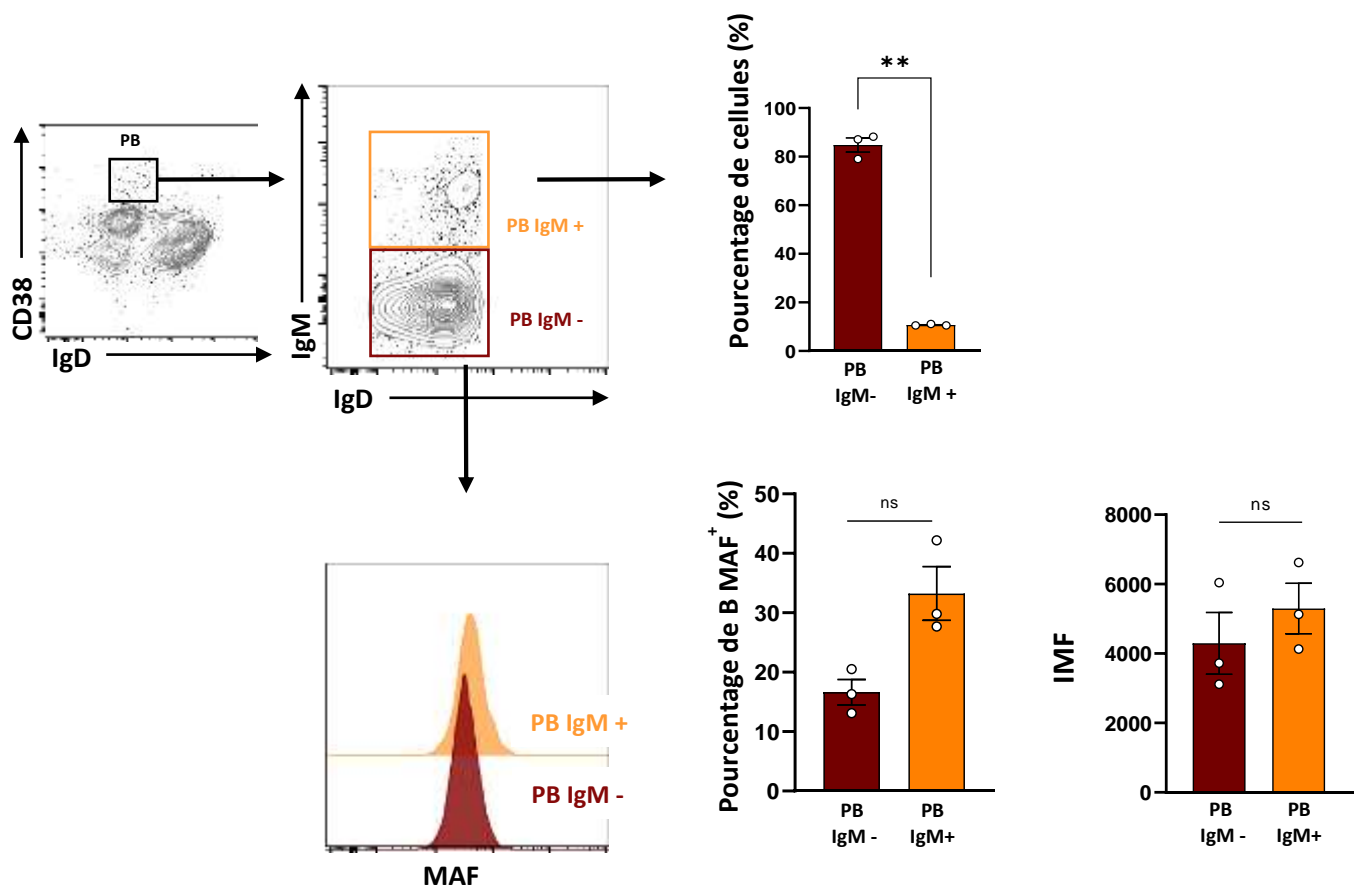


Figure 45 - Expression de MAF dans deux populations de PB de l'amygdale en fonction de leur expression d'IgM.

En haut à gauche : Stratégie de sélection permettant de discriminer les PB IgM⁺ et IgM⁻. **En haut à droite :** Graphique représentant le pourcentage de PB IgM⁺ et IgM⁻ parmi les B d'amygdales (N=3). **En bas à gauche :** Image représentative de l'expression de MAF dans les PB IgM⁺ et IgM⁻. **En bas à droite :** Graphiques représentant l'expression de MAF dans les PB IgM⁺ et IgM⁻ (N=3).

Le test statistique réalisé est un test apparié de Wilcoxon (ns= non significatif ; *** = p-value < 0,001).

Dans un premier temps, nous avons comparés la proportion PB IgM⁺ et IgM⁻ dans les amygdales. Dans les B d'amygdales, la proportion de PB IgM⁻ (94,16 % ± 0,82) est plus élevée que celle de PB IgM⁺ (4,92 % ± 0,69), indiquant qu'il y a plus de PB commutés que de PB non commutés dans l'amygdale.

Nous avons ensuite analysé l'expression de MAF dans ces deux sous-populations. L'expression de MAF est similaire dans les PB IgM⁺ (33,23 % ± 4,52) et les PB IgM⁻ (16,63 % ± 2,14). Les PB expriment MAF quel que soit leur expression d'IgM.

2. EXPRESSION DE MAF AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION TERMINALE DES LB *IN VITRO*

Afin de confirmer si MAF est induit lors de la différenciation terminale des LB en PB, nous avons utilisé un modèle de différenciation des LB *in vitro*, mis en place au sein du laboratoire qui se base sur une activation concomitante du BCR (anti-IgM, anti-IgG et anti-IgA) et du TLR9 par l'utilisation du CpG en présence d'IL-2, d'IFN α ou d'interleukine-21 (IL-21) (Annexe 1).

2.1.L'expression de MAF est augmentée lors de la différenciation terminale des LB *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons validé la génération de PB en réponse à l'activation des LB *in vitro* en présence ou non d'IFN α ou d'IL-21 (**Figure 46**).

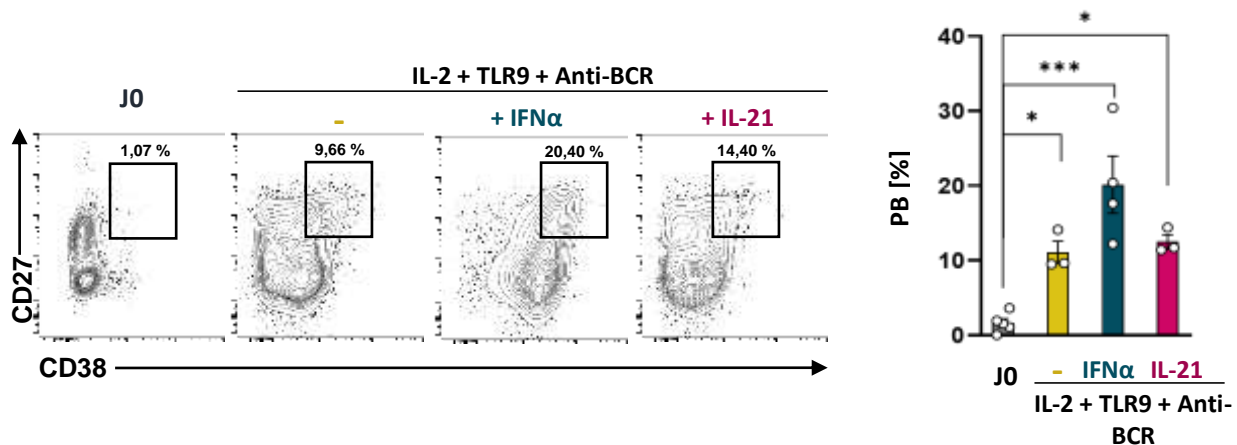


Figure 46 - Etude de la différenciation en PB en réponse au modèle de stimulation *in vitro* des LB.

A gauche : Image représentative de la différenciation des LB en PB en réponse au modèle de stimulation *in vitro*. **A droite :** Graphique représentant la différenciation en PB en réponse au modèle de stimulation *in vitro* (LB J0 : N=5 ; LB stimulés : N=2 ; LB stimulés + IFN α : N=4 ; LB stimulés + IL-21 : N=3).

Les PB sont délimités par un rectangle. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. Le test statistique utilisé est une ANOVA unidirectionnelle (*= p-value < 0,05 et *** = p-value < 0,001).

Après 3,5 jours de stimulation dans les trois conditions, on obtient un enrichissement en PB de la population initiale. En réponse à l'IFN α , l'enrichissement en PB est plus important (20,15 % \pm 3,81) qu'en réponse à l'IL-21 (12,5 % \pm 0,95) ou qu'en absence de ces deux cytokines (11,88 % \pm 2,22).

Nous avons ensuite analysé l'expression de MAF dans les LB stimulés. Nous avons d'abord quantifié l'expression des transcrits MAF_201 et MAF_202 par RT-qPCR dans les LB stimulés (**Figure 47**).

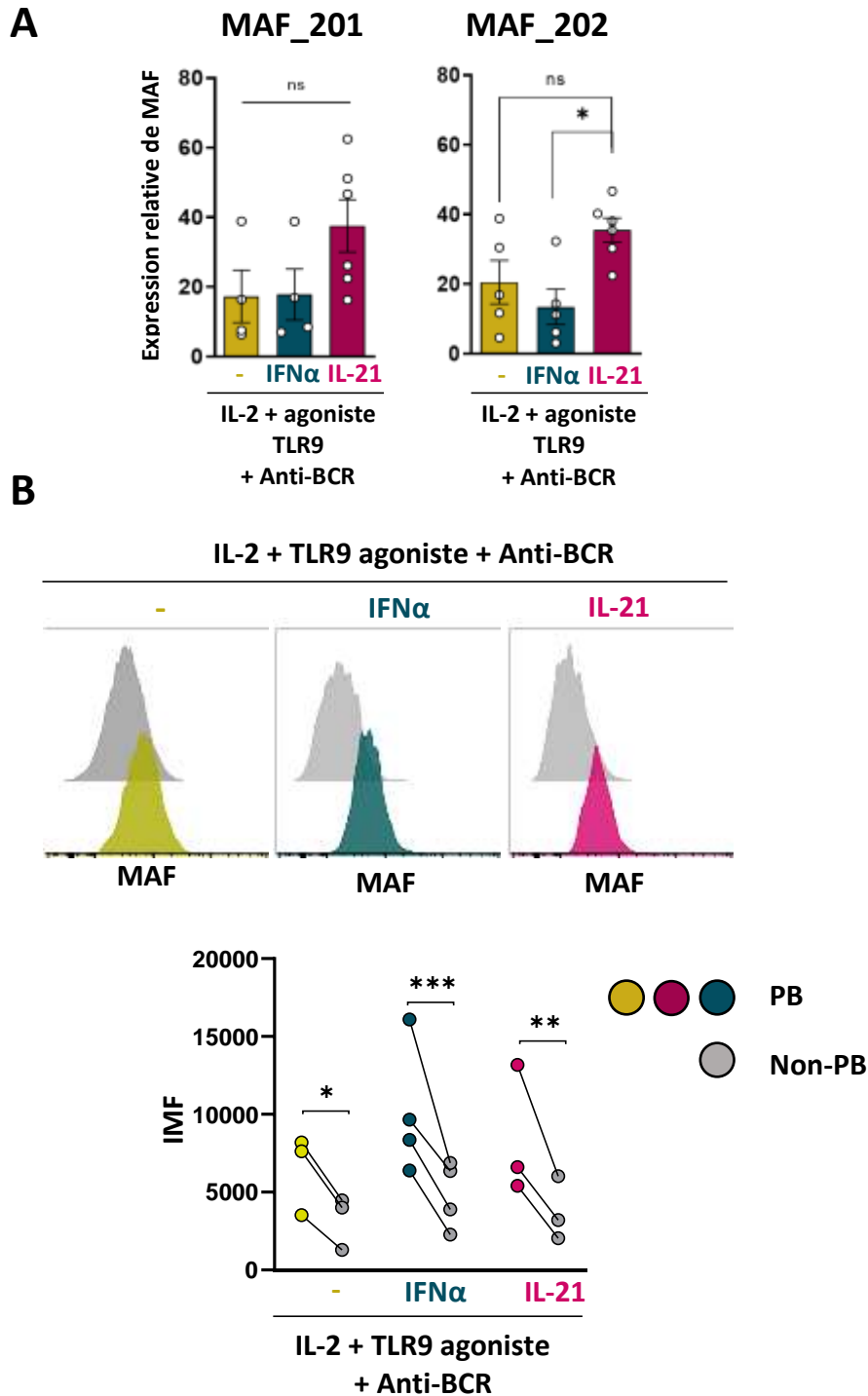


Figure 47 - Etude de l'expression de MAF dans un modèle de différenciation des LB.

(A) Etude de l'expression des transcrits MAF_201 et MAF_202 dans les LB stimulés *in vitro*. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM de l'expression relative de MAF_201 ou MAF_202 dans les LB stimulés par l'IL-2, l'agoniste du TLR9 et les anti-BCR en présence d'IL-21 ou d'IFN α . Le test statistique utilisé est un test apparié de Friedman (* = $p < 0,05$; ns = non significatif). N=5 (LB stimulés), N=5 (LB stimulés + IFN α), N=6 (LB stimulés + IL-21).

(B) Etude de l'expression de MAF dans les PB générés *in vitro*. En haut : Image représentative de l'expression de MAF dans les PB. **En bas :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les PB (LB stimulés : N=3 ; LB stimulés + IFN α : N=4 ; LB stimulés + IL-21 : N=3).

L'expression de MAF est analysée par cytométrie en flux en utilisant l'Ac monoclonal anti-MAF T54-853 et représentée en intensité moyenne de fluorescence (IMF). Le test statistique utilisé est une ANOVA appariée bidimensionnelle (* = p-value < 0,05 ; ** = p-value < 0,01 ; *** = p-value < 0,005). N= 3 (LB stimulés), N=5 (LB stimulés + IL-21), N=4 (LB stimulés + IFN α).

L'expression du transcrite MAF_201 est similaire dans les trois conditions de stimulation. Le transcrite MAF_202 est exprimé plus fortement en réponse à l'IL-21 ($35,53 \pm 3,42$) qu'en réponse à l'IFN α ($13,45 \pm 5,10$) ou qu'en absence de ces deux cytokines ($20,52 \pm 6,23$) dans les LB activés *in vitro* par les signaux IL-2, agoniste du TLR9 et anti-BCR. Ces résultats indiquent que les deux transcrits MAF_201 et MAF_202 sont exprimés en réponse aux signaux activateurs de la différenciation des LB (agoniste TLR9, anti-BCR et IL-2), quelle que la stimulation utilisée.

Nous avons ensuite quantifié l'expression des protéines MAF par cytométrie en flux dans les LB stimulés et avons réalisé une analyse comparative de son expression dans les PB et les autres LB (non-PB) (**Figure 47**). L'expression de MAF est plus importante dans les PB (IMF : $6\,447 \pm 1\,469$) que dans les LB non-PB (IMF : $3\,257 \pm 991$) en réponse aux signaux IL-2, agoniste du TLR9 et anti-BCR, que ce soit en présence ou en absence d'IFN α et d'IL-21.

Les PB générés expriment MAF de façon similaire quelle que soit la stimulation utilisée. Ces données indiquent que la présence d'IFN α ou d'IL-21 n'impacte pas l'expression de la protéine MAF dans les PB contrairement aux différences observées quant à l'expression des transcrits.

2.2. Deux isoformes de MAF sont produites dans le modèle de différenciation *in vitro* des LB

Enfin, nous avons analysé l'expression des différentes isoformes de MAF par western blot lors de la différenciation des LB activés par les signaux TLR9 et BCR en présence ou non d'IFN α ou d'IL-21 (**Figure 48**).

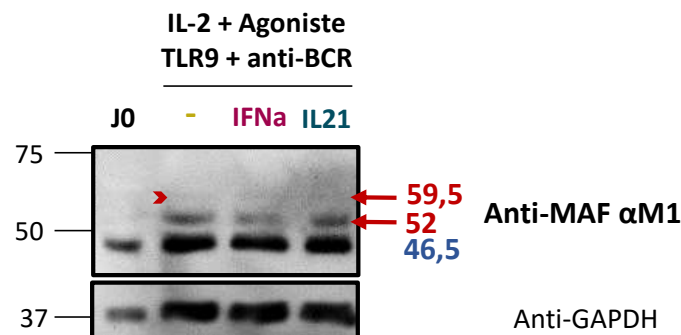


Figure 48 – Etude de l'expression des isoformes de MAF dans un modèle de différenciation des LB *in vitro*.

L'expression de MAF est révélée en utilisant l'Ac anti-MAF α M1. L'expression de la GAPDH est utilisée comme contrôle endogène. Les protéines MAF sont indiquées en rouge et la protéine non spécifique en bleu.

En réponse à l'activation par l'IL-2, les anti-BCR et l'agoniste du TLR9, deux isoformes de MAF sont induites, dont l'une à 52 kDa et l'autre à 59,5 kDa. De façon intéressante, ce sont les deux mêmes isoformes qui sont induites de façon similaire en présence d'IFN α ou d'IL-21 que celles produites par les voies TLR9, BCR et IL-2.

Les masses moléculaires observées de ces deux isoformes suggèrent la présence d'une ou plusieurs MPT.

3. CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression de MAF dans les LB provenant du sang périphérique et d'amygdale. Dans l'amygdale, nous avons montré que l'expression de MAF est augmentée au cours de la différenciation des LB (LB des USM, CG et PB). Dans le sang, son expression n'est observable que dans les PB.

L'utilisation du modèle de différenciation *in vitro* a mis en évidence un enrichissement de l'expression de MAF dans les PB. Deux isoformes de MAF induites lors de la différenciation des B en réponse aux stimulations *in vitro* du TLR9 et du BCR.

En conclusion, les résultats de notre étude indiquent une association entre l'expression de MAF et la différenciation terminale en PB *ex vivo* (dans l'amygdale et le sang périphérique) et *in vitro*, suggérant que MAF pourrait intervenir dans la différenciation terminale ou que son expression serait une conséquence de la différenciation en PB.

PARTIE III : ETUDE DE L'EXPRESSION DE MAF ET DE L'IL-10 DANS LES LB

La relation entre de l'expression de MAF et la production d'IL-10 a été documentée dans les LT et les macrophages et fait l'objet d'une partie de l'article en Annexe 3. Dans les LB, la relation entre la protéine MAF et la production d'IL-10 n'a été que très peu étudiée. Dans un modèle murin, Liu et al. ont montré que les LB stimulés avec du LPS (TLR4) présentent une expression MAF et une production d'IL-10 (Liu et al., 2018). L'utilisation d'un ARN interférant de MAF a conduit à une réduction de la sécrétion d'IL-10. Une seconde étude a montré l'expression de MAF dans des LBreg producteurs d'IL-10 (LB10) murins et humains (Radomir et al., 2021), sans décrire une corrélation entre les deux éléments.

Dans l'optique de comparer l'expression de MAF et la production l'IL-10 dans les LB, nous avons évalué leur expression d'IL-10 dans les deux compartiments précédents (amygdale et sang périphérique).

1. EXPRESSION D'IL-10 DANS LES LB A L'ETAT BASAL

1.1. L'IL-10 est exprimé dans très peu de LB à l'état basal

Afin d'étudier la co-expression de l'IL10 et de MAF dans les LB, nous avons évalué l'expression d'IL-10 dans les LB d'amygdale et du sang périphérique par cytométrie en flux dans les LB (*Figure 49*).

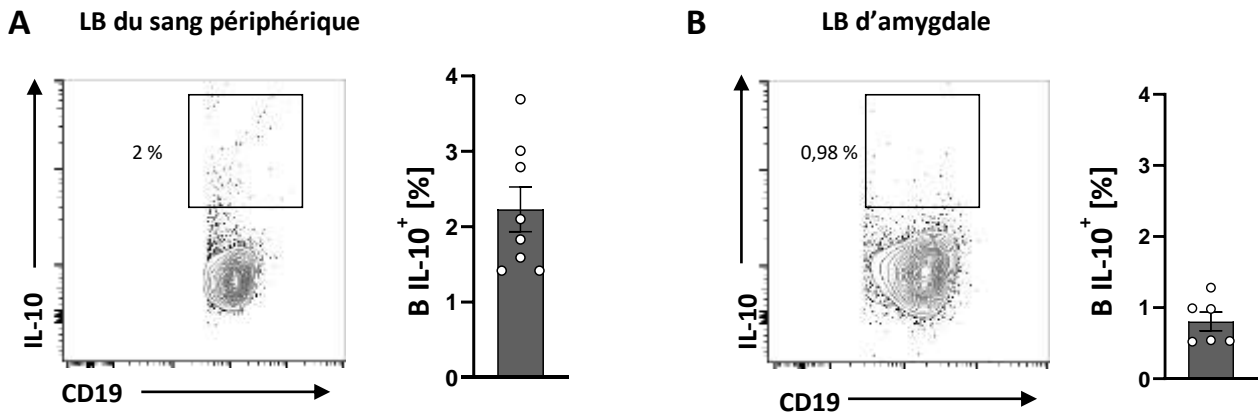


Figure 49 - Etude de la production d'IL-10 dans les LB primaires issus du sang périphérique et d'amygdales

(A) Etude de l'expression d'IL-10 dans les LB du sang périphérique. A gauche : Image représentative de l'expression d'IL-10 dans les LB de sang périphérique. A droite : Graphique représentant l'expression d'IL-10 dans les LB de sang périphérique (N=8).

(B) Etude de l'expression d'IL-10 dans les LB d'amygdales. A gauche : Image représentative de l'expression d'IL-10 dans les LB d'amygdales. A droite : Graphique représentant l'expression d'IL-10 dans les B d'amygdales (N=6).

Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM.

L'IL-10 est exprimé par une très faible proportion de LB du sang périphérique ($2,23 \pm 0,30$) et de LB d'amygdales ($0,80 \pm 0,13$).

1.2. L'IL-10 n'est exprimé que par les PB à l'état basal

Nous nous sommes ensuite demandé si son expression pouvait être liée à un stade de différenciation des B, comme nous l'avons montré pour l'expression de MAF. Nous avons donc procédé à l'analyse de l'expression d'IL-10 dans les sous-populations de LB issus du sang périphérique ou d'amygdales (*Figure 50*) pour lesquelles nous avons montré une expression de MAF (*Figure 44*).

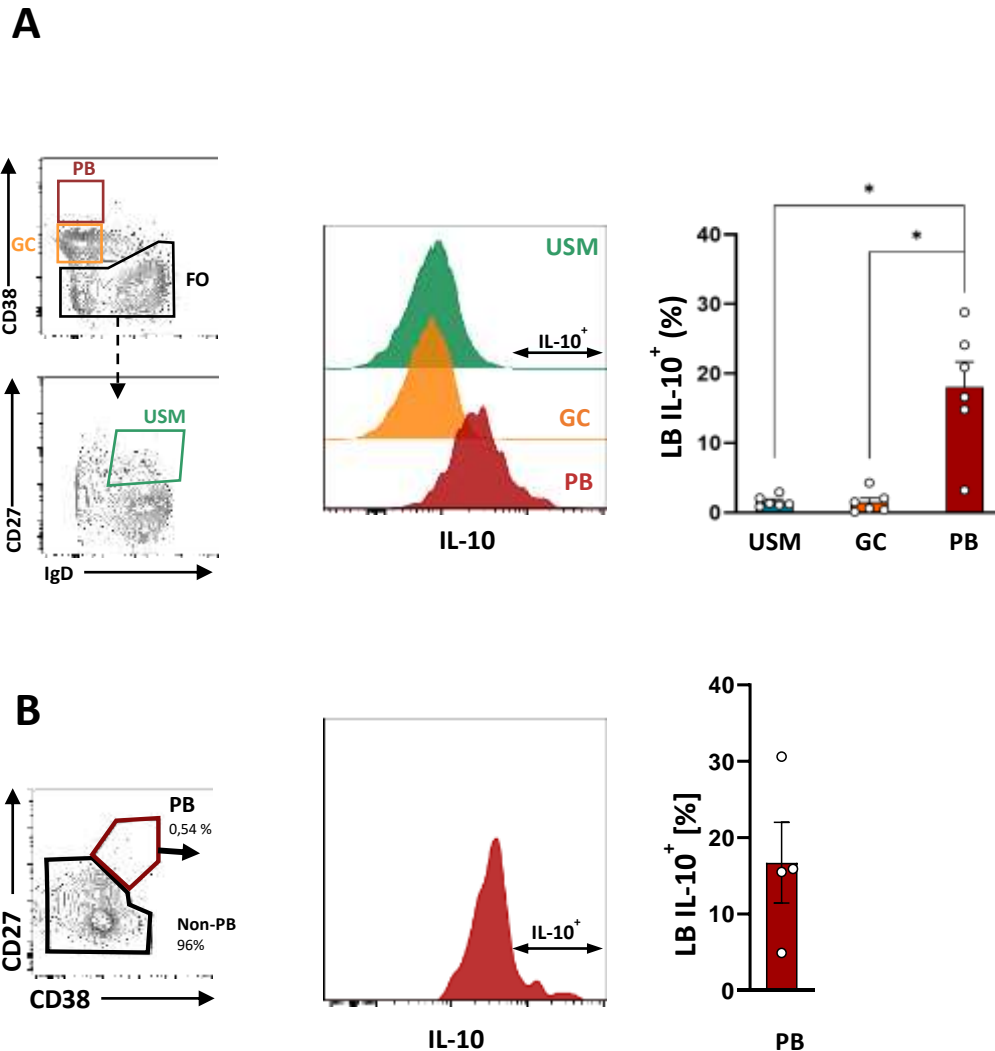


Figure 50 - Etude de l'expression d'IL-10 en fonction du stade de différenciation des LB.

(A) Exploration de l'expression d'IL-10 en fonction du stade de différenciation des LB d'amygdales. **A gauche :** Stratégie de sélection permet d'identifier les sous-populations de LB d'amygdales. **Au milieu :** Images représentatives de l'expression d'IL-10 dans les sous-populations définies pour leur expression de MAF. **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les sous-populations de LB d'amygdales (N=6).

(B) Exploration de l'expression d'IL-10 en fonction du stade de différenciation des LB du sang périphérique. **A gauche :** Stratégie de sélection permettant d'identifier les PB parmi les LB du sang périphérique. **Au milieu :** Image représentative de l'expression d'IL-10 dans les PB du sang périphérique. **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les PB de sang périphérique (N=4).

Les résultats sont représentés en moyenne des pourcentages \pm SEM. Les tests statistiques réalisés sont des tests appariés de Friedman (ns = non significatif, * = p-value < 0,05).

Dans l'amygdale, les PB préalablement montrés comme les producteurs majoritaires de MAF (Partie II), produisent plus d'IL-10 que les autres sous-populations de LB MAF⁺ (amygdale : 18,06% ± 3,62). Dans le sang périphérique, seuls les PB produisent de l'IL-10 (sang : 16,72 % ± 5,28), indiquant une expression concomitante de MAF et d'IL-10. Au regard de la faible expression d'IL-10 à l'état basal, nous avons mis un modèle *in vitro* d'induction d'IL-10 à partir des LB de sang périphérique afin d'évaluer l'expression concomitante de MAF et d'IL-10.

2. MISE EN PLACE D'UN MODÈLE DE LB PRODUCTEURS D'IL-10

Dans la littérature, différentes études ont mis évidence une production d'IL-10 par les LB en réponse à des stimulations du TLR9 par le CpG durant deux jours (Iwata et al., 2011 ; Lighaam et al., 2018). La présence du ligand du CD40 (CD40L) a augmenté la production d'IL-10 par ces LB comparé à une simple stimulation du TLR9 (Iwata et al., 2011). Afin de générer une production d'IL-10 par les LB du sang périphérique, nous avons mis au point un modèle de culture *in vitro* qui consiste en une stimulation avec un agoniste du TLR9 (CpG) en présence d'IL-2 recombinante humaine (rhIL-2) ou d'un anti-CD40.

2.1. Mise en place et validation du modèle *in vitro* de production d'IL-10 par les LB

Dans un premier temps, nous avons vérifié par cytométrie en flux, la production d'IL-10 par les LB en réponse aux stimulations (**Figure 51**).

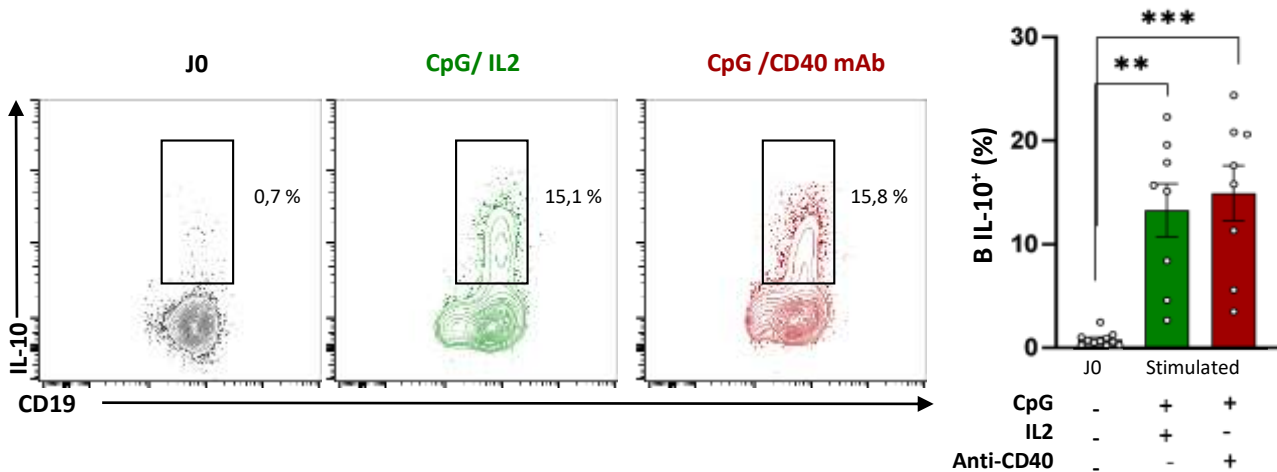


Figure 51 - Validation du modèle *in vitro* de production d'IL-10 par les LB.

A gauche : Images représentatives de l'expression d'IL-10 dans les LB à l'état basal ou stimulés par du CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40. **A droite :** Expression d'IL-10 dans les LB à l'état basal ou stimulés par du CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40 (LB JO : N=11 ; LB stimulés : N=8).

Les résultats sont représentés en moyenne des pourcentages \pm SEM. Le test statistique utilisé est un ANOVA (** = p-value < 0,01 et *** = p-value < 0,001).

Une production d'IL-10 est induite dans les LB en réponse à la stimulation CpG / IL-2 ($13,28 \% \pm 2,54$) et à la stimulation CpG / anti-CD40 ($14,95\% \pm 2,65$) comparés aux LB non stimulés ($0,81 \% \pm 0,19$). Aucune différence dans la production d'IL-10 n'est observée entre la stimulation en présence d'IL-2 et celle en présence d'anti-CD40.

2.2. MAF est induit dans les LB en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40

Dans un second temps, nous avons analysé l'expression des variants MAF_201 et MAF_202 par RT-qPCR (**Figure 52A**) et l'expression protéique globale de MAF par

cytométrie en flux (*Figure 52B*) dans les LB stimulés selon les deux modes de stimulation.

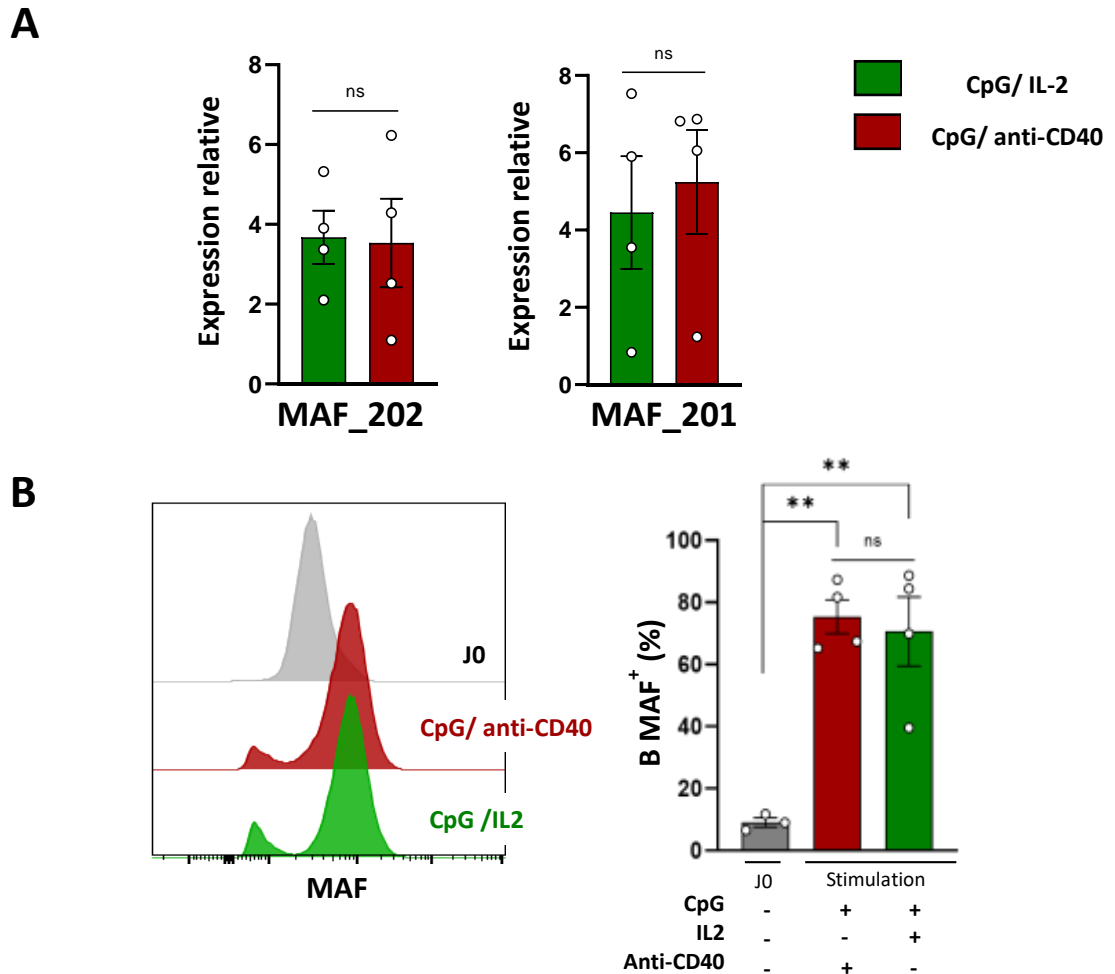


Figure 52 - Evaluation de l'expression de MAF dans les LB stimulés par le CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.

(A) Etude de l'expression des variants MAF_201 et MAF_202 dans les LB en réponse à la stimulation par un agoniste du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM (N=4). Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon (ns = non significatif).

(B) Etude de l'expression de la protéine MAF dans le modèle de production d'IL-10 par les LB. A gauche : Image représentative de l'expression de MAF dans les LB stimulés par du CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40. **A droite :** Graphique représentant l'expression de MAF dans les LB à l'état basal ou stimulés par du CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40 (LB J0 : N=3 ; LB stimulés : N=4).

L'expression de MAF est représentée en moyenne \pm SEM. Le test statistique utilisé est une ANOVA (** = p-value < 0,01 ; ns = non significatif).

Les transcrits MAF_201 sont exprimés de façon similaire en réponse à la stimulation par le CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40. L'analyse par cytométrie en flux a mis en évidence une induction de l'expression de MAF dans les LB en réponse à la stimulation par le CpG en présence d'IL-2 (70,60 % \pm 11,11) ou d'anti-CD40 (75,37 % \pm 5,38) comparés aux LB non stimulés (9,06 % \pm 1,48).

Ces résultats indiquent une concomitance entre l'induction d'IL-10 et de MAF par les LB en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou de CD40.

Afin de déterminer s'il y a une corrélation entre l'expression de MAF et d'IL-10, nous avons analysé l'expression de MAF parmi les LB producteurs d'IL-10 (LB IL-10⁺) ou non producteurs d'IL-10 (LB IL-10⁻) générés en réponse à ces deux stimulations (**Figure 53**).

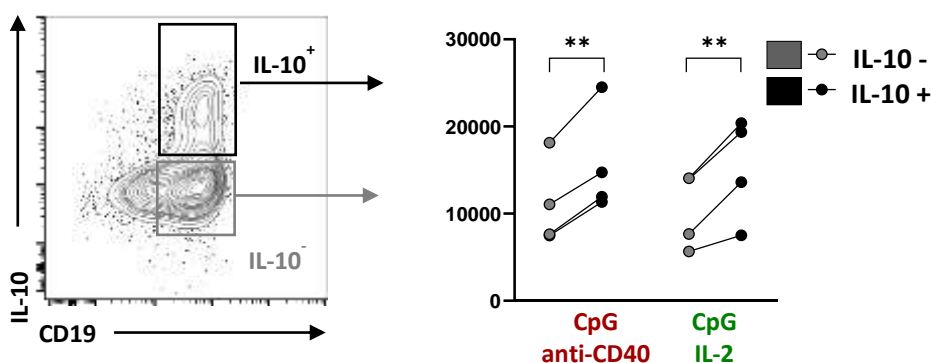


Figure 53 - Etude de l'expression conjointe de MAF et d'IL-10 dans les LB en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.

A gauche : Stratégie de sélection permettant d'identifier les LB producteurs d'IL-10 (IL-10⁺) et non producteurs d'IL-10 (IL-10⁻). **A droite :** Graphique représentant l'intensité de fluorescence (IMF) de MAF dans les LB IL-10⁺ et IL-10⁻ générés en réponse à la stimulation du TLR9 en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40 (CpG/ IL-2 : N=4 ; CpG /anti-CD40 : N=5).

Le test statistique réalisé est une ANOVA bidirectionnelle appariée (** = p-value < 0,01).

Les LB IL-10⁺ présentent une expression significativement plus importante de MAF que les LB IL-10⁻. L'expression de MAF n'est pas restreinte aux LB IL-10⁺, indiquant que sa seule expression n'induit pas obligatoirement une production d'IL-10 par les LB.

2.3. Deux isoformes de MAF sont induites en réponse à la stimulation du TLR9 par le CpG en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40

En parallèle, nous avons analysé l'expression de MAF par western blot afin d'identifier les isoformes de MAF induites dans les deux modèles. (**Figure 54**).

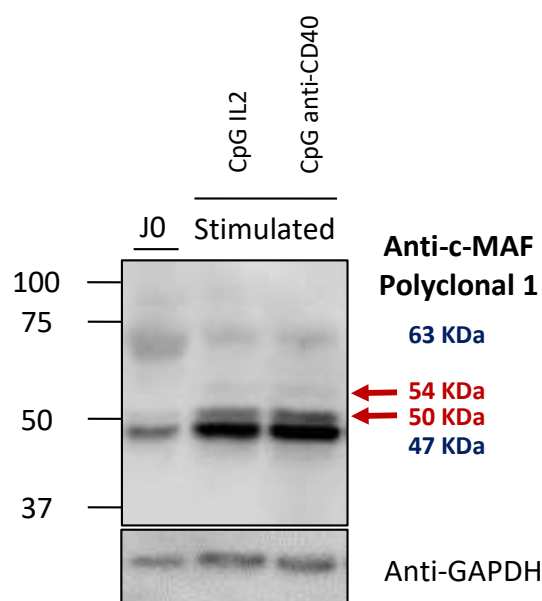


Figure 54 - Etude de l'expression des isoformes de MAF dans un modèle de production *in vitro* d'IL-10 par les LB.

Les protéines MAF sont indiquées en rouges et les protéines non spécifiques, en bleu.

En réponse aux deux modes de stimulation des LB (CpG / anti-CD40 et CpG / IL-2), deux isoformes de MAF de 50 kDa et 54 kDa sont induites. L'isoforme de MAF à 50 kDa, faiblement exprimée à l'état basal dans les LB, est fortement augmentée en réponse aux stimulations des LB (**Figure 54**). Une autre isoforme de MAF de 54 kDa, non présente dans les LB à l'état basal, est induite en réponse aux deux stimulations. Ces

deux isoformes de MAF sont induites de façon similaire en présence d'IL-2 ou d'anti-CD40.

3. CONCLUSION

A l'état basal, notre étude a montré une concordance entre l'expression de MAF et la production d'IL-10 uniquement dans les PB *ex vivo* quelle que soit leur origine (amygdale et sang périphérique). Etant donné la faible expression d'IL-10 à l'état basal, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de production d'IL-10 par les LB qui a confirmé une co-induction de MAF et d'IL-10 en réponse aux stimulations. Malgré un enrichissement de l'expression de MAF dans les LB IL-10⁺, son expression dans les LB IL-10⁻ suggère que la relation entre l'expression de MAF et la production d'IL-10 dans les LB pourrait être bien plus complexe que dans les autres cellules immunitaires et qu'elle nécessitera d'autres approches expérimentales afin de la caractériser.

DISCUSSION

1. VALIDATION DES AC ANTI-MAF

Afin d'étudier MAF dans les LB, nous souhaitons utiliser des Ac *via* deux techniques différentes : la cytométrie en flux et le western blot. Lors de notre étude pilote de MAF, nous nous sommes inquiétés de la spécificité de ces Ac. En effet, toutes les interprétations de cette étude reposent sur la spécificité des anticorps anti-MAF utilisés, BLR045F et plus précisément, α M1 qui est utilisé dans l'exploration des LB primaires.

Au cours de la dernière décennie, un nombre étonnamment élevé d'articles ont dénoncé un défaut de spécificité des Ac (Herrera et al, 2012 ; Gilda et al., 2015 ; Weller et al., 2016 ; Marchalant et al., 2014). Afin de valider ou d'invalider la spécificité, le groupe de travail international pour la validation des Ac (IWGAV) préconise l'utilisation de stratégies pour optimiser la validation, telles que l'expression ectopique de la protéine cible dans une lignée qui ne l'exprime pas à l'état basal, l'expression d'une protéine recombinante codant une étiquette (hémagglutinine (HA), histidine, FLAG), la détection de la protéine cible par deux Ac dirigés contre des épitopes différents de la protéine, l'évaluation de la concordance entre la détection par Ac et par des techniques indépendante des Ac (spectrométrie de masse (MS) ou expression des transcrits) ou encore l'analyse par MS des protéines reconnue par un Ac (Edfors et al., 2018).

1.1. Validation par une expression ectopique dans une lignée qui n'exprime pas MAF

Au cours de l'étude, nous avons mis en place une méthode de validation des anticorps anti-MAF qui fait partie des stratégies proposées par Uhlen et al., *via* une expression de la protéine MAF courte taguée par l'HA par une lignée qui ne l'exprime pas naturellement, ici la lignée HSG afin d'évaluer la spécificité de plusieurs Ac anti-MAF par western blot (BLR045F, α M1 et α M3) (Uhlen et al., 2016). Cela nous a permis de comparer le profil de détection des Ac anti-MAF à celui de l'Ac anti-HA dans les HSG

transfectées avec le plasmide pMAF202-HA. Sur 3 Ac anti-MAF, seul l'Ac BLR045F a présenté un profil de détection uniquement dans les cellules transfectées par le plasmide pMAF202-HA, mais aussi équivalent à celui de l'Ac anti-HA (**Figure 37**). En effet, l'Ac α M1 et l'Ac α M3 ciblent d'autres protéines que MAF dans les cellules transfectées avec le plasmide vide. Cette stratégie met en évidence la difficulté de deux-tiers des Ac sur à cibler uniquement la protéine MAF courte surexprimée dans la lignée HSG et remet en question leur spécificité et les résultats obtenus avec l' α M1 dans les primaires. Afin de confirmer les résultats de cette stratégie, nous avons décidé de comparer les profils de détection des Ac à une méthode indépendante des Ac.

1.2. Comparaison des profils de détection des Ac à une méthode indépendante des Ac (RT-qPCR)

A chaque étape de notre étude, la détection de MAF par western-blot a toujours été réalisée en parallèle d'une quantification des transcrits. Pour cette stratégie, il est conseillé d'utiliser plusieurs lignées ayant de fortes variations d'expression de la protéine cible (Edfors et al., 2018) telles que les lignées RAMOS et RPMI 8226. En considérant le marquage par l'Ac BLR045F, son absence de détection de MAF dans les RAMOS correspond à l'absence d'expression des transcrits MAF_201 et MAF_202 (**Figure 29 ; Figure 40**). De même, la forte expression des transcrits MAF dans la lignée RPMI 8226 concorde avec celle de 2 protéines, qui sont absentes de la lignée RAMOS. Cette concordance n'est pas observée avec l'Ac α M1, ce qui suggère la reconnaissance aspécifique des protéines à 46 et 49 kDa et confirme l'invalidation de cet Ac. Cette approche se base sur l'hypothèse que les niveaux d'ARNm et les niveaux de protéines correspondant sont corrélés à l'état basal. Cependant il est essentiel de rappeler que souvent, les niveaux d'ARNm ne correspondent pas aux niveaux de protéines, de sorte que des comparaisons directes entre ces deux variables peuvent ne pas être applicables (Liu et al., 2016 ; Edfors et al., 2016). En définitive, le profil de détection des Ac devrait être préférentiellement comparé à un profil de protéomique (MS).

1.3. Validation par l'utilisation de deux anticorps indépendants

Parmi les autres stratégies de validation des Ac, Cernecka et al. proposent que la preuve la plus convaincante d'une reconnaissance spécifique est un marquage de la protéine cible par deux Ac dirigés contre des épitopes distincts de la protéine cible (Cernecka et al., 2012). En révélant par western-blot des immunoprécipitats de l'Ac BLR045F ou α M1, nous avons confirmé la détection d'autres protéines par l' α M1 qui n'était pas reconnues par l'Ac BLR045F dans la lignée RPMI 8226 (**Figure 41**), indiquant un manque de spécificité de l'Ac α M1.

Pourtant le manque de spécificité de l'Ac α M1 dans les lignées n'implique pas obligatoirement une reconnaissance aspécifique dans les LB primaires. Selon Uhlen et al., il est incorrect d'utiliser les résultats de validation d'un Ac dans des cellules particulières pour prouver qu'il a une spécificité équivalente dans d'autres cellules (Uhlen et al., 2016), indiquant que ce défaut de spécificité pourrait être propre à la lignée RPMI. En effet, lorsque cette même méthode est utilisée à partir de lysats de LB d'amygdale, les 3 protéines immunoprécipitées par α M1 sont révélées par l'Ac BLR045F dans les LB d'amygdales mais ne sont pas immunoprécipitées par celui-ci (**Figure 55**).

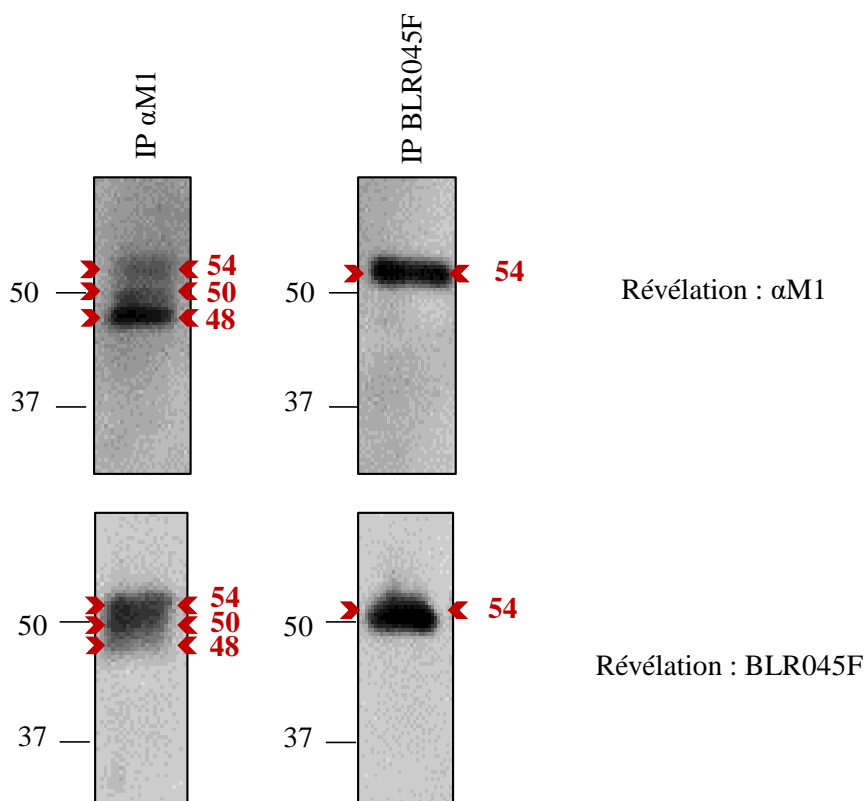


Figure 55 – Evaluation de la spécificité de détection des Ac anti-MAF BLR045F et α M1 dans les LB d'amygdale. N=3

La détection par deux anticorps anti-MAF indépendants illustre une différence de spécificité de détection de MAF par l'Ac α M1 entre les lignées dérivées de LB et les LB primaires et confirme celle de l'Ac BLR045F.

1.4. Validation par MS

Plusieurs études dont celle de Pillai-Kastoori et al. conseillent de coupler le western-blot à une stratégie indépendante telle que la MS pour permettre une validation plus robuste des Ac (Pillai-Kastoori et al., 2020). Ici, après l'immunoprécipitation (IP) par l'Ac BLR045F, nous avons séparé sur gel d'électrophorèse les protéines contenues dans l'immunoprécipitat et analysé la bande révélée par les 2 Ac à 54 kDa par MS (**Figure 56**). Cette analyse a mis en évidence la présence de peptides associés à des protéines du cytosquelette ou impliquées dans le processus de glycolyse mais n'a pas identifié la présence de MAF. Malgré une récente étude qui démontre une implication de MAF dans la glycolyse des macrophages associés aux tumeurs (Liu et al., 2020), l'absence de détection de la protéine interroge sur la spécificité de l'Ac BLR045F, pourtant validé par les 3 autres stratégies.

Néanmoins, malgré l'efficacité de cette méthode lorsqu'elle est combinée avec des Ac (IP-MS), sa fiabilité peut être remise en question pour les protéines ayant des poids moléculaires autour de 50 kDa. Sachant que le protéome humain contient une majorité de protéines autour de ce poids moléculaire, Edfors et al. indiquent que les protéines identifiées dans cet intervalle sont davantage susceptibles de correspondre à des protéines appartenant à un complexe ou détectées de façon aspécifiques qu'à des protéines détectées de façon spécifique. Etant donné son poids moléculaire observé à 54 kDa, l'identification par MS pourrait donc ne pas être adaptée à la protéine MAF.

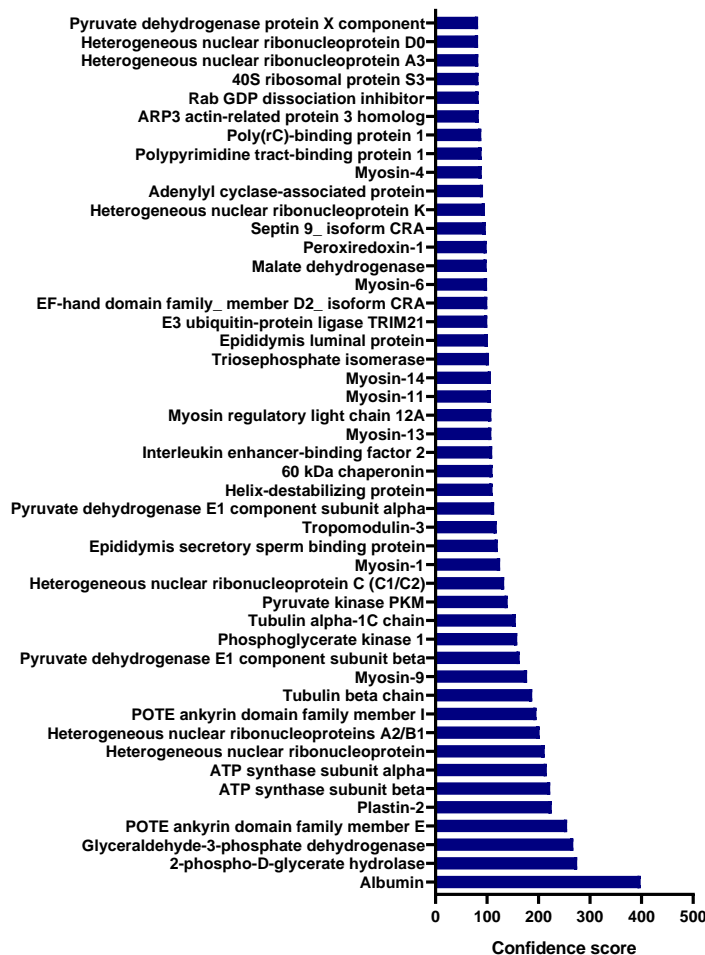


Figure 56 - Identification des protéines ciblées par l'Ac BLR045F par MS dans les LB d'amygdale

L'utilisation de plusieurs stratégies définies comme les piliers de la validation des Acs pour leur utilisation en western-blot dont les résultats sont récapitulés en **Figure 57**, confirment la spécificité de détection de l'Ac BLR045F dans les lignées. Cependant, l'analyse par MS révèle une incertitude sur la spécificité de cet Ac à détecter MAF dans les LB d'amygdale. En parallèle, l'ensemble de ces stratégies ont invalidé l'Ac α M1 dans les lignées. En revanche, sa spécificité a été validée par une stratégie dans les LB d'amygdales.

Avec une seule stratégie qui valide l'Ac α M1 dans les LB primaires, il pourrait sembler prématuré de confirmer ou d'invalider sa spécificité de détection, impliquant que l'ensemble des stratégies de validation devraient aussi être appliquées aux LB primaires. Bordeaux et al. indiquent qu'une seule stratégie de validation n'est pas suffisante et

qu'une combinaison des stratégies doit être utilisée pour la validation spécifique au test d'un Ac (Bordeaux et al., 2010). En revanche, Edfors et al. précisent qu'un Ac est considéré comme spécifique dans un contexte précis lorsqu'au moins une des stratégies le valide. Avec la mise en place de ces stratégies « piliers », il devient utile de se demander si les résultats de certaines stratégies prévalent sur d'autres, si on estime la spécificité de l'Ac au nombre de stratégies qui donnent le même résultat ou si la validation par une seule stratégie peut garantir une détection spécifique de l'Ac.

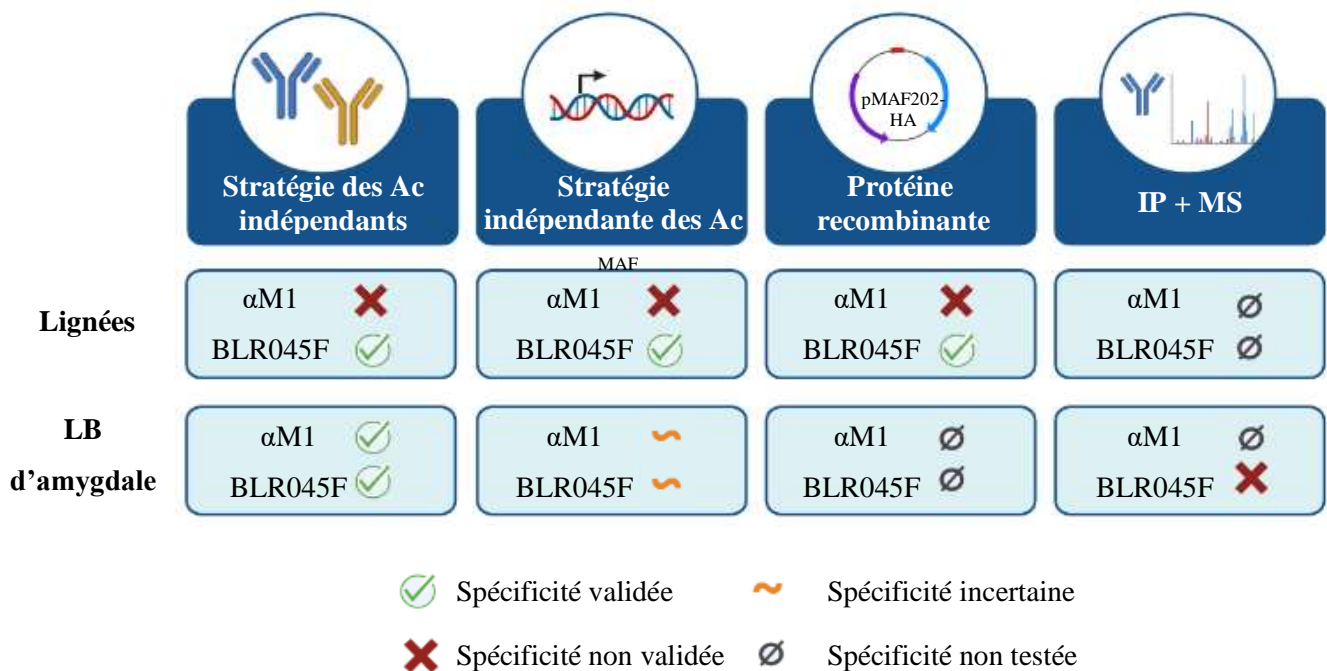


Figure 57 - Stratégies et résultats de la validation renforcée des Ac αM1 et BLR045F dans les lignées et les LB d'amygdales.

1.5. Un défaut de spécificité des Ac lié à la reproductibilité du western blot ?

Parmi les études qui utilisent l'Ac αM1 en western-blot, six études sur sept ne détaillent aucune information concernant la composition des tampons, la température et le pH utilisé dans les différentes étapes du western-blot ni la durée du marquage par l'Ac ou encore la taille des bandes révélées (Wu et al., 2018 ; Hewitson et al., 2020 ; Xu et al., 2020 ; Sun et al., 2021 ; He et al., 2020 ; Chen et al., 2019 ; Wang et al., 2017). Parmi ces études, cinq d'entre-elles quantifient l'expression de MAF dans la lignée RPMI 8226 où seules deux protéines (entre 40 et 55 kDa) sont révélées sans donner aucune

information concernant leurs conditions de western blot (Xu et al., 2020 ; Sun et al., 2021 ; He et al., 2020 ; Chen et al., 2019 ; Wang et al., 2017), empêchant donc la reproductibilité de leurs travaux et une comparaison entre leurs résultats et les nôtres où trois protéines sont révélées dans cette même lignée. En effet, les conditions dans lesquelles sont réalisées ces étapes cruciales peuvent moduler la fixation de l'anticorps sur sa cible et augmenter la fixation aspécifique d'autres protéines. Il est donc possible que la détection aspécifique de la bande à 46 kDa dans notre étude, résulte des conditions du western-blot et non de la capacité de l'Ac à lier la bonne protéine. A cause de l'impact de ces paramètres sur la validation des Ac, Gilda et ses collaborateurs ont proposé en 2015, que tous les auteurs rédigent la partie « matériels et méthodes » du western blot selon un « Western Blotting Minimal Reporting Standard » (WBMRS) qui détaille de façon plus approfondie les compositions des tampons, les températures et pH durant les différentes étapes du western blot afin d'améliorer la reproductibilité entre les laboratoires indépendants (Gilda et al., 2015). Cependant, il existe encore de nombreuses études qui ne détaillent pas leurs méthodes de western-blot comme l'illustre ces 7 études autour de la protéine MAF.

Afin d'augmenter la reproductibilité, la transparence et la rigueur des études, plusieurs journaux recommandent l'utilisation de RRID (Research Resource Identifier) par les auteurs mais aussi par les fournisseurs, pour une identification claire des Ac dans les différentes études (Bandrowski et al., 2015 ; Bandrowski et Martone, 2016). Après une recherche sur la plateforme « RRID Portal » (<https://scicrunch.org/resources>), nous avons identifié trois anticorps anti-MAF sur les quatre utilisés : AB_2793713 (α M2, *Active Motif*), AB_2610056 (α M3, *Invitrogen*) et AB_2891844 (BLR045F, *Bethyl Laboratories*). Seul l'Ac α M1 (*ProteinTech*) ne possédait pas encore d'identifiant sur cette plateforme. Par conséquent, nous l'avons enregistré sous le numéro AB_10863127 afin de contribuer à la reproductibilité de nos résultats.

1.6. Impact de la conformation spatiale de la protéine

En plus d'un défaut de reproductibilité, d'autres paramètres dans la conception des Ac peuvent impacter leur reconnaissance de la cible contre laquelle ils ont été générés. De

nombreux sites de MPT ont été décrits (*Figure 10*) et prédits sur la séquence de MAF (*Figure 23, Figure 24, Figure 25, Figure 26*). La présence de ces MPT au niveau des épitopes reconnus par les Ac pourraient les rendre inaccessibles et empêcher leur détection. Dans le cas de l'épitope ciblé par l'Ac α M3, cette région de la protéine MAF est sujette à différentes MPT (sumoylation, phosphorylation, ubiquitination, glycosylation). Il pourrait donc exister des différences majeures entre la protéine finale et le peptide synthétique contre lequel l'Ac a été généré notamment au niveau de la conformation spatiale mais aussi des charges de la protéine, rendant l'épitope inaccessible. Gilda et al. suggèrent que l'inexactitude de détection des Ac pourrait être plus importante lorsqu'il sont dirigés contre des épitopes complexes, contenant des MPT telles que l'ubiquitination (Gilda et al., 2015). Par conséquent, si les sites prédictifs d'ubiquitination sont avérés, ils pourraient compromettre la reconnaissance de la protéine MAF. Cependant, il est important de noter que ces sites ont été prédits sur des régions communes aux autres protéines MAF longues, disqualifiant ainsi les Ac dirigés contre ces régions.

Compte-tenu de l'importance que MAF pourrait avoir dans les LB, il est primordial de pouvoir le détecter spécifiquement. Si la validation des Ac reste un problème important dans la conception des études, l'utilisation des stratégies renforcées de validation, du WBMRS et de RRID permettra à l'avenir une meilleure reproductibilité des western-blots et une validation renforcée des Ac. L'ensemble des stratégies de validation des Ac restent à être appliquées aux Ac BLR045F et α M1 dans les LB primaires, ce qui permettra une validation plus robuste de ces outils avant de pouvoir interpréter les résultats obtenus par western-blot. En plus de l'étude de l'expression de MAF dans les LB, la validation des Ac permettra d'étudier les isoformes de MAF induites par des MPT ou encore les voies de signalisation impliquées dans son induction.

2. MAF EST-IL IMPLIQUÉ DANS LA DIFFÉRENCIATION TERMINALE DES LB ?

La différenciation plasmocytaire est caractérisée par l'augmentation des FT IRF4 et BLIMP-1 (codé par *PRDMI*) et la diminution de BCL6 et PAX5 (Shi et al., 2015). De façon intéressante, l'expression de MAF dans les LBe2/LBreg induite de façon concomitante à celle d'IRF4 et de BLIMP-1, indiquant que les LBe2/LBreg pourraient correspondre à des PB régulateurs (Michée-Cospolite et al., 2022). Au cours de notre étude, l'analyse de l'expression de MAF dans les LB a révélé que son expression est enrichie dans les PB comparés aux LB moins différenciés (**Figure 44**). Concordant avec nos résultats, Kassambara et al. ont mis en évidence une surexpression de l'expression de FT non caractérisés dans la différenciation des LB, tel que MAF dont l'expression augmente entre le stade pré-PB et le stade PC, comparés aux Bmem (Kassambara et al., 2021). L'induction concomitante de MAF et BLIMP-1 dans les LB suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre l'expression de MAF et la différenciation terminale des LB, et potentiellement les FT qui la régulent. Cependant, la nature de ce lien reste à être définie.

2.1. MAF et l'IRF4 s'induisent mutuellement

Dans les LT et les macrophages, quelques études décrivent des interactions entre l'IRF4 et MAF. Dans les macrophages dérivés de la MO, la délétion du gène *MAF* conduit à une diminution de l'expression d'*IRF4*, indiquant que MAF favorise l'expression d'*IRF4* (Liu et al., 2020). En effet, MAF est capable de se fixer sur le promoteur de l'*IRF4* dans les lymphocytes LT (Sahoo et al., 2015). Cependant, la fixation de MAF seul n'est pas capable d'activer la transcription de l'*IRF4*. Sa co-fixation avec IRF4 induit la transactivation de son promoteur de manière autocrine. En plus de confirmer une interaction directe entre MAF et l'IRF4, ces données suggèrent que ces deux FT peuvent coopérer ou former un complexe pour transactiver leur cible. Dans les LTh17 qui n'expriment pas le gène *RASA3* (impliqué dans la balance du programme moléculaire entre LTh17 et LTh2), l'absence d'expression d'*IRF4* par shRNA conduit à une diminution des gènes associés aux LTh2, incluant *MAF* (Wu et al., 2018). Par

ailleurs, la transfection de LT CD4⁺ par un vecteur contenant l'*IRF4* conduit à l'augmentation de l'expression de MAF comparés à ceux transfectés avec le vecteur vide (Rauch et al., 2020), suggérant que l'*IRF4* est capable d'induire l'expression de MAF. Ces données laissent présager d'une induction mutuelle de ces deux FT dans les LT.

Dans les LB, MAF a également été décrit pour sa coopération avec l'*IRF4*. En effet, dans la lignée M12 (lignée de lymphome dérivée de LB), MAF coopère avec l'*IRF4* et NFATc2 pour transactiver le promoteur de l'*IL4* (Rengarajan et al., 2002). En plus de coopérer avec l'*IRF4*, un CHIP-seq de MAF a révélé qu'il est capable de fixer sur le promoteur de l'*IRF4* dans les plasmocytes (Katsarou et al., 2019). En outre, une analyse comparative des ChIP-seq de MAF et d'*IRF4* a illustré leur co-occupation sur 63% des loci qu'ils ciblent, soutenant ainsi l'hypothèse d'un complexe *IRF4*-MAF pour la transactivation de leurs cibles dans les LB.

2.2. MAF/BLIMP-1 : coopération ou interaction directe ?

Au-delà son lien avec l'*IRF4*, l'interaction de MAF avec d'autres FT impliqués dans la différenciation terminale, tels que BLIMP-1, pourrait expliquer son induction lors de cette étape. A ce jour, malgré leur synergie d'expression dans les LB, aucune interaction directe entre MAF et BLIMP-1 n'a été documentée. Chez la souris, un autre membre de la famille des MAF courts, MAFK a été décrit pour sa fixation sur le site MARE de *Prdm1* dans les LB (du stade Pro-B au stade PC) (Ochiai et al., 2008 ; Ochiai et al., 2006). MAFK forme un homodimère avec le FT BACH2, impliqué dans la différenciation des LB, afin d'inhiber l'expression de *Prdm1*. Dans les LT humains, certaines études suggèrent une interaction directe entre MAF et BLIMP-1. Dans les LTh1, une analyse par ChIP-qPCR a révélé la fixation de MAF sur le promoteur *PRDM1* (Neumann et al., 2014) et ce, au niveau du même site MARE réprimé par BACH2 et MAFK dans les LB (Ochiai et al., 2008). Par ailleurs, la co-transfection de plasmides contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur de *PRDM1* (PGL3-PRDM1-Luc) et de plasmides contenant le gène *MAF* (CMV-MCS-C-Maf-3Flag) dans les cellules HEK293T conduit à une transactivation du promoteur *PRDM1*

plus importante qu'en l'absence de *MAF* (Chang et al., 2017). Si ces études soutiennent l'hypothèse d'une interaction directe entre *MAF* et le promoteur *PRDM1*, d'autres indiquent une action synergique des deux FT mais sans interaction directe. Dans les LT CD8⁺ murins, malgré une augmentation de l'expression de *Maf* en l'absence d'expression de *Prdm1*, l'identification par ChIP-seq des cibles de *MAF* ou de *BLIMP-1* a révélé qu'il ne semble y avoir aucune interaction directe entre ces deux FT (Chihara et al., 2018). En revanche, cette analyse a mis en évidence 121 gènes régulés à la fois par *MAF* et *BLIMP-1*, suggérant qu'ils peuvent se lier à proximité l'un de l'autre sur des cibles communes. Dans les LTh, ils sont capables de contribuer indépendamment à la production d'IL-10 (Alhers et al., 2022). La délétion de l'un ou l'autre, n'impacte aucunement leur expression respective. Par ailleurs, leur délétion individuelle par siRNA n'induit qu'une diminution partielle de leurs cibles dans les LT CD8⁺ (PD-1, TIM-3, TIGIT) (Chihara et al., 2018) et dans les LTh (IL-10) (Alhers et al., 2022). Ces études suggèrent une régulation compensatoire de *MAF* et *BLIMP-1* vis-à-vis de leurs cibles, soit un rôle redondant de ces deux FT sur leurs cibles communes.

2.3. Interaction entre *MAF* et les autres FT impliqués dans la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac

Malgré l'incertitude quant à la nature de l'interaction entre *MAF* et *BLIMP-1* (directe ou indirecte), l'idée de leurs rôles redondants vis-à-vis de leurs cibles communes dans les LT soulève la question du rôle de *MAF* envers les cibles de *BLIMP-1* lors de la différenciation terminale des LB. De façon intéressante, les souris transgéniques dont les LB sur-expriment *Maf*, présentent une diminution de l'expression de *Pax5* et une augmentation de l'expression de *Xbp1* dans les LB issus de la rate (Morito et al., 2011). Ces résultats suggèrent que *MAF* pourrait inhiber *PAX5* et induire l'expression de *XBP1* dans les LB murins. Et inversement, l'expression de *Maf* est augmentée dans les LB de souris transgéniques qui sur-expriment *Xbp1* (Carrasco et al., 2007), indiquant que ces deux FT pourraient s'induire mutuellement dans les LB murins. Par ailleurs, lorsque l'expression de *MAF* est augmentée en réponse au blocage de *SLAMF5* dans les LBreg IL-10⁺, celle de *PAX5* est diminuée (Radomir et al., 2021).

Concernant les autres cibles de BLIMP-1, aucune étude ne les relie à MAF dans les LB à notre connaissance. Cependant, MAF a été décrit pour sa coopération avec BCL6 dans les LTfh pour l'induction de gènes clés (Kroenke et al., 2012) et sa régulation négative de l'expression des gènes *BCL6* et *IRF8* dans les ILC3 NKp46⁺ (Tizian et al., 2020). En effet, en absence d'expression de MAF, l'expression de ces deux FT est augmentée dans les ILC3 NKp46⁺. Par analogie, ces données suggèrent que MAF pourrait également réguler négativement BCL6 et l'IRF8 lors de la différenciation terminale des LB et ainsi contribuer au maintien du programme moléculaire des ASC.

L'ensemble de ces données suggèrent que MAF pourrait avoir un rôle dans l'induction de la différenciation terminale des LB en PB et PC *via* l'induction d'IRF4 qui induit à son tour BLIMP-1. De plus, MAF pourrait être également impliqué dans le programme identitaire des ASC *via* l'induction de BLIMP-1 et de XBP-1, permettant la sécrétion abondante d'Ac et la répression de PAX5, BCL6 et IRF8, responsables du programme moléculaire des LB moins différenciés (**Figure 58**).

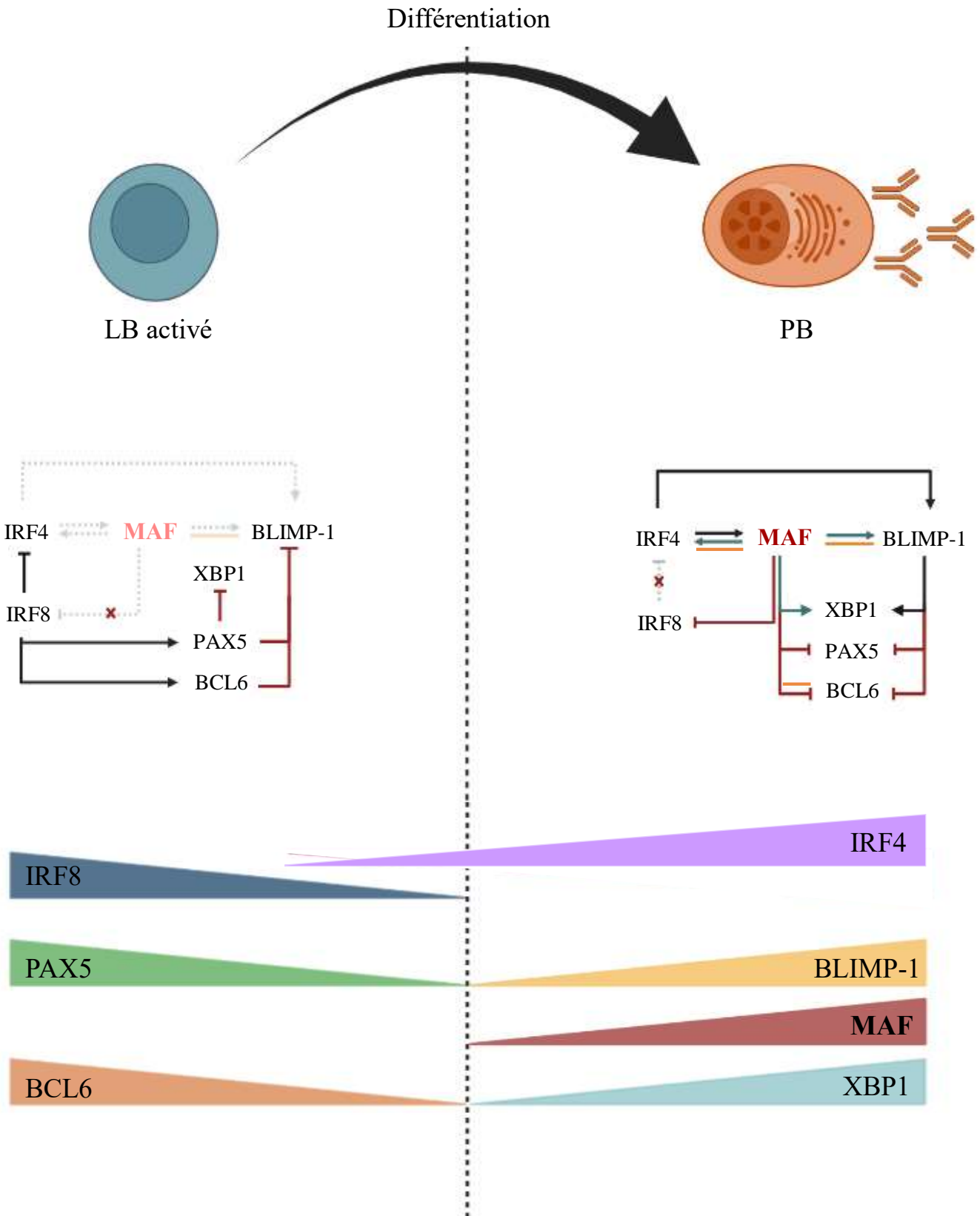


Figure 58 - Rôle hypothétique de MAF dans la balance moléculaire au cours de la différenciation terminale des LB. Les flèches en bleu indiquent les gènes induits par MAF, celles en noir représentent les gènes induits par les autres FT. Le trait orange indique les coopérations connues entre MAF et les autres FT.

Etant donné, le caractère compensatoire des rôles de BLIMP-1 et MAF, il serait intéressant de vérifier expérimentalement si l'expression de MAF est nécessaire à la différenciation terminale. Pour cela, des LB NA préalablement transfectés avec un ARN interférant de MAF pourraient être mis en culture selon le modèle de différenciation utilisé en Partie II. Dans le cas où l'absence de MAF impacterait la différenciation en plasmablastes, cela signifierait que MAF joue un rôle essentiel dans la différenciation terminale des LB. En l'absence d'effet sur la différenciation, MAF aurait simplement un rôle redondant, qui peut être compensé par la présence de BLIMP-1. Afin de confirmer les observations réalisées chez la souris, il serait également pertinent d'analyser l'impact de l'absence d'expression de MAF sur les FT impliqués dans la balance moléculaire qui régule la différenciation terminale des LB (IRF4, BLIMP-1, XBP1, PAX5, IRF8, BCL6).

ANNEXES

ANNEXE 1 : IL-21 AND IFN-ALPHA HAVE BOTH OPPOSITE AND REDUNDANT ROLE ON HUMAN INNATE PRECURSORS AND MEMORY B-CELL DIFFERENTIATION

IL-21 AND IFN-ALPHA HAVE BOTH OPPOSITE AND REDUNDANT ROLE ON HUMAN INNATE PRECURSORS AND MEMORY B-CELL DIFFERENTIATION.

Marina Boudigou², Magalie Michée-Cospolite², Patrice Hémon², Alexis Grasseau², Christelle Le Dantec², Emmanuelle Porchet¹, Christophe Jamin¹, Valérie Devauchelle¹, Olivier Mignen², Divi Cornec¹, Jacques-Olivier Pers¹, Laëtitia Le Pottier^{2*} and Sophie Hillion^{1*}

¹ U1227, LBAI, Univ Brest, Inserm, and CHU Brest, Brest, France

² U1227, LBAI, Univ Brest, Inserm, Brest, France

*joint senior authors

Corresponding Author: Sophie Hillion, INSERM UMR1227 Lymphocyte B, Autoimmunité et Immunothérapies, Brest University Medical School Hospital, BP824, F29609, Brest, France; Tel: +332 98 22 33 84; sophie.hillion@univ-brest.fr.

ABSTRACT

Immunological memory is essential for effective immune protection upon antigen rechallenge. Memory B cells encompass multiple subsets, heterogeneous in terms of phenotypes, origins and precursors, anatomical localization, and functional responses. B-cell responses are conditioned by micro-environmental signals, including cytokines. Here, we analyzed *in vitro* the effects of two cytokines implicated in B-cell differentiation, interferon-alpha (IFN- α) and interleukin (IL)-21, on the early functional response of four different mature B-cell subsets (IgD⁻ CD27⁻ naive, IgD⁺ CD27⁺ unswitched, IgD⁻ CD27⁺ switched and double-negative B cells). The dual response of naive and memory B cells to IL-21 allowed us to uncover a unique IgD⁺ CD27⁻ CD10⁻ B-cell population (referred to as NARB⁺) characterized by the expression of marginal zone B-cell markers CD45RB and CD1c. Similar to memory B cells, NARB⁺ cells were in a pre-activated state, allowing them to rapidly differentiate into plasmablasts upon innate signals while maintaining their susceptibility to IL-21 activation-induced apoptosis as observed for the naive compartment. Both in-depth phenotypic analysis of circulating B cells, and identification of these cells in spleen, tonsil and gut-associated lymphoid tissues, supported that NARB⁺ are uncommitted precursors of human marginal zone B cells.

INTRODUCTION

Memory B cells (MBC) and antibody (Ab) secreting cells (ASC) are the key players of humoral immunity resulting in the clearance of pathogens and the establishment of durable immune protection and supporting successful vaccination strategies (1). However, the persistence of autoreactive memory B-cell clones could sustain chronic and autoreactive inflammation leading to systemic autoimmune diseases (2). Some inherent and stable memory functions include long lifespan, high sensitivity to low doses of antigen, quick and robust proliferation, and rapid differentiation into plasma cells highly contrast with those from naive inexperienced B cells (3, 4). Accumulated data have demonstrated the high degree of heterogeneity of subsets and their progenitors with ambivalent equivalence in humans (5). Activated B cells that make cognate interactions in secondary lymphoid organs differentiate along either a follicular or extra-follicular (EF) pathways. In the follicular pathway, antigen-activated B cells interact with T cells and form the germinal center (GC), where they undergo somatic hypermutation, selection, and eventually differentiate toward high affinity long-lived plasma cells or IgG⁺ memory B cells. The EF differentiation of B cells is described as very heterogeneous depending on the tissue localization and subsequently on the nature of the availability of T-cell help as described in the lymph node (6). In the gut or the spleen, this pathway is mostly T-cell independent but relies on signals provided by innate cells (7). However, the strength of antigen (Ag) recognition appears as a common crucial regulator (8). The prototype of this pathway is represented by marginal zone B-cell (MZB) differentiation, leading to the

production of short-lived plasmablasts (PBs) involved in bacterial protection and the immune regulatory response (9).

The cytokines IL-21 and IFN- α are major actors involved in the control of B-cell responses. In secondary organs, the production of IL-21 by follicular helper T cells (LTfh) not only initiates affinity maturation in the GCs and isotype switching but also promotes cell proliferation and plasma cell differentiation (10-12). IFN proteins are highly produced by plasmacytoid dendritic cells upon viral aggression and are involved in the development of protective immunity mostly against viruses (13-15). Interestingly, IL-21 and IFN- α signaling have shared involvement in the pathogenesis of chronic and autoimmune diseases as well as in uncontrolled exacerbated inflammation (16-18). However, the role of IL-21 and IFN- α role in influencing the reactivation of MBCs or initiating the innate B-cell differentiation pathway is not well understood and often analyzed separately, especially in humans (19, 20). In the present report, we were interested in exploring the role of both cytokines in the initial events that cause activation and plasma cell differentiation from different human mature B-cell progenitors. Thus, we thus used a canonical gating strategy with IgD and CD27 to sort the four main mature B-cell populations. We then analyzed the early response of B cells to IL-21 and IFN- α signaling following BCR and Toll-like receptor (TLR) stimulation. We showed that both signaling pathways induced different B-cell fates, depending on their maturation status. Furthermore, we uncovered a mature B-cell population IgD⁺ CD27⁻ CD45RB⁺ CD10⁻ (referred to as NARB⁺) harboring highly versatile “multilineage” differentiation potential either able to differentiate into IgM producing PB upon innate signals or adopt pre-GC

features in the presence of IL-21. Phenotypically, NARB⁺ cells share some attributes with IgD⁺ CD27⁺ MZB cells but retain a unique naive migratory pattern and are sensitive to IL-21 activation-induced apoptosis. This population differed from Ag-inexperienced naive B cells by exhibiting a pre-activated phospho-signaling response to BCR/TLR stimulation. The co-stimulation with IFN- α but not with IL-6 or IL-10 overtook the IL-21 dependent inhibition of the differentiation pathway. This functional plasticity towards its cytokine environment contrasted with the stable and redundant responses observed in committed MBC subsets. Therefore, this subset could represent an important crossroad in human between the follicular and marginal zone developmental pathways.

MATERIALS AND METHODS

Sample collections

Blood samples from healthy donors were collected. Routine plateletpheresis was performed with the Trima Accel device at the French Blood Establishment (EFS). After donation, tubing of the leukoreduction system chamber (LRSC) was sealed before removing the collection set from the Trima Accel system. The LRSC were kept at 4°C until cell recovery (within 18 hours).

Cell isolation

To isolate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from Trima Accel devices, residual human blood from the LRSC was harvested and the LRSC was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). PBMCs were isolated by density gradient centrifugation on Lymphocyte Separating medium, Pancoll human (PAN Biotech). CD19⁺ B cells were purified from human PBMCs using the REAlease® CD19 Microbead Kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations with purity greater than 98 %.

Cell sorting

After isolation, B cells were stained for 30 min at 4°C into the dark with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-IgD (IA6-2), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD10 (ALB1), phycoerythrin linked to cyanin 5.5 (PC5.5)-conjugated anti-CD27 (1A4CD27), allophycocyanin (APC) linked to Alexa Fluor 700 (AAF700)-conjugated CD19 (J3-119) antibodies. CD10-positive B cells, which correspond to

transitional subset, were excluded from the cell sorting. Naive (NA, IgD⁺ CD27⁻ CD10⁻), unswitched memory (USM, IgD⁺ CD27⁺ CD10⁻), switched memory (SM, IgD⁻ CD27⁺ CD10⁻) and double-negative B cells (DN, IgD⁻ CD27⁻ CD10⁻) were sorted. For sorting of CD45RB⁺ and CD45RB⁻ NA B cells, FITC-conjugated anti-CD45RB (MEM-55, Immunotools), combined with PE-conjugated anti-CD10, PC5.5-conjugated anti-CD27, APC-conjugated anti-IgD (IA6-2) and AAF700-conjugated anti-CD19 antibodies, was used. Cell sorting was performed using a MoFlow XDP cell sorter (Beckman Coulter). The purity of B-cell subsets was typically greater than 97 %.

Ex vivo B-cell phenotyping by Flow Cytometry

For B-cell phenotyping, the following antibodies were used (Supplementary Table 1). For ABCB1 transporter activity analysis, cells were then washed and incubated at 37°C for 30 min with 200 nmol/L MitoTracker Green FM probes (Molecular Probes, Eugene, Ore). Samples were acquired with a Navios cytometer (Beckman Coulter).

Cell culture

Sorted cells were cultured in 96-well plates (Falcon) at 2×10^5 cells per 200 μ L/wells in complete medium (RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % of heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS) (BD, Biosciences), 4 mM L-Glutamine (Gibco) and penicillin (200 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL)). B cells were stimulated for 84 h (3.5 days), in the presence of the AffiniPure Goat anti-Human IgG+IgM (H+L) (2 μ g/mL), the AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α Chain Specific (2 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch Laboratories),

CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (0,25 μ M; InvivoGen), recombinant human Interleukin-2 (rh IL-2) (20 ng/mL, ImmunoTools) subsequently referred to as primed stimulation. Recombinant human Interferon-alpha 2a (rh IFN- α 2a) (10 μ g/mL; ImmunoTools), or recombinant human IL-21 (40 ng/mL; Immunotools) were added to the stimulation. For kinetics studies, B cells were stimulated with or without IL-21 for 12 h (0.5 days), 1.5 days, 2.5 days and 3.5 days.

Apoptosis and differentiation rescue assays

Viability of stimulated B cells were assessed by flow cytometry using FITC-labeled annexin V and propidium iodide (PI) (Biolegend). For apoptosis assays by live-imaging, IncuCyte[®] Annexin V Green Reagent was added directly in the medium at the dilution 1:200 and B cells were imaged every hour for 3.5 days using IncuCyte[®] Live-Cell Analysis System (Sartorius).

For rescue assays, sorted B cells were cultured with rh IL-21 as previously described and with Human CD40-Ligand Multimer Kit (1 μ g/mL, Miltenyi Biotec), rh IL-6 (20, 100 or 1000 ng/mL, Immunotools), rh IL-10 (10, 100 or 1000 ng/mL, Immunotools), rh BAFF (50 ng/mL, Immunotools), rh IFN- α 2a (10 ng/mL) or with the Pan Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (100 μ M, BD Biosciences).

Analysis of the differentiation of cultured B cells by Flow Cytometry

After culture, cultured B cells were harvested, pelleted and the supernatant was collected. Cells were then stained with PE anti-CD11c, PC5.5 anti-CD27, APC-AF700 anti-CD19, APC-AF750 anti-CD38 (Beckman Coulter). Intracellular staining for transcription factors was carried out after cell fixation and permeabilization using

the Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Transcription factor expression was analyzed using PE anti-IRF8 (REA516), PE Vio770 anti-IRF4 (REA201), APC anti-BLIMP1/PRDM1 (646702), BV421 anti-T-BET (4B10, Biolegend). Stained B cells were analyzed using a Navios cytometer (Beckman coulter). The phenotype of the cells was analyzed using Kaluza Flow Cytometry Analysis and FlowJo software.

Phosphoprotein measurement

Purified total B cells were first stained with FITC-conjugated anti-CD45RB, PC5.5-conjugated anti-CD27, APC-conjugated anti-IgD, AAF700-conjugated anti-CD19 and AAF750-conjugated anti-CD38 antibodies for 30 min at 4°C into dark. After surface staining, cells were stimulated following the primed stimulation with or without rh IL-21 or rh IFN- α 2a (as described above) during 5 to 30 min. Unstimulated B cells were used as control. Cells were then fixed in 1.5 % Paraformaldehyde 10 min at room temperature and permeabilized with 100 % ice-cold methanol for 30 min at 4°C. The expression of phosphorylated proteins was measured by flow cytometry using a Navios cytometer with VioBlue (VB)-conjugated anti-pSTAT1 (pY701, REA159), Brilliant Violet 421 (BV421)-conjugated anti-pSTAT3 (pY705, 13A3-1) or BV421-conjugated anti-pAKT (pS473, M89-61) (Biolegend) Abs.

Proliferation assays

Sorted B-cell subsets were labeled with CellTrace Violet reagent (Thermo Fischer Scientific) for 10 min at 37°C prior to the primed stimulation as described above. B-

cell proliferation was evaluated by using Navios cytometer and analyzed with FlowJo's Proliferation software.

Antibody production measurement by FluoroSpot

After 3.5 days of stimulation, the levels of total IgM, IgG, and IgA production by each sorted B-cell subset were evaluated by using the Human IgG/IgM and IgG/IgA FluoroSpot kits (MABTECH), according to the manufacturer's instructions. 15,000 pre-stimulated B cells were incubated by wells during 20 h before revelation. Spots were counted with an Elispot Reader system (Autoimmun Diagnostika GmbH).

Intracellular cytokine detection

For analysis of the intracellular cytokine production, 50 ng/mL Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma Aldrich), 1 µg/mL ionomycin (Sigma Aldrich) and 10 µg/mL Brefeldin A (Selleckchem) were added for the last 5 hours of culture. Cells were then fixed and permeabilized using Cyto-Fast Fix/perm Buffer Set (Biolegend) according to the manufacturer's instructions and stained with PE anti-IL-6 and PE-Cy7 anti-IL-10 (JES3-9D7) Abs (Biolegend).

Blood sample staining and CYTOF acquisition

Whole blood from healthy controls was analyzed using the Maxpar® Direct™ Immune Profiling Assay™ (Fluidigm) according to manufacturer's instructions on a CYTOF Helios system (Fluidigm). The following antibodies were added to the initial cocktail: CD24-169Tm (ML5, Fluidigm), CD21-162Dy (BL-13, Miltenyi Biotec), CD11b-209Bi (ICRF44, Fluidigm), IgM-175Lu (PJ2-22H3, Miltenyi Biotec), T-

BET-165Ho (4B10, Biolegend), FoxP3-159Tb (259D/C7, Fluidigm) and CD45RB-142Nd (MEM-55, Immunotools). Briefly, 270 µl of blood were incubated in dry antibody tube with the additional antibodies (CD24, CD21, CD11b, IgM and CD45RB). After 30 min erythrocyte were lysed by addition of 250 µl of Cal-lyse and washed. Then cells were fixed and permeabilized using the Maxpar® Nuclear Antigen Staining Buffer Set Cells before incubation with nuclear antibodies (T-BET and Foxp3). Then cells were fixed in 1.6% paraformaldehyde and incubated with 125mM Cell-ID™ Intercalator-Ir. Sample acquisition was performed on a Helios system utilizing CyTOF® Software using the Maxpar Direct Immune Profiling Assay template with additional channels. Samples were acquired in CAS containing 0.1× EQ beads to normalize data.

Tissue staining and IMC image acquisition

FFPE sections of 4 µm thickness from gut, tonsil and spleen, were cut onto glass slides. Sections were de-paraffinized with xylene and carried through sequential rehydration from 100% Ethanol to 70% Ethanol before being transferred to TBS. Heat-induced antigen retrieval was performed in a water bath at 95°C for 30 min in Tris/EDTA buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH9). Slides were cooled to room temperature (RT) and were subsequently blocked with PBS+3%BSA for 30 min at RT. Each slide was incubated with 100 µl of the antibody cocktail (Supplementary Table 2) overnight at 4°C. Then, slides were washed 3 times with PBS and labeled with 1:500 dilution of Intercalator-Ir (Fluidigm) in TBS for 2 min at RT. Slides were briefly washed with H₂O and air dried before IMC acquisition. The IMC was purchased from Fluidigm (Fluidigm, Hyperion Imaging System™). Data were

acquired on a Hyperion imaging system coupled to a Helios Mass Cytometer (Fluidigm), at a laser frequency of 200 Hz and laser power of 3 dB. For each recorded ROI, stacks of 16-bit single-channel TIFF files were exported from MCD binary files using MCD™ Viewer 1.0 (Fluidigm). Cell-based morphological segmentation was carried out by using supervised pixel classification by Ilastik (64) to identify nuclei, membrane and background, and used CellProfiler (65) to segment the resulting probability maps. Inputs of 16-bit TIFF images with their corresponding segmentation mask were uploaded in histoCAT to open a session data analysis. Dimensionality reduction and unsupervised FlowSOM clustering for 16-bit single images were performed using Cytobank on FCS.files.

RNA sequencing

Total RNA from *ex vivo* sorted B cells (NA, SM and DN) and after culture (Primed, IFN- α and IL-21) was extracted using RNA isolation kits (Norgen Biotek) according to the manufacturer's instructions. Libraries were generated by using the Qiaseq RNA library kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The sequencing analysis was realized by Macrogen society. Fastq reads were aligned using Partek® Flow® Genomic analysis software with STAR aligner and hg38-GENCODE Genes (release 31) as transcript model. Differential expression analysis was performed using the EdgeR package. We treated the PCA loadings onto each of the genes as expression data to run pathway analysis with the PGSEA package. For each pathway, the PAGE algorithm performed one-sample t-test on each gene set in the biological processes branch of Gene Ontology (GO). The adjusted P-values were then used to rank the pathways for each of the first five principal components. The following R code

performs PCA and PGSEA analyses: `pca.object <- prcomp(t(x)) ; pg = PGSEA (pca,cl=GeneSets(),range=c(15,2000), p.value=TRUE, weighted=FALSE)`. We used the top 500 genes in hierarchical clustering using the `heatmap.2` function. The data was centered by subtracting the average expression level for each gene.

Real-time PCR

From 120 to 500 ng of total RNA were reverse-transcribed with superscript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The gene expression was analyzed with the TaqMan™ Gene Expression Master Mix and the following probes: *GAPDH* (Hs02758991), *BCL2* (Hs04986394), *IL6* (Hs00985639), *IL6R* (Hs01075666), *IL10* (Hs00174086) and *TNFSF13B* (Hs00198106). Real-time PCR were performed using The QuantStudio6™ real-time PCR device (QuantStudio™ real-time PCR software). The mRNA relative abundances in real-time PCR were obtained by using the MCMC.qPCR package.

Statistics and Data visualization

For *in vitro* experiments, statistical differences were evaluated using the paired two-tailed Wilcoxon signed-rank t-test or repeated measures (RM) one-way ANOVA using Tukey's correction for multiple comparisons when analyzing more than three groups. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.4.3 and 9 software.

RESULTS

Activation, rapid differentiation and immunoglobulin production upon stimulation define functional B-cell subsets

To investigate the initial activation and differentiation response of the different circulating mature B-cell subsets, we sorted the four canonical mature B-cell populations in CD10-negative cells according to IgD and CD27 expression. The expression of both markers was widely used to phenotype and follow the mature human B-cell population in the literature (21, 22) and delineates naive B cells (NA, IgD⁺ CD27⁻), unswitched MBCs (USM, IgD⁺ CD27⁺), switched MBCs (SM, IgD⁻ CD27⁺), and double-negative cells (DN, IgD⁻ CD27⁻) (Supplementary Figure 1A). We analyzed activation and differentiation capacities of the different subsets after activation (anti-BCR, CpG, and IL-2) (23) during a short incubation period (three days) that was inferior to previous culture conditions required for the *in vitro* class switch recombination (24). In subsequent experiments, we referred to this stimulation as priming activation. We first followed B-cell activation and differentiation by assessing the expression of CD38 and CD27 in culture to classify resting B cells (CD38⁻CD27⁻), activated B cells (Act, CD38⁺CD27⁻), intermediate (Int, CD38⁺CD27⁺) and plasmablasts (PBs, CD38^{high}CD27^{high}) (Figure 1A) adapted from previous studies (18, 25, 26). As expected, PBs and Int cells were significantly enriched in cultures derived from CD27⁺ MBCs compared to those from NA and DN cells, which in contrast presented an activated phenotype with enrichment of CD38⁺CD27⁻ cells. However, we could detect that 25.9% (\pm 4.8) of CD38⁺CD27⁺ cells originated from the DN population and more surprisingly 14.2% (\pm 1.8) from the NA

population. To extend these phenotypic observations, we assessed the IgM, IgA, and IgG production by dual-color ELISPOT in activated sorted B-cell subsets (Figure 1B). Detection of isotype-specific PB confirmed that the culture model does not allow for the class-switching of IgD-positive and IgM-positive cells from NA and USM cells, supporting the observation of the rapid differentiation of MBC progenitors. Although the SM population presented an increase in PB and CD27⁺ cells compared with cells originating from the DN population, the percentage of ASC (all isotypes) was very close in both populations (13.6 vs 10.4). Moreover, there was a significant amount of IgM-secreting cells originating from the NA population which is usually positioned as a non-secreting subset. Therefore, to understand these potent discrepancies between the observed differentiated phenotype and the functional ability of the different subsets to secrete Ab, we assessed the intracellular expression of three key molecular drivers of B-cell differentiation BLIMP1 (encoded by the *PRDM1* gene), IRF4 and IRF8 (27) (Figure 1C). We robustly detected the induction of IRF4^{high} IRF8^{low} cells expressing the PB marker BLIMP1 with no significant difference between the SM, DN, and USM populations regardless of CD27 expression. In agreement with the ELISPOT assays. NA stimulated cells generated 5.5% (\pm 1.4) of BLIMP1⁺ IRF4⁺ IRF8^{low} cells that did not acquire a typical CD27^{+/high} pre-PB/PB phenotype. Moreover, the detection of differentiated cells with functional Ig production derived from NA cells might indicate the existence of a precursor IgD⁺ CD27⁻ B-cell subset with the ability to rapidly differentiate into IgM⁺ PB.

IL-21 and IFN- α modify the mature B-cell responses and uncover unique innate precursor ability

To investigate the role of IL-21 and IFN- α signaling in mature B-cell differentiation, we assessed the induction of IRF4^{high} IRF8^{low} cells in the primed culture in the presence of IL-21 or IFN- α in the four sorted populations (Figure 2A). A relative heterogeneous rate of cell differentiation existed within the IgD⁺ compartment according to the different donors (Figure 2B). Whereas IFN- α exhibited no significant additive effect to the priming activation on the activation of any mature subset, IL-21 signaling had opposite results between NA and SM cells. Primed SM cells had a 30 % increase in the differentiation rate in the presence of IL-21. On the contrary, IL-21 suppressed the induction of the IRF4^{high} IRF8^{low} population in the NA culture. Those observations were confirmed by ELISPOT at the functional level confirming the loss of ASC coming from the NA population in the presence of IL-21 (Supplementary Figure 1B). IgM/IgD memory and class-switched cells might exhibit a distinct fate after reactivation in mice (28). Thus, we compared the differentiation response to IL-21 in the IgD⁺ population (Figure 2B). In contrast to the effect on IgD⁺ CD27⁻ cells, IL-21 had no additional impact on the differentiation of IgD⁺ CD27⁺ USM cells and did not exhibit a suppressive effect.

IL-21 was initially described to deliver both positive and negative signals in a context-dependent manner in NK cells and B cells (29) and more recently on dendritic cells (30). To date, several articles have reported a suppressive effect of IL-21 on normal B cells (31-33). To understand the opposite role of IL-21 on SM- and NA-derived PB differentiation, we examined the effect of IL-21 on the B-cell apoptosis (Figure 2C).

The addition of IL-21 to the initial stimulation significantly decreased annexin V-PI-viable NA cells but not viable SM cells. On the contrary, IFN- α significantly promoted NA cell survival, whereas it had no impact on SM cell recovery (Figure 2C and 2D). Multiple rounds of division and differentiation coexist during the reactivation of MBC, balancing *in vivo* between the generation of either GC or plasma cells (34, 35). Furthermore, the functional division of MBCs following reactivation might highly contribute to their regenerative potential. When activated, NA cells remained largely undivided at day 3. In contrast, SM cells proliferated with more than three divisions. IL-21 increased the proliferation of SM cells induced by priming activation, whereas it led NA to enter into the cycle (Figure 2E). We analyzed the apparition of the IRF4⁺ IRF8^{low} PB population in both subsets each day during the culture (Supplementary Figure 1C). There was a notable difference in the velocity of the differentiation process. IL-21 amplified and maintained both rounds of division and differentiation in SM cells initiated at the beginning of the culture. In contrast, cell activation triggered the differentiation of a subset of NA cells with a significant delay compared with that of SM cells. The IL-21-induced proliferation of NA cells might lead *in vitro* to *nutrient exhaustion* and subsequent non-specific apoptosis that may be uncoupled from direct IL-21 signaling. When following the kinetics of the IL-21-dependent apoptosis in NA cells, live imaging revealed a very progressive process that was initiated after 10-15 hours of stimulation, suggesting an activation-induced mechanism (Supplementary Figure 1D).

IL-21 induced T-BET and CD11c expression in anti-IgM/CD40L activated naive B-cell culture (36). As expected, CD11c was strongly induced by IL-21 without any

differences between the subsets (Figure 2F). Interestingly, IL-21 decreased the induction of T-BET in activated SM cells together with the induction of BLIMP1, as mutually exclusive events (Figure 2G, and 2H, Supplementary Figure 1E). The addition of IL-21 to activated NA cells led to opposite results, with significant suppression of the BLIMP1⁺ population toward a T-BET-positive phenotype underlining two opposite maturation trajectories.

Altogether, these results demonstrated that IL-21 signaling specified different primary outcomes in B-cell subsets promoting either proliferation and T-BET-activation in NA B cells or both renewal and differentiation in MBC. Moreover, we uncovered a unique NA-derived IgD⁺ CD27⁻ population with delayed ability to differentiate into IgM-producing PB repressed by IL-21.

IL-21 and IFN- α induce different transcriptional programs in naive and switched memory B cells

To gain insight into the role of IL-21 and IFN- α signaling in activated mature B-cell subsets, we performed RNA sequencing on sorted NA and SM B cells in a resting state and cultured them in the presence of both cytokines. The unsupervised approach showed an accurate clustering of B-cell subsets according to their origin and *stimuli* (Figure 3A). Principal component analysis 1, representing 54% of the total variance, is correlated with the culture-activation conditions, whereas PC2 (15% of the variance) separated the two major B-cell subsets (Supplementary Figure 2A). We treated the loadings of the principal components onto each of the genes as expression data to run pathway analysis using the PAGE algorithm on multiple GO pathways

and hallmark.MsigDB databases (37) (Figure 3B). As anticipated, PC1, representing the culture activation, was strongly associated with the mitotic process, cell cycle, and DNA replication, whereas PC2 correlated with the reticulum process, mRNA translation, and protein production. We then analyzed genes differentially expressed in NA cells in the presence of IL-21 compared to the priming stimulation (adjusted p value = 0.05, fold change = 1.5). Although the sensitivity of our dataset was modest, we observed that differentially expressed genes (DEGs) reflected the principal cellular outcomes in cultures between the different conditions (Figure 3C and Supplementary Table 3). Among the 124 genes down-regulated by IL-21, we found genes involved in Ig transcription and protein production (*XBPI*, *BHLHA15*, *CAVI*, *TNFSF8*, *FKBP11*, *MZB1*, and *IGVK*) were both key elements of B-cell differentiation into ASCs (Figure 3C). In contrast, the presence of IL-21 strongly up-regulated genes involved in the control of B-cell activation and proliferation of *AICDA*, *TOX*, *TOX2*, *NR4A1*, *ZBTB32* and, *ITGAX* (CD11c) gene expression. GO enrichment analysis highlighted the up-regulation of metabolic activity in IL-21 stimulated NA cells with the enrichment of kinase, transferase, fatty-acyl-CoA, and lipid metabolic processes (Supplementary Figure 2B). Similar observations were made when we compared NA cells stimulated either with IL-21 or IFN- α (Figure 3D). IFN- α -stimulated NA B cells exhibited induction of *PRDM1*, *CD38*, and *XBPI* involved in PB differentiation and Ig transcription whereas the genes induced in the presence of IL-21 (*AICDA*, *TOX*, *BHLHE40*, *CD276*, *PBX4*, and *IKZF4*) suggested a more GC-like pathway (38, 39) (Figure 3D). As expected, the IFN- α signaling is strongly emphasized in NA cells by the up-regulation of an important set of type I

IFN-responsive genes (*IRF7*, *MX1*, *MX2*, *IFI44*, *IFI35*, *ISG15*, *OAS3*, *IFI6*, and *IFI16*) (Supplementary Figure 2C).

Since the IL-21 signaling was initiated at the beginning of the culture, we hypothesized that important variations in gene expression occurred during the 3 days of stimulation and could be reflected by assessing DEGs during activation with or without IL-21 related to unstimulated NA B cells (Supplementary Figure 2D, Supplementary Table 3). The overlapping profile of both simulations revealed a core activation signature that reproduce changes in gene expression mediated by the priming stimulation. A set of 819 up-regulated and 795 down-regulated genes were modulated only in the presence of IL-21. In agreement with the increase of mortality observed in the culture, *CFLAR*, *DDIT4*, *BCL2L11* (BIM), *BNIP3*, and *PAK2* apoptotic genes were up-regulated and the anti-apoptotic protein *BCL2* was down-regulated exclusively in the presence of IL-21 (Supplementary Table 2). Gene ontology, KEGG, and pathway gene set enrichment analysis (GSEA) was used to characterize the IL-21 signature in NA B cells. Metabolic processes appeared as recurrent up-regulated pathway and included the increase of oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism and glycolysis (Figure 3E and 3F, Supplementary Figure 2E). These pathways seem to be associated with an enrichment of mTOR activity. The IL-21 signature in activated NA cells was further characterized by an enrichment of a C/EBP β and MYB-dependent-genes network over the MZB-related genes (*DLL1*, *ADAM17*, *MALM3*, *FBXW7*, *RBM15*, and *TGFBR2*) (Figure 3F) (40-42).

Finally, we compared the effects of IL-21 signaling after activation between the NA and SM cell subsets resulting in 1227 up-regulated and 1166 down-regulated genes (Supplementary Figure 2F and Supplementary Table 4). These DEGs corroborated the interpretation of the different fates mediated by IL-21 on the two B-cell subsets. IL-21-stimulated NA cells harbored a transcriptional program close to pre-GC cells with the up-regulation of *BCL6*, *BACH2*, *SPIB*, *IRF8*, and *TCL1* whereas IL-21 induced a strong differentiation of SM cells into PB illustrated by the increase of *PRDM1*, *IRF4*, and *XBP1* and the down-regulation of B-cell lineage associated genes, including *CD22*, *CD72*, *MS4A1*, *CD19*, and *PAX5* (Supplementary Figure 2G).

Altogether, our transcriptional analyses argued for the down-regulation by IL-21 of PB differentiation in the NA B-cell subset that is conserved in SM cells. Moreover, these data established B-cell-intrinsic IL-21 signaling in primed NA B cells with a high metabolic signature led to proliferation and activation-induced apoptosis.

CD45RB, CD1c, and unique homing receptor profile identify a circulating CD27⁻ marginal zone B-cell-related progenitor population

We uncovered the existence of a B-cell population within the IgD⁺ CD27⁻ NA compartment that rapidly differentiated upon BCR and TLR signaling but had opposite responses between IL-21 and IFN- α . This identity coincided with the down-regulation of some genes involved in MZB differentiation. We thus hypothesized the existence of a MZB-related progenitor cell population displaying multi-potential properties. To explore this idea, we conducted an extensive phenotypic analysis using mass cytometry on circulating peripheral blood (Figure 4). The CD45RB isoform

detected by the Ab clone MEM-55 was reported as an accurate marker to identify not only CD27⁻ and CD27⁺ MBCs (43, 44) but also MZB cell lineage subsets (45, 46). We thus used a routine panel of 35 markers including anti-CD45RB (MEM-55) Ab and the intracellular detection of T-BET on whole blood from seven different donors (Figure 4A). The ViSNE algorithm was run on the concatenated CD19⁺ B-cell data to visualize B-cell populations projected onto a two-dimensional map (Figure 4A). CD27 expression distinguished two distinct areas on the ViSNE cell map, and IgD⁺ cells represented the majority of mature B cells. We then performed unsupervised hierarchical clustering using FlowSOM resulting in 15 meta clusters overlaid on the ViSNE plot with various IgD, CD27, and CD45RB density expressions (47) (Figure 4B). Among them, cluster 12 (C12) represents a unique population of B cells among the NA CD27⁻ population expressing IgD and high density of CD45RB. We then applied on the t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) the overlay of the manually gated IgD⁺ CD27⁻ CD45RB⁺ (NARB⁺) population together with the most currently known B-cell subsets, including the two newly described B-cell populations poised to differentiate into PB and expanded in autoimmune patients referred to as activated naive (aNav) and DN2 cells (Supplementary Figure 3) (21, 48). The NARB⁺ population does not express T-BET or CD11c as described for the aNav and DN2 cell populations that appeared to cluster together in C3, confirming the previously described relationship between them (Figure 4C). The NARB⁺ cells were characterized by a high amount of the B-cell follicle homing receptors CXCR5, CCR7, and CCR6 but low expression of CXCR3. This profile contrasted with USM and SM cells that exhibited the up-regulation of CXCR3 expression and down-regulation of CCR6 expression. We further realized an extensive identification of this

population with additional markers in other donors. The NARB⁺ population represented $4.5 \pm 1.8\%$ of total B cells with a relatively stable representation, contrasting the importance of donors' variability of human CD27⁺ MBCs (Figure 4D). NARB⁺ presented an intermediate profile between NARB⁻ B cells and USM B cells (IgD⁺CD27⁺) and can be identified as IgM⁺ IgD^{high} CD45RB⁺ CD27⁻ MTG^{int} CD38⁻ CD23^{low} CD21^{high} CD1c⁺ CD80^{low} PDL2⁻ B cells (Figure 4E). The circulating NARB⁺ population shared a common phenotypic identity (expression of IgM and CD1c) with IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ MZ-like B cells but with a very distinctive homing (CXCR4, CXCR5, CCR6, and CCR7) and signaling-associated molecules (CD21, CD23, CD22, CD5, TACI, CD80, PDL2, and CD32) profile.

NARB⁺ cells are uncommitted precursors of innate plasmablasts

According to these data, we thus hypothesized that this progenitor population might represent the previous B-cell subset among the NA cells that exhibit rapid differentiation upon reactivation. To confirm this hypothesis, we sorted NARB⁺ and NARB⁻ cells to evaluate their response in the priming culture. The induction of the IRF4⁺ IRF8^{low} BLIMP1⁺ PBs was only observed in the NARB⁺ cells culture (Figure 5A and 5B) identifying NARB⁺ as the precursor population of IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ cells and IgM⁺ PBs. We followed the apoptosis of sorted NARB⁺ and NARB⁻ cells by live-cell imaging in the primed culture with or without IL-21. NARB⁺ cells conserved functional characteristics of Ag-inexperienced NA cells in response to IL-21 exhibiting rapid activation-cell death with similar kinetics (Figure 5C).

We then explored whether these cells could be found in secondary lymphoid organs at steady state. To address this question, we performed imaging mass cytometry on tonsil, spleen, and gut-associated lymphoid tissue sections (Supplementary Figure 4A). We visualized and analyzed data using the open-source platform histoCAT, which enables highly multiplexed, quantitative, and detailed analysis of cell phenotypes, microenvironment interactions, and tissue architecture. The workflow of histoCAT consists of overlaying the segmentation masks previously generated by CellProfiler to extract single-cell level information and processing this information into FCS files. We analyzed FCS files analyzed using the t-SNE algorithm that revealed specific cell distribution according to tissue origin (Figure 5D). Unsupervised hierarchical clustering using the FlowSOM algorithm was performed to cluster 10 major groups of cells in the different tissues (Figure 5E). Although the expression levels of the different markers may significantly vary between them and across the tissues, the heat map view of the FlowSOM clusters identified clusters 1 and 2 were mostly associated with T cells; cluster 3 with macrophages; cluster 4 with neutrophils, and clusters 8, 9, and 10 with B cells. Clusters 5, 6 and 7 had a more ambivalent profile. Finally, Ki67⁺ proliferative B cells identified the GCs in tonsil and the gut but not in the spleen sections analyzed here (Supplementary Figure 4B). We confirmed that the clusters overlapped with the main cell populations identified by manual gating. NARB⁺ B cells were detected belonging mostly to cluster 9 (Figure 5E and Supplementary Figure 4C). NARB⁺ cells were localized outside the GC mostly in the mantle zone as previously described for IgD⁺ cells. Using neighborhood analysis with histoCAT, NARB⁺ cells were found in very close interaction with CD3⁺CD4⁺ BCL6⁺ T cells localized at the border of the GCs in the tonsil and in the

gut-associated tissues. Moreover, NARB⁺ appeared to be close to Ki67⁺ proliferative CD3⁺ T cells that might suggest antigen presentation or activation process. However, the cell interaction map of NARB⁺ differed in the spleen where NARB⁺ were mostly in interaction with innate cells like with CD68⁺ macrophages and MPO⁺ neutrophils (Figure 5F and Supplementary Figure 4D). These data suggested circulating NARB⁺ cells had equivalence in secondary lymphoid tissues that were not restricted to the spleen and might participate in the immune response.

NARB⁺ cells are in a pre-activated state with unique pSTAT3 and pSTAT1 pattern

IL-21 signaling *via* downstream STATs phosphorylations specified the outcome of naive and memory B cells (12, 19). To shed light on the mechanisms underlying the specific effects of IL-21 on the NARB⁺ population, we compared the early signaling events triggered by IL-21 in combination with the primed stimulation in the different subsets. IL-21 signals through the receptor pair IL-21R/γc, which leads to induction of STAT3 and STAT1 and to a lesser extent the STAT5 and PI3K/AKT pathways. In the priming stimulation, the STAT3 activation showed a similar dynamic of phosphorylation between the different subsets with a peak after 5 min and then a decrease. The STAT1 phosphorylation in USM, SM, and NARB⁺ cells also had a peak of activation after 5 min, however it continued to gradually increase between 30 and 90 min. This increase was not observed for NARB⁻ cells (Figure 6A). We analyzed the phosphorylation levels of Y705-STAT3 and Y701-STAT1 in the different B-cell subsets after 30 min of activation with or without IL-21 (Figure 6B). In the presence of IL-21, NARB⁺ cells presented a dual profile characterized by an

important increase of pSTAT3 as observed in Ag-inexperienced NARB⁻ cells and a decrease of pSTAT1 as observed in MBC (USM and SM). In addition to STATs activation, the IL-21 proliferative effect was dependent on the PI3K/AKT pathway (49). We thus examined S473-AKT phosphorylation in the different subsets following activation (Figure 6C). We did not detect a strong additional effect of the addition of IL-21 on the AKT phosphorylation in any of the subsets. However, as observed for STATs phosphorylation, a strong difference existed between the magnitude of the pAKT response following activation between NARB⁻ and NARB⁺ cells. Altogether, these data showed that NARB⁺ cells exhibited a specific IL-21-dependent pSTAT1 and pSTAT3 activation pattern. Moreover, NARB⁺ cells have an intracellular-phosphorylation signature close to Ag-experienced cells suggesting their previous *in vivo* activation.

IFN- α but not apoptosis inhibition counteracted IL-21 mediated suppression of NARB⁺ differentiation

In vitro activation-induced apoptosis may result from an absence of optimum survival signals potentially available *in vivo*. Quantitative RT-PCR performed on four independent experiments showed that IL-21 down-regulated *BCL2* mRNA together with several other B-cell survival and pro-differentiating factors (*BAFF*, *IL6*, *IL6R*, and *IL10*) in NA cells, confirming the observations obtained from RNA sequencing (Figure 7A). NARB⁺ produced twice as much IL-6 as NARB⁻ at steady state (Figure 7B). After *in vitro* activation, the IL-6 production in NA cells was reduced in the presence of IL-21 whereas IL-10 appeared to be unmodified (Figure 7C and 7D). We thus tested whether supplementation of survival factors in the culture might rescue

NA cells from IL-21- dependent apoptosis and restore NARB⁺ differentiation. The addition of IL-6 and IL-10 to the IL-21 primed condition at different doses neither improved the viability of NA cells nor the induction of IRF4⁺ PB in the culture (Figure 7E). The CD40 signaling is described as a GC key pro-survival factor and is a hallmark of the provision of T-cell help to B cells. Accordingly, the addition of a CD40L multimer (Figure 7F and 7G) or BAFF (data not shown) in culture inhibited IL-21-induced apoptosis but did not induce NARB⁺ cells to differentiate, suggesting a subset-intrinsic control of PB differentiation. We then examined whether the biochemical blocking of caspase-induced apoptosis could restore NARB⁺ PB differentiation. We pretreated NA cells with the pan-caspase inhibitor Z-VAD before their activation in the presence of IL-21. As expected, we obtained a full recovery of cell viability in culture, but the PB differentiation was not restored decoupling both mechanisms (Figure 7F and 7G). Lastly, as a test of whether innate signals could overcome IL-21-induced inhibition of NARB⁺ cell differentiation, we analyzed the effect of adding IFN- α to the IL-21 primed condition (Figure 7H). Although apoptosis of NA cells was only partially corrected, IFN- α counteracted IL-21 signaling in NARB⁺ cells and re-established PB differentiation.

Taken together, these data support that NARB⁺ cells not only preferentially followed an IFN- α -dependent pathway of differentiation independently of apoptosis but also kept the ability to proliferate in response to IL-21 and T-cell signals.

DISCUSSION

In this work, we analyzed the effects of IL-21 and IFN- α signals on different subsets of human activated B cells. We used an *in vitro* B-cell activation model involving BCR and TLR stimulation in presence of IL-2 during a relatively short-time period (referred to as priming cells) (23). The requirement of permanent BCR engagement with an Ag for MBCs to survive or be reactivated is a major debate (50-52), and activation by TLR agonists or bystander T cells help have been suggested to also ensure the longevity of MBC in an Ag-independent process (53). The priming model presented here was an attempt to integrate cognate B-cell stimulation signal 1 and TLR innate signal 2 without direct provision of T-cell help. We demonstrated that this stimulation was sufficient to capture the early events of the activation of memory and naive B cells and then address the ability of MBC to rapidly differentiate into PB. We thus efficiently tracked the IRF4⁺ IRF8^{low} PB and pre-PB subsets with Ab secreting ability regardless of CD27 and CD38 expression. However, this model has the inherent limitations of *in vitro* studies using a limited competitive cells environment and fixed levels of BCR stimulation. In this regard, the affinity and valence of the BCR in the regulation of primary events conducting human B cells toward follicular or EF pathways remain to be addressed (54).

Our data showed that the IFN- α and primed stimulation have a redundant role in the differentiation of MBC subsets into PB. In contrast, IL-21 signaling had a unique intrinsic effect influencing B-cell fate. This specific IL-21-dependent B-cell response led us to uncover the existence of an innate-like mature IgD⁺ CD27⁻ CD45RB⁺ CD1c⁺ CD10⁻ B-cell subset harboring progenitor abilities. This subset presented a versatile

“multilineage” differentiation potential, either being able to differentiate into IgM-producing PB upon innate signals or becoming proliferative and apoptotic in the presence of IL-21. NARB⁺ circulating B cells exhibited the expression of follicular homing chemokine receptors and had equivalents in multiple secondary lymphoid tissues which strengthen its progenitor nature. However, NARB⁺ cells differed from transitional B cells notably by the low expression of CD38, the intermediate MTG extrusion, and the absence of CD10 expression. An equivalent subset was previously identified in the spleen expressing the CD45RB glycosylated epitope MEM-55 and up-regulating CD27 expression in response to NOTCH2-ligand classifying those subsets as marginal zone precursor cells (MZP) (17, 55). The CD45RB isoform was initially associated with MBC subsets in humans with a high expression on switched CD27⁺ B cells, PBs, and IgD⁺ IgM⁺ CD27⁺ USM B cells (45). More recently, extensive phenotypic and functional analysis of human peripheral B-cell subsets through mass cytometry has refined the CD45RB⁺ CD27⁻ population as an early memory B-cell subset based on the level of mutational burden, and their unique metabolic and immune signaling activities, however, with no distinction between isotype status (43). In a recent elegant study, the Spencer’ group identified CD45RB⁺ T2 cells as progenitors of human marginal zone B cells, suggesting a very close developmental link with the CD45RB⁺ naive population described in this paper (62). CD45RB⁺ IgD⁺ CD27⁻ (NARB⁺) cells shared different molecular and functional attributes with both naive and memory B cells but with unique IL-21 responsiveness. NARB⁺ cells were able to differentiate upon innate signals toward IgM-producing cells as observed for the IgD⁺ CD27⁺ (USM) subset. Whereas IL-21 signaling had nearly no impact on the priming activation of USM cells, NARB⁺ cell differentiation

is suppressed toward activation-induced apoptosis. The reduction of cell viability in the presence of IL-21 is not restrained to NARB⁺ cells but is a feature of the whole naive compartment. Intracellular STAT and PI3K signaling analysis of the different populations following stimulation demonstrated that the NARB⁺ subset exists in a pre-activated state. This finding challenged the belonging of this subset to the Ag-inexperienced compartment. Although our data could not trace the trajectory of NARB⁺ differentiation, the phenotypic observations seemed to place this subset in a developmental continuum from naive B cells to MBC. However, another complementary point of view will be to see NARB⁺ cells as circulating innate progenitors of the MZ response. Thus, NARB⁺ cells could be assimilated to a MZP subset, however, the IL-21 typical response observed *in vitro* suggested that NARB⁺ cells are not fully committed to MZ differentiation and may keep the ability to follow the follicular response in a specific environment. The addition of CD40L signaling to the IL-21 activation cocktail is in favor of this idea, with almost entire cell recovery and entry into the cell cycle. At this stage, we could only speculate on this putative cell pivotal state but its existence in secondary lymphoid organs suggested active participation of the immune response. Furthermore, our mass cell imaging analyses revealed that NARB⁺ cells seem interact more specifically with innate cells (neutrophils and macrophages) in the spleen, and with pre-LTfh in tonsils and in the gut. These data supported that NARB⁺ cells have specific cell-cell interactions according to their tissue localization that might shape their ultimate function. CD27^{dim} MBCs were recently described as enriched in infants and might not only represent a reservoir for CD27^{high} memory effectors but also might enter the GC reaction (56).

The NARB⁺ cells described in this report presented similar functional attributes, suggesting a developmental relationship.

IL-21 production is one of the hallmarks of LTfh identity and is related to the control of the GC B-cell response (39). However, the IL-21 activity area is not restrained to the follicular response, and BCL6⁺ PD1^{low} helper T cells located at the T-B border could contribute to the EF response. There was a defect of EF plasma cells in IL-21R and IL-21 knockout mice. It was further proposed that IL-21 could act at the stage of T–B interaction to accelerate B-cell activation before their differentiation into GC cells or to promote EF PB differentiation (6). More recently two LTfh effector stages were described according to their spatial positioning in secondary lymphoid organs. EF LTfh cells (PD1^{low}) produce high levels of IL-21 and low levels of CXCL13 compared with GC PD1^{high} CXCR5^{high} LTfh cells (57). Therefore, IL-21 availability appears as a key element in the initial activation of B cells (58). Our data demonstrated that IFN- α could bypass the IL-21 dependent restriction of PB differentiation in NARB⁺ cells. Early viral responses are mediated by the EF pathway and rely on type I IFN activation (59). Precise components of the EF B-cell responses are still not fully understood, and recently EF effector B cells with pathogenic activity were described in patients with systemic lupus erythematosus expressing CD11c and T-BET. ANav B cells are the precursors of autoreactive CXCR5⁻ CD11c⁺ cells (DN2) and EF PB (60), and their development may be related to an aberrant IFN- γ and IL-21 environment. Our phenotypic analysis showed that NARB⁺ were a distinct subset from the aNav B cells, as they did not express T-BET and seemed not to be chronically activated (normal expression of CD21 and CD19). Those observations

were in favor of a physiological non-pathogenic subset; however, we could not assume any functional relationship between the different EF precursor populations and how they might interact. The control of the EF response and the reactivation of natural innate or chronically activated B cells appear essential in autoimmunity and acute viral infections such as SARS-CoV2 or influenza (61). The convergent and balanced existence of different EF progenitors could participate in the homeostasis of a such response, providing protective rapid immunity but which could lead to an exacerbated inflammatory response (9). In this regard, innate MZB cell (USM) differentiation seems impaired in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome (63). Therefore, elucidation of the cellular and molecular actors controlling the initial B-cell activation toward MZB or FO developmental pathway would be promising for better care of systemic autoimmune diseases and hyper-inflammatory syndromes.

FIGURES LEGENDS

Fig 1 . Assessment of the responsiveness of each B-cell subset primed with IL-2, anti-Ig, and CpG.

(A) Representative flow cytometry plots of CD38 and CD27 expression on CD19⁺ B cells. Three populations, observed after stimulation (priming), are gated: CD27^{high} CD38^{high} B cells (PBs, plasmablasts in black), CD27⁺ CD38^{int} (Int, intermediate B cells in dark grey), CD27⁻ CD38⁺ (Act, activated B cells in light grey). Mean \pm SEM percentages (below) of Act, Int and PBs in each B-cell subset. (N= 5 to 14) (B) Assessment by ELISPOT of the Ig secretory function in primed B cells. The right plot depicted the percentages of IgM-(blue), IgA-(yellow), IgG-(red) secreting B cells (C) Representative flow cytometry plots of IRF4 and IRF8 intracellular staining. Black gates depicted IRF4⁺ IRF8^{low} differentiated B cells and grey gates the IRF4^{low} IRF8⁺ activated B cells. Mean \pm SEM percentages (right) of IRF4⁺ IRF8^{low} B cells. Data are representative of N= 14 (NA); N= 5 (DN); N= 7 (USM), and N= 11 (SM) independent experiments. Below are the histogram overlays of the expression of BLIMP1 in IRF4⁺ IRF8^{low} (black) and IRF4^{low} IRF8⁺ (grey) populations. Statistical significance in (A, C) was determined by a one-way paired ANOVA test using Tukey's correction for multiple comparisons. Error bars indicate mean \pm SEM. ** p<0.01, *** p<0.001. NA: Naive B cells, USM: Unswitched memory B cells, SM: Switched memory B cells, DN: Double-negative B cells.

Fig 2. Effects of IL-21 and IFN- α on B-cell responses.

(A) Representative differentiation profile of the four primed B-cell subsets cultured in the presence or not of IFN- α or IL-21. (B) Mean \pm SEM of IRF4⁺ IRF8^{low} B cells generated in the different cultures of primed B-cell subsets cultured in the presence

or not (dark grey) of IFN- α (blue) or IL-21 (orange). Data are representative of N= 14 (NA), N= 12 (SM), N= 9 (USM) and N= 4 (DN) independent experiments. **(C)** Annexin-V/Propidium Iodure (PI) representative cytometry data of primed NA B cells cultured or not with IFN- α (blue) or IL-21 (orange). **(D)** Mean \pm SEM viable Annexin-V⁻ PI NA and SM primed (dark grey) B cells cultured in the presence or not of IFN- α (blue) or IL-21 (orange). Data are representative of 4 to 7 independent experiments. Statistical significance was determined by paired Wilcoxon paired t-test. **(E)** Assessment of the proliferation of primed NA and SM B cells (left) cultured in the presence or not of IFN- α (blue) or IL-21 (orange). The right panel depicted the mean \pm SEM division index (N= 3 independent experiments). **(F)** Mean \pm SEM CD11c geometric mean intensity (gMFI) in NA (left) and SM B cells (right) at day 0 (D0, white) and after stimulation (primed) in the presence or not (dark grey) of IFN- α (blue) or IL-21 (orange). N= 8 to 10 independent experiments. **(G)** Representative flow cytometry plots of T-BET and BLIMP-1 expression analyzed by intracellular flow cytometry **(H)** Mean \pm SEM geometric mean for T-BET expression on B cells in the different culture conditions. Data are representative of 3 (D0) to 8 independent experiments, and statistical significance was determined by ANOVA test with Tukey' correction. NA: Naive B cells, USM: Unswitched memory B cells, SM: Switched memory B cells, DN: Double-negative B cells.

Fig 3 . Transcriptional programs induced by IFN- α and IL-21 in naive and switched memory primed B cells.

(A) Unsupervised hierarchical clustering of gene expression in NA and SM cells at resting state (No stim), after stimulation in the presence or not of IFN- α or IL-21. **(B)** Heatmap of the principal component 1 and principal component 2 associated pathway

from the PGSEA analysis. (C) Volcano plot of DEGs between NA primed B cells (NA_{Primed}) and NA cells primed in the presence of IL-21 (NA_{IL21}). (D) Heatmap of important genes differentially expressed between NA primed B cells in the presence of IFN- α (NA_{IFN}) versus IL-21 (NA_{IL21}). (E) Plot of Gene Ontology (GO) pathway enrichment of the genes only upregulated by the addition of IL-21 in NA primed cells. (F) Gene set enrichment analysis (GSEA) (upper), genes in major pathways (middle), and MSigDB pathway enrichment of the IL-21 signature in NA cells (bottom). NA: Naive B cells, SM: Switched memory B cells.

Fig 4 . Phenotypic characterization of IgD⁺ CD27⁻ CD45RB⁺ cells using CyTOF and Flow cytometry.

(A) VisNE analysis of mass cytometry data performed on B cells from whole blood of healthy control (concatenate files from 5 donors). (B) FlowSOM clustering with the representation of the 15 meta-clusters on the t-SNE map and heatmap of expression density of IgD, CD27, and CD45RB markers (below). (C) Manual gating of the major peripheral B-cell subsets loaded on the t-SNE plots and heatmap of expression density of selected markers (below). (D) Mean \pm SEM of the percentage of transitional (Tr.), NARB⁺, USM, SM, and DN subsets in B cells. Data are from 18 independent donors. (E) The extended phenotype of NARB⁺ cells compared to NARB⁻, USM and SM B cells performed by flow cytometry. NA: Naive B cells, NARB^{+/-}: CD45RB^{+/-} naive B cells, aNav: activated naive B cells, USM: Unswitched memory B cells, SM: Switched memory B cells, DN: Double-negative B cells.

Fig 5. NARB⁺ cells are non-committed precursors of innate plasmablasts and localized in secondary lymphoid organs.

(A) NARB⁺ B-cell sorting purity. (B) Representative FACS plots of IRF4 and IRF8 intracellular staining in NARB⁻ and NARB⁺ primed in the presence or not of IL-21. Black gates indicate IRF4⁺ IRF8^{low} differentiated B cells. (C) Kinetics of apoptotic annexin-V⁺ B cells in NARB⁻ and NARB⁺ stimulated in the presence (orange line) or not (grey line) of IL-21, evaluated by live-cell imaging. (D) The t-SNE plot was performed on individual cell files (FCS) obtained from imaging mass cytometry data from spleen, gut, and tonsil tissue sections. (E) FlowSOM clusters were loaded the t-SNE plots in gut, spleen, and tonsil tissues together with NARB⁺ cells previously manually gated. (F) Heatmap view of the neighborhood analysis of NARB⁺ cells in the tonsil and spleen. Representative images of BCL6⁺, NARB⁺ and CD4⁺ cells in the tonsil, and MPO⁺, CD68⁺, and NARB⁺ in the spleen. The dashed square lines identified cell-cell interactions. All data were generated with histoCAT tool and Cytobank.

Fig 6. NARB⁺ cells present a unique phosphorylated STATs profile.

(A) Fold increase of pSTAT3 (Y705) (left) and pSTAT1 (S701) (right) in primed NARB⁻, NARB⁺, USM, and SM subsets cultured in the presence or not of IL-21 at 5, 10, 30 and 90 min. (B) Representative flow cytometry plots of pSTAT3 (left) and pSTAT1 (right) in primed NARB⁺, NARB⁻, USM, and SM B-cell subsets (grey line) cultured in the presence (orange line) or not of IL-21. Fold increase of pSTAT3 and pSTAT1 compared to the primed stimulation (N= 3). (C) Fold increase of pAKT (S473) in primed NARB⁻, NARB⁺, USM et SM B-cell subsets (left) cultured in the presence (middle) or not of IL-21 at 5-, 10-, 30- and 90-min. Representative flow cytometry plots of pAKT (right) in primed NARB⁻, NARB⁺, USM et SM subsets

(grey line) cultured in the presence (orange line) or not of IL-21 (N= 3). NA: Naive B cells, NARB^{+/+}: CD45RB^{+/+} naive B cells, aNav: activated naive B cells, USM: Unswitched memory B cells, SM: Switched memory B cells.

Fig 7. NARB⁺ differentiation was not restored by the inhibition of apoptosis but with innate signals.

(A) Real-time PCR of *BCL2*, *IL6*, *IL6R*, *IL10* and *TNFSF13B* gene expression in primed NA cells in the presence (orange) or not (black) of IL-21. (B) Representative flow cytometry plots of IL-6⁺ cells in NARB⁻, NARB⁺ and SM B cells at steady state. (C) Representative flow cytometry plots of IL-6⁺ and IL-10⁺ cells in NARB⁻, NARB⁺, and SM B-cell primed subsets cultured in the presence or not of IL-21. (D) Histograms of IL-6⁺ and IL-10⁺ B cells in primed-NA and primed-SM (black) cultured or not with IL-21 (orange). (E) Percentage of annexin V⁻ PI⁻ viable cells in primed NA B cells cultured in the presence or not of IL-21, with or without addition of IL-6 (left) or IL-10 (middle). Right plot depicted the fold increase of IRF4⁺IRF8^{low} B cells compared to the primed stimulation. (F) Representative plot of AnnexinV/PI staining of NA cells primed cultured in the presence of IL-21, CD40 stimulation (CD40L) or preincubated with the pan-caspase inhibitor (ZVAD) before the culture in the presence of IL-21 (G) Representative flow cytometry plots of IRF4 and IRF8 intracellular expression in primed NA cells cultured in the presence or not of IL-21, CD40 stimulation or pan-caspase inhibitor (ZVAD) (H) Percentage of AnnexinV⁻ PI⁻ viable cells in primed NA B cells cultured in the presence or not of IL-21 with or without the addition of IFN- α . Middle panel depicted the fold increase of IRF4⁺IRF8^{low} B cells compared to the primed stimulation. The right panel depicted

representative flow cytometry plots of. NA: Naive B cells, NARB^{+/-}: CD45RB^{+/-} naive B cells, SM: Switched memory B cells.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

CONTRIBUTORSHIP

M.B, L.L.P, and S.H designed the study, performed experiments, analyzed data, and wrote the paper. M.B, M.M.C, and P.H performed experiments and analyzed data. A.G, CLD and E.P performed RNA sequencing experiments and analyzed data. D.C, C.J, V.D and J-O.P discussed data and edited the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the Cytometry Core Facility Hyperion (Brest, France) for their technical assistance. We thank Nadège Marec and Pierre Pochard for the assistance in cell sorting, and Patrice Hémon for the HYPERION and CYTOF experiments.

FUNDING INFO

This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d’Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR)".

ETHICAL APPROVAL INFORMATION

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by ethical committees.

DATA SHARING STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the first and the corresponding authors upon request: sophie.hillion@univ-brest.fr, marina.boudigou@univ-brest.fr

BIBLIOGRAPHY

1. Weisel F, Shlomchik M. Memory B Cells of Mice and Humans. *Annual review of immunology*. 2017;35:255-84.
2. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*. 2017;16:41-50.
3. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381(6585):751-8.
4. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2065-75.
5. Reynaud CA, Descatoire M, Dogan I, Huetz F, Weller S, Weill JC. IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;69(10):1625-34.
6. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7):1377-88.
7. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):118-32.
8. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(4):1081-91.
9. Grasseau A, Boudigou M, Le Pottier L, Chriti N, Cornec D, Pers JO, et al. Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2020;58(1):92-106.
10. Recher M, Berglund LJ, Avery DT, Cowan MJ, Gennery AR, Smart J, et al. IL-21 is the primary common gamma chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood*. 2011;118(26):6824-35.
11. Tangye SG, Ma CS. Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21. *The Journal of experimental medicine*. 2020;217(1).
12. Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(1):155-71.

13. Pinto AK, Ramos HJ, Wu X, Aggarwal S, Shrestha B, Gorman M, et al. Deficient IFN signaling by myeloid cells leads to MAVS-dependent virus-induced sepsis. *PLoS pathogens*. 2014;10(4):e1004086.
14. Durbin JE, Fernandez-Sesma A, Lee CK, Rao TD, Frey AB, Moran TM, et al. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *Journal of immunology*. 2000;164(8):4220-8.
15. Cervantes-Barragan L, Zust R, Weber F, Spiegel M, Lang KS, Akira S, et al. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood*. 2007;109(3):1131-7.
16. Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *Journal of immunology*. 2007;178(6):3822-30.
17. Domeier PP, Chodiseti SB, Schell SL, Kawasawa YI, Fasnacht MJ, Soni C, et al. B-Cell-Intrinsic Type 1 Interferon Signaling Is Crucial for Loss of Tolerance and the Development of Autoreactive B Cells. *Cell reports*. 2018;24(2):406-18.
18. Zumaquero E, Stone SL, Scharer CD, Jenks SA, Nellore A, Mousseau B, et al. IFN γ induces epigenetic programming of human T-bet(hi) B cells and promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation. *eLife*. 2019;8.
19. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(12):2739-53.
20. Lam JH, Baumgarth N. The Multifaceted B Cell Response to Influenza Virus. *Journal of immunology*. 2019;202(2):351-9.
21. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2018;49(4):725-39 e6.
22. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2458.
23. Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, et al. IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nature communications*. 2017;8(1):1443.
24. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *Journal of immunology*. 2008;181(3):1767-79.

25. Auladell M, Nguyen TH, Garcillan B, Mackay F, Kedzierska K, Fox A. Distinguishing naive- from memory-derived human B cells during acute responses. *Clinical & translational immunology*. 2019;8(11):e01090.
26. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 2009;114(25):5173-81.
27. Carotta S, Willis SN, Hasbold J, Inouye M, Pang SH, Emslie D, et al. The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(11):2169-81.
28. Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science*. 2011;331(6021):1203-7.
29. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000;408(6808):57-63.
30. Wan CK, Oh J, Li P, West EE, Wong EA, Andraski AB, et al. The cytokines IL-21 and GM-CSF have opposing regulatory roles in the apoptosis of conventional dendritic cells. *Immunity*. 2013;38(3):514-27.
31. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *Journal of immunology*. 2004;173(1):657-65.
32. Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *Journal of immunology*. 2003;170(8):4111-8.
33. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *Journal of immunology*. 2005;175(12):7867-79.
34. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunological reviews*. 2018;283(1):138-49.
35. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nature reviews Immunology*. 2020;20(4):229-38.
36. Wang S, Wang J, Kumar V, Karnell JL, Naiman B, Gross PS, et al. IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE. *Nature communications*. 2018;9(1):1758.
37. Kim SY, Volsky DJ. PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC bioinformatics*. 2005;6:144.

38. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(2):365-78.
39. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(2):353-63.
40. Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, et al. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nature immunology*. 2017;18(3):303-12.
41. Piovesan D, Tempany J, Di Pietro A, Baas I, Yiannis C, O'Donnell K, et al. c-Myb Regulates the T-Bet-Dependent Differentiation Program in B Cells to Coordinate Antibody Responses. *Cell reports*. 2017;19(3):461-70.
42. Pal R, Janz M, Galson DL, Gries M, Li S, Johrens K, et al. C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood*. 2009;114(18):3890-8.
43. Glass DR, Tsai AG, Oliveria JP, Hartmann FJ, Kimmey SC, Calderon AA, et al. An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity*. 2020;53(1):217-32 e5.
44. Weisel NM, Weisel FJ, Farber DL, Borghesi L, Shen Y, Ma W, et al. Comprehensive analyses of B cell compartments across the human body reveal novel subsets and a gut resident memory phenotype. *Blood*. 2020.
45. Koethe S, Zander L, Koster S, Annan A, Ebenfelt A, Spencer J, et al. Pivotal advance: CD45RB glycosylation is specifically regulated during human peripheral B cell differentiation. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(1):5-19.
46. Descatoire M, Weller S, Irtan S, Sarnacki S, Feuillard J, Storck S, et al. Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(5):987-1000.
47. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2015;87(7):636-45.
48. Tipton CM, Hom JR, Fucile CF, Rosenberg AF, Sanz I. Understanding B-cell activation and autoantibody repertoire selection in systemic lupus erythematosus: A B-cell immunomics approach. *Immunological reviews*. 2018;284(1):120-31.
49. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood*. 2007;109(10):4135-42.

50. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, et al. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*. 2009;139(3):573-86.
51. Hikida M, Casola S, Takahashi N, Kaji T, Takemori T, Rajewsky K, et al. PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(3):681-9.
52. Viant C, Weymar GHJ, Escolano A, Chen S, Hartweger H, Cipolla M, et al. Antibody Affinity Shapes the Choice between Memory and Germinal Center B Cell Fates. *Cell*. 2020.
53. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002;298(5601):2199-202.
54. Kato Y, Abbott RK, Freeman BL, Haupt S, Groschel B, Silva M, et al. Multifaceted Effects of Antigen Valency on B Cell Response Composition and Differentiation In Vivo. *Immunity*. 2020;53(3):548-63 e8.
55. Zhao Y, Uduman M, Siu JHY, Tull TJ, Sanderson JD, Wu YB, et al. Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nature communications*. 2018;9(1):3857.
56. Grimsholm O, Piano Mortari E, Davydov AN, Shugay M, Obratzsova AS, Bocci C, et al. The Interplay between CD27(dull) and CD27(bright) B Cells Ensures the Flexibility, Stability, and Resilience of Human B Cell Memory. *Cell reports*. 2020;30(9):2963-77 e6.
57. Durand M, Walter T, Pirnay T, Naessens T, Gueguen P, Goudot C, et al. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *The Journal of experimental medicine*. 2019;216(7):1561-81.
58. Shlomchik MJ, Weisel F. B cell primary immune responses. *Immunological reviews*. 2019;288(1):5-9.
59. Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B Cell Activation and Response Regulation During Viral Infections. *Viral immunology*. 2020;33(4):294-306.
60. Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, Gregoret I, et al. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nature immunology*. 2015;16(7):755-65.
61. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nature immunology*. 2020;21(12):1506-16.

62. Tull TJ, Pitcher MJ, Guesdon W, Siu JHY, Lebrero-Fernández C, Zhao Y, et al. Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. *The Journal of experimental medicine*. 2021;218(4):e20202001.
63. Roberts ME, Kaminski D, Jenks SA, Maguire C, Ching K, Burbelo PD, et al. Primary Sjögren's syndrome is characterized by distinct phenotypic and transcriptional profiles of IgD⁺ unswitched memory B cells. *Arthritis Rheumatology*. 2014;66(9):2558-69.
64. Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, et al. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods*. 2019;16(12):1226-1232.
65. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamentsky L, Cimini BA, Karhohs KW, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biology*. 2018;16(7):e2005970.

Figure 1

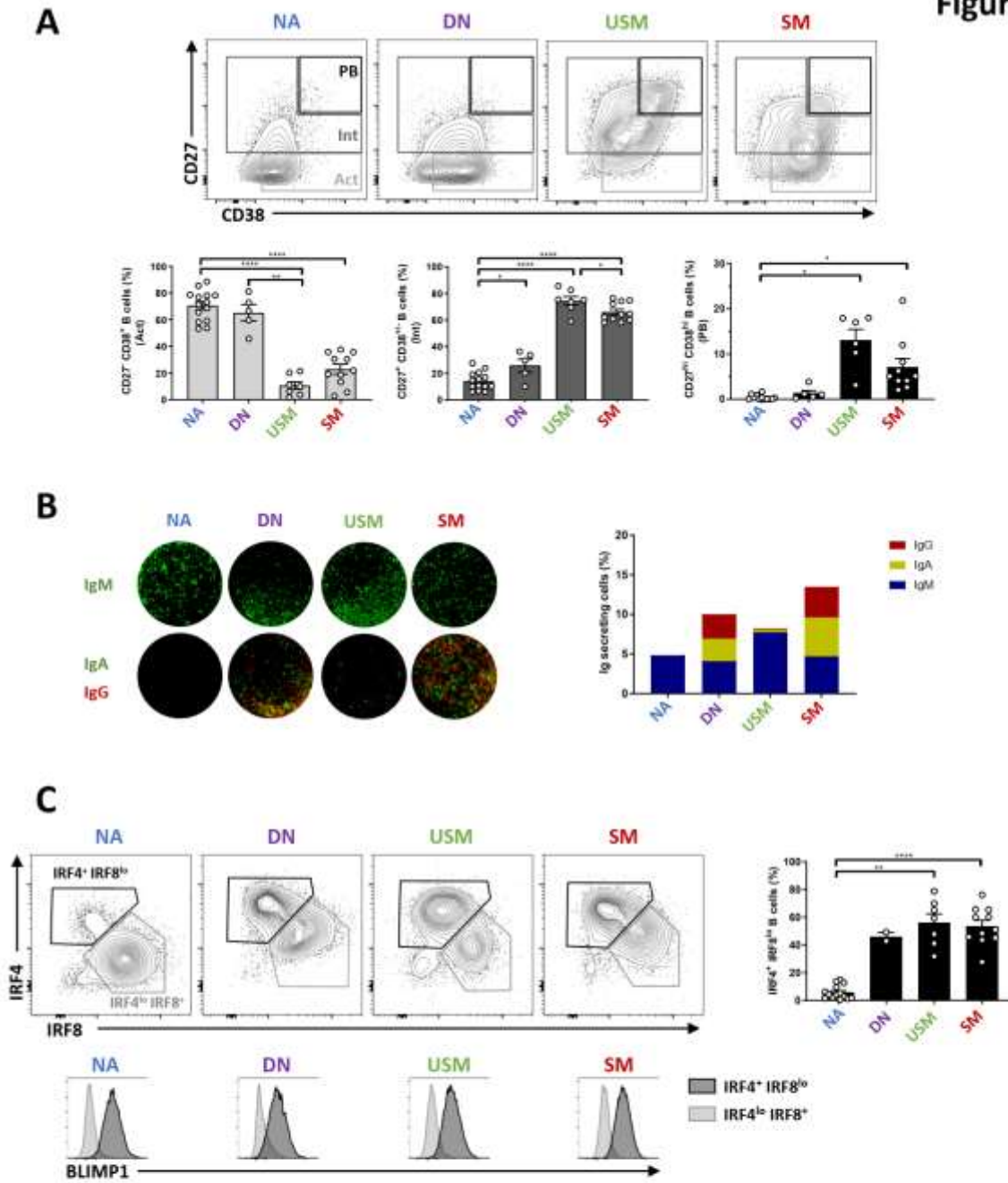


Figure 2

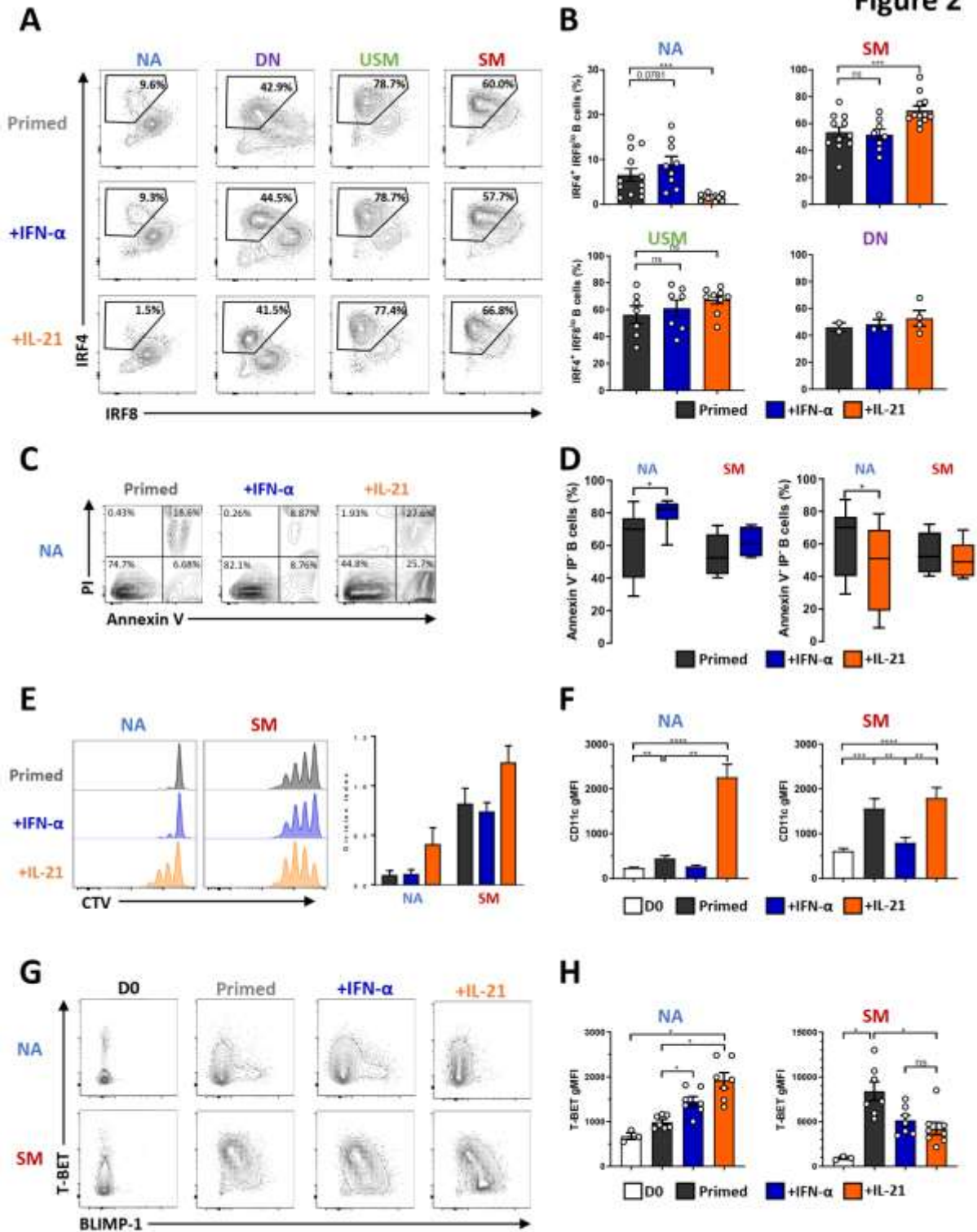


Figure 3

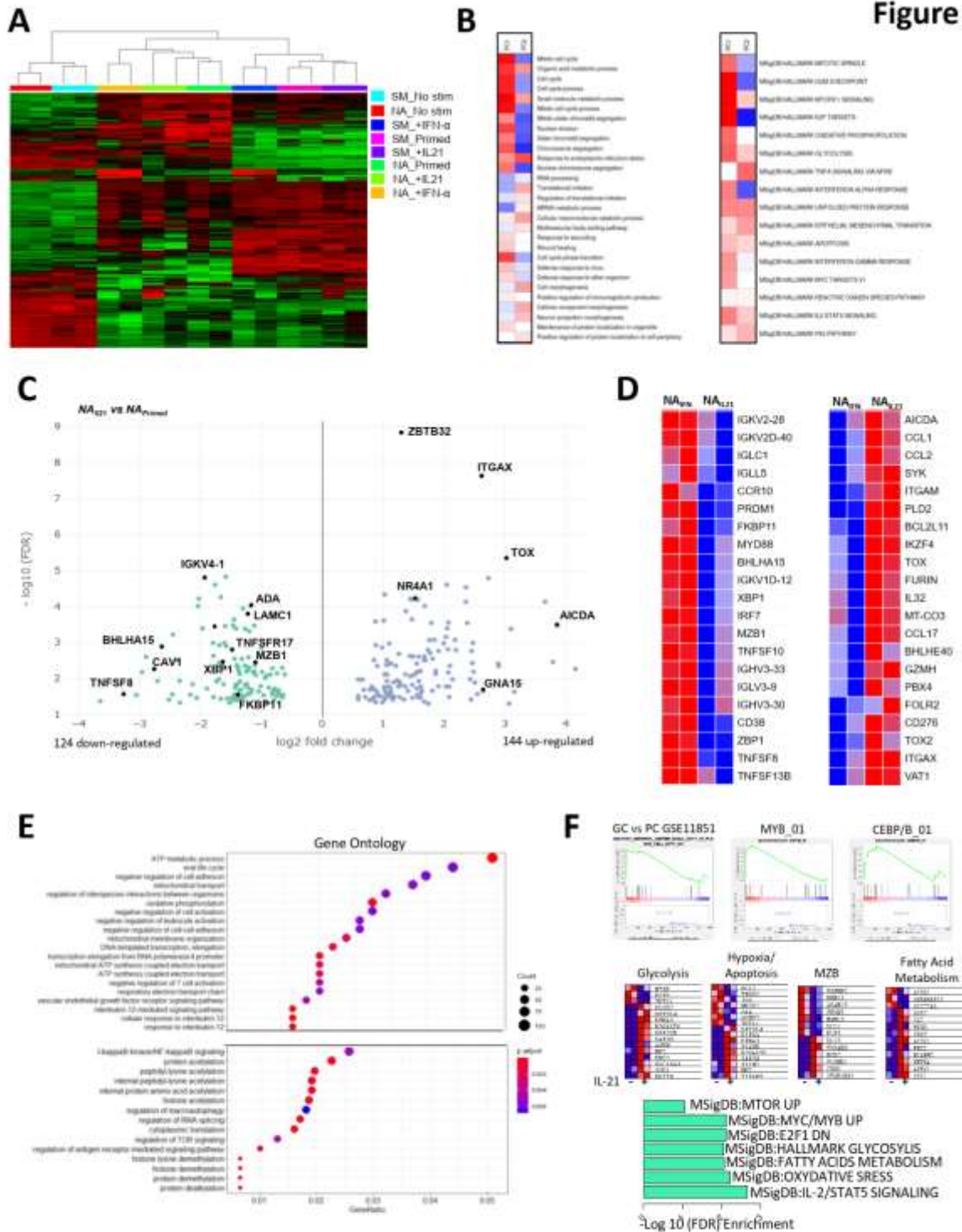


Figure 4

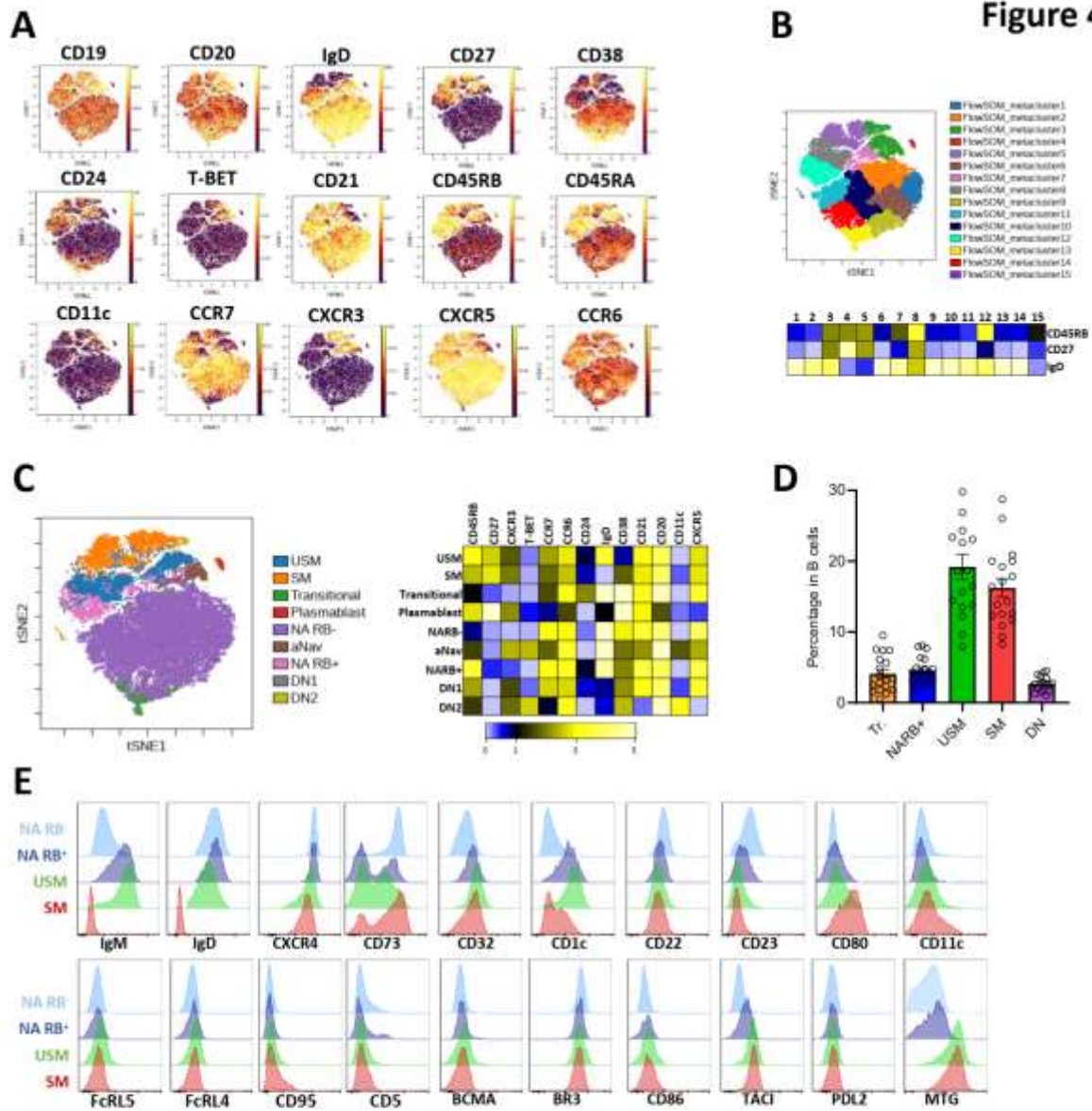


Figure 5

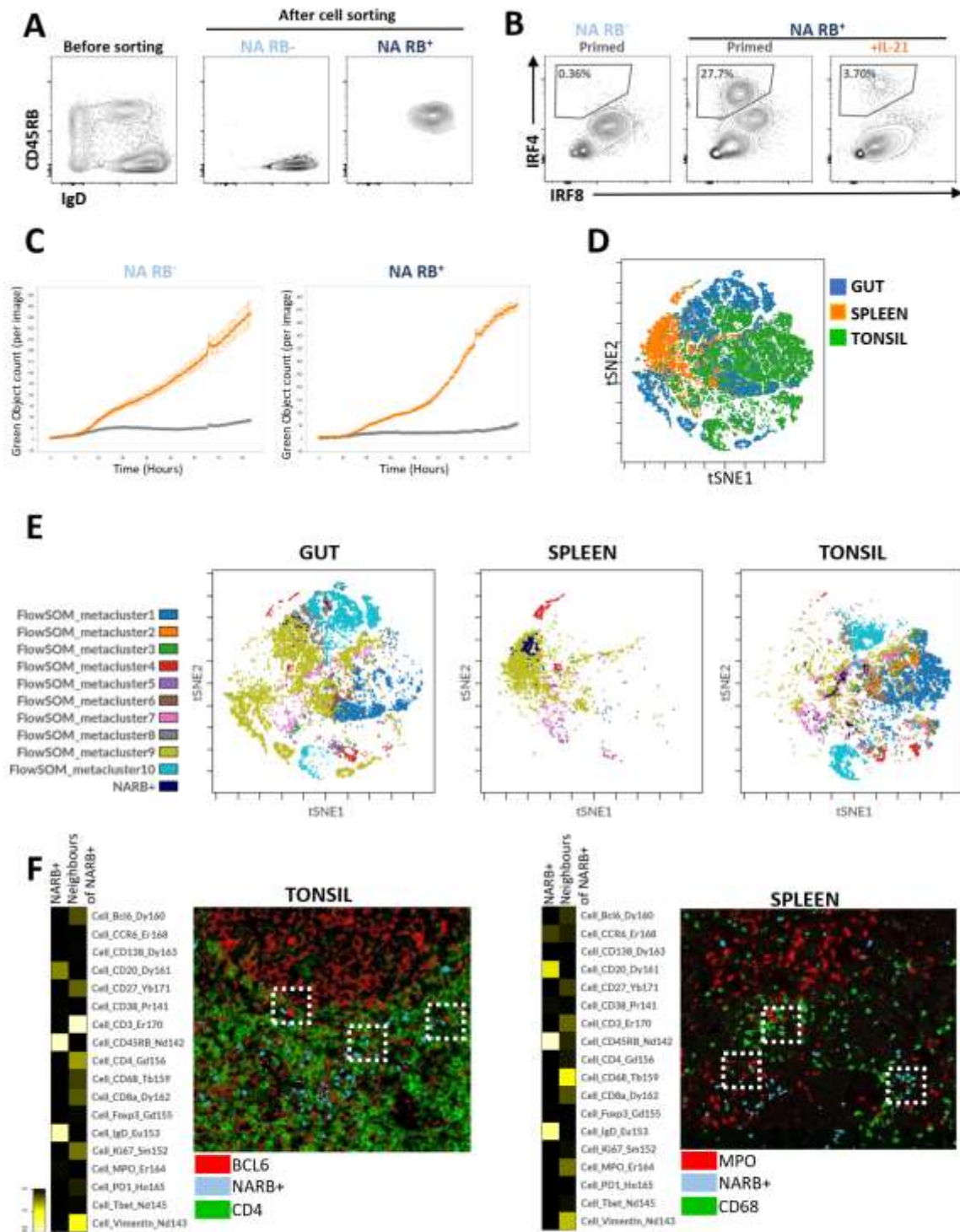


Figure 6

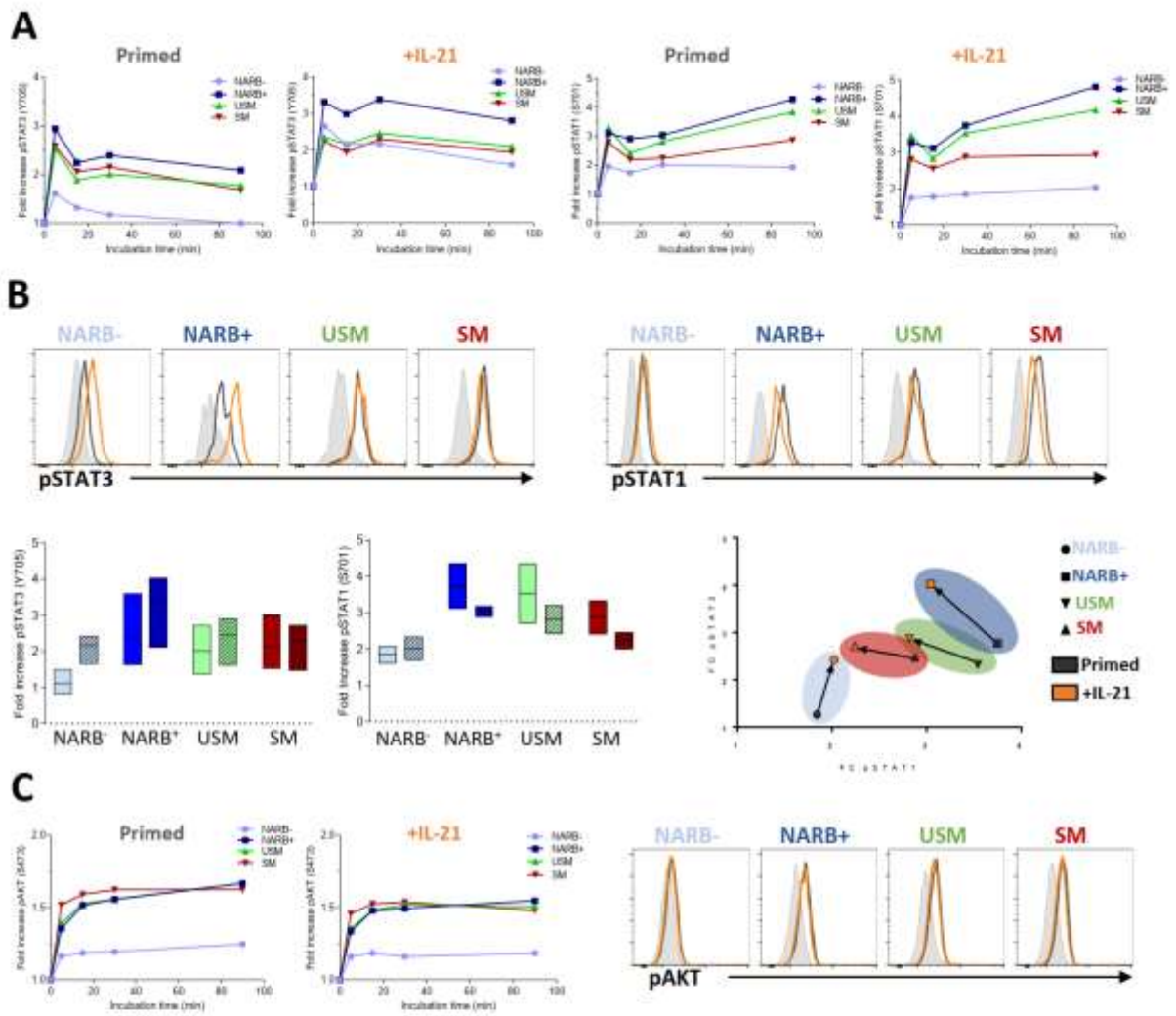
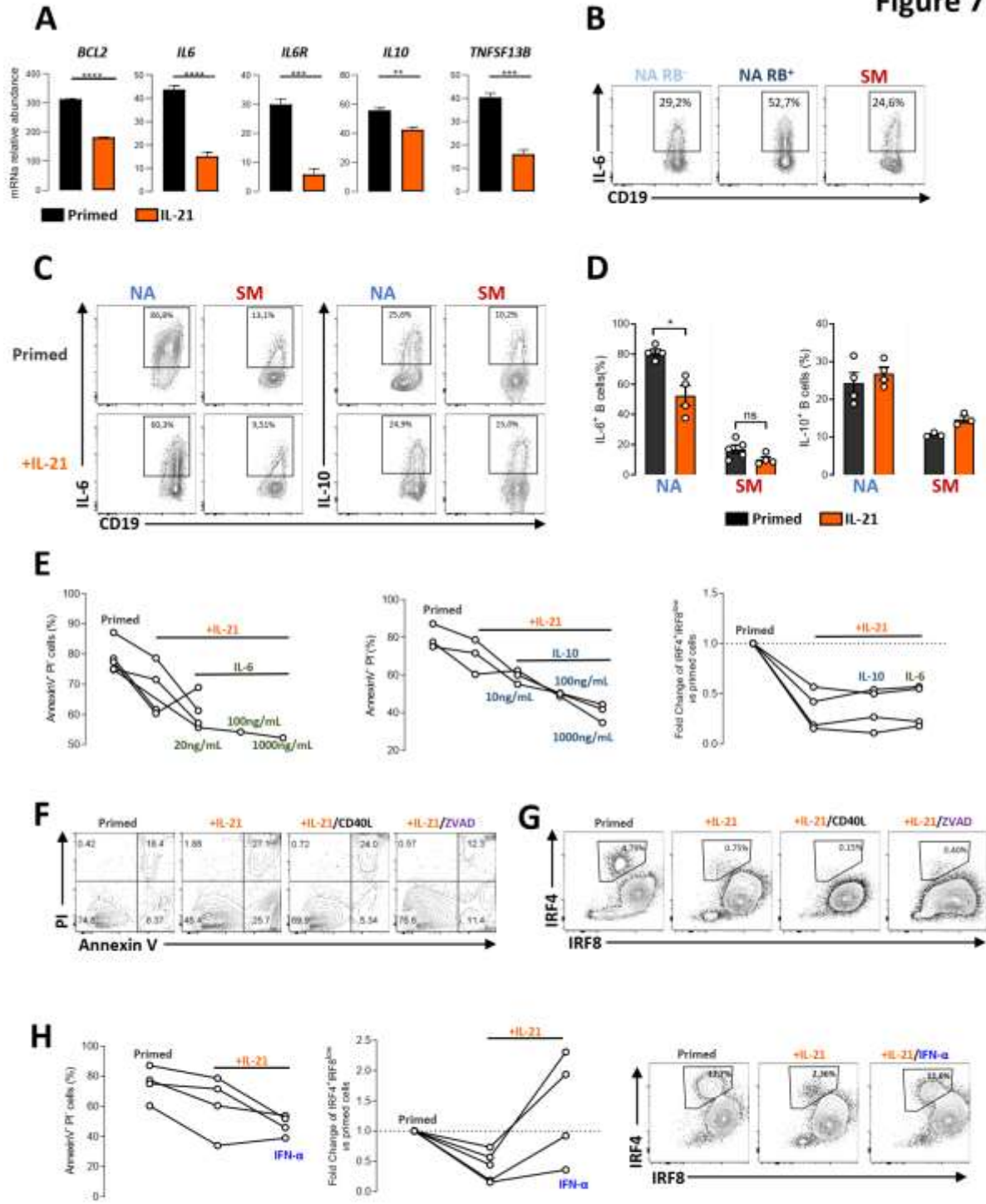


Figure 7



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Fig.S1 Sort strategy and analysis of sorted B-cell functional responses in presence of IFN- α or IL-21

(A) Gating strategy and cell sorting verification of the four B-cell subsets (NA, USM, SM and DN). (B) Assessment of Ig secretory function by ELISPOT in primed B-cell subsets cultured in the presence or not of IFN α or IL-21. Percentages of IgM-(blue), IgA-(yellow), IgG-(red) secreting B cells from NA, USM and SM-primed B cells. (C) Evolution of the percentage of IRF4⁺ IRF8^{low} B cells in primed NA (blue) and primed SM (red) B cells cultured in the presence (dashed lines) or not (solid lines) of IL-21 (D) Kinetics of the apoptosis (AnnexinV-FITC positive B cells) in primed NA B cells cultured in the presence (orange line) or not (grey line) of IL-21. (E) Mean \pm SEM BLIMP1 geometric mean intensity (gMFI) on NA (left) and SM B cells (right) at day 0 (D0) (white) and cultured (primed, dark grey) in the presence or not of IFN- α (blue) or IL-21 (orange). N=7 to 8 (for NA), and N=8 to 10 (for SM) independent experiments, and statistical significance was determined by ANOVA test with Tukey' correction. NA: Naive B cells, USM: Unswitched memory B cells, SM: Switched memory B cells, DN: Double-negative B cells.

Fig.S2 Transcriptional characterization of primed naive B cells in the presence of IL-21 by RNA sequencing

(A) Principal component analysis (PCA), PC1 (x-axis, 54 %) and PC2 (y-axis, 15 %) of gene counts from NA and SM B cells at day 0 (D0) and cultured in the presence or not of IFN- α or IL-21. (B) Clustering of up-regulated GO pathways from genes in primed NA in the presence of IL-21 *versus* primed NA only. (C) Heatmap of genes from IFN signaling differentially expressed between primed NA B cells in the presence of IFN- α (NA_{IFN}) *versus* in the presence of IL-21 (NA_{IL21}). (D) Venn diagrams of up-regulated genes (left) and down-regulated genes (right) between primed NA signature (primed NA *versus* NA at resting state (day 0), green) and in primed NA in the presence of IL-21 signature (+IL-21) (primed NA + IL-21 *versus* NA at resting state (day 0), yellow), characterizing the IL-21 signature. (E) KEGG pathway enrichment in primed NA in the presence of IL-21. (F)

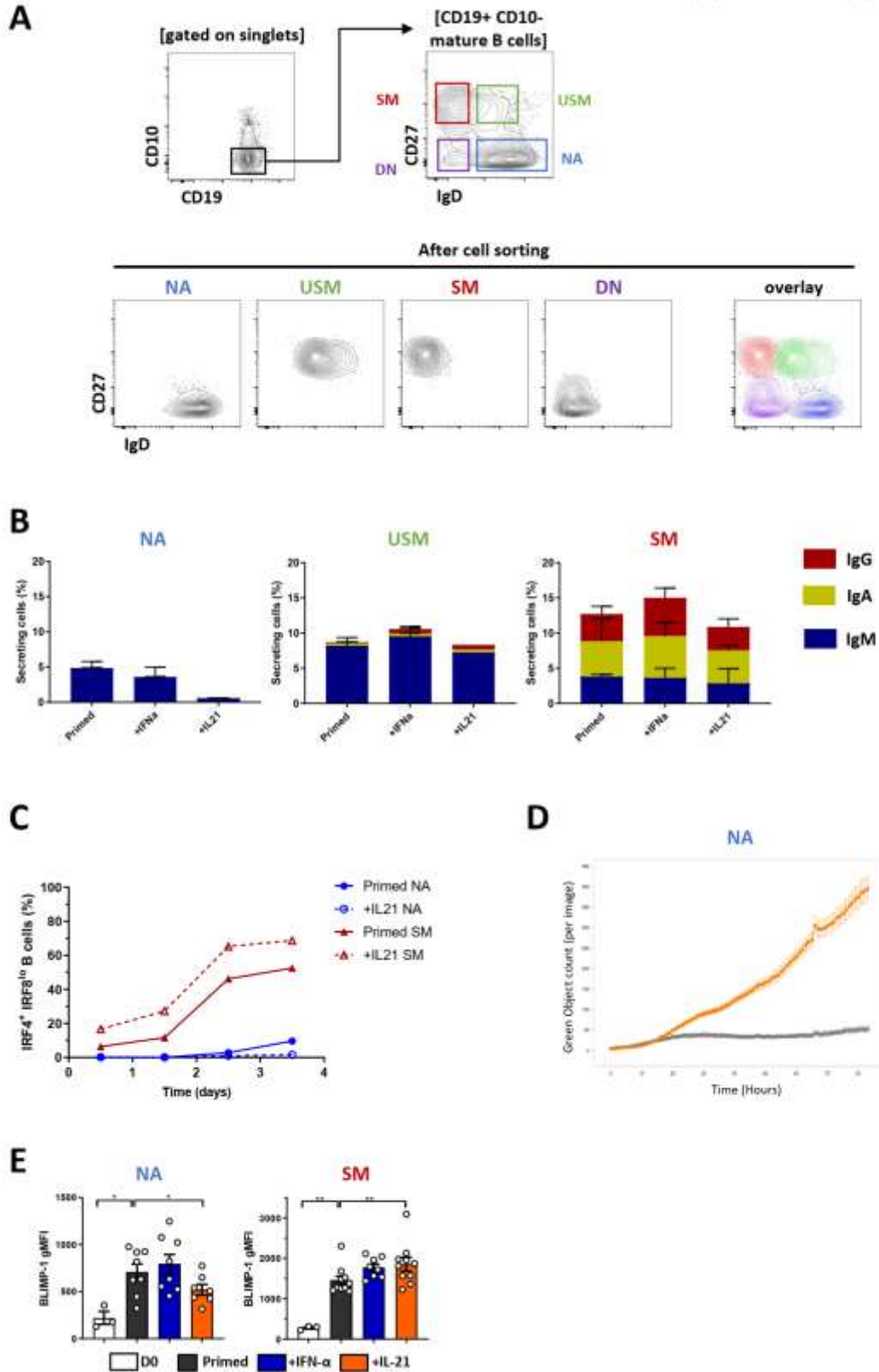
Volcano plot of DEGs between primed NA B cells in the presence of IL-21 (NA_{IL21}) and primed SM in the presence of IL-21 (SM_{IL21}). **(G)** Heatmap of important genes differentially expressed between primed NA B cells in the presence of IL-21 (NA_{IL21}) *versus* primed SM B cells in the presence of IL-21 (SM_{IL21}). NA: Naive B cells, SM: Switched memory B cells.

Fig.S3 Gating strategy of CyTOF analysis on B cells from whole blood of healthy donors.

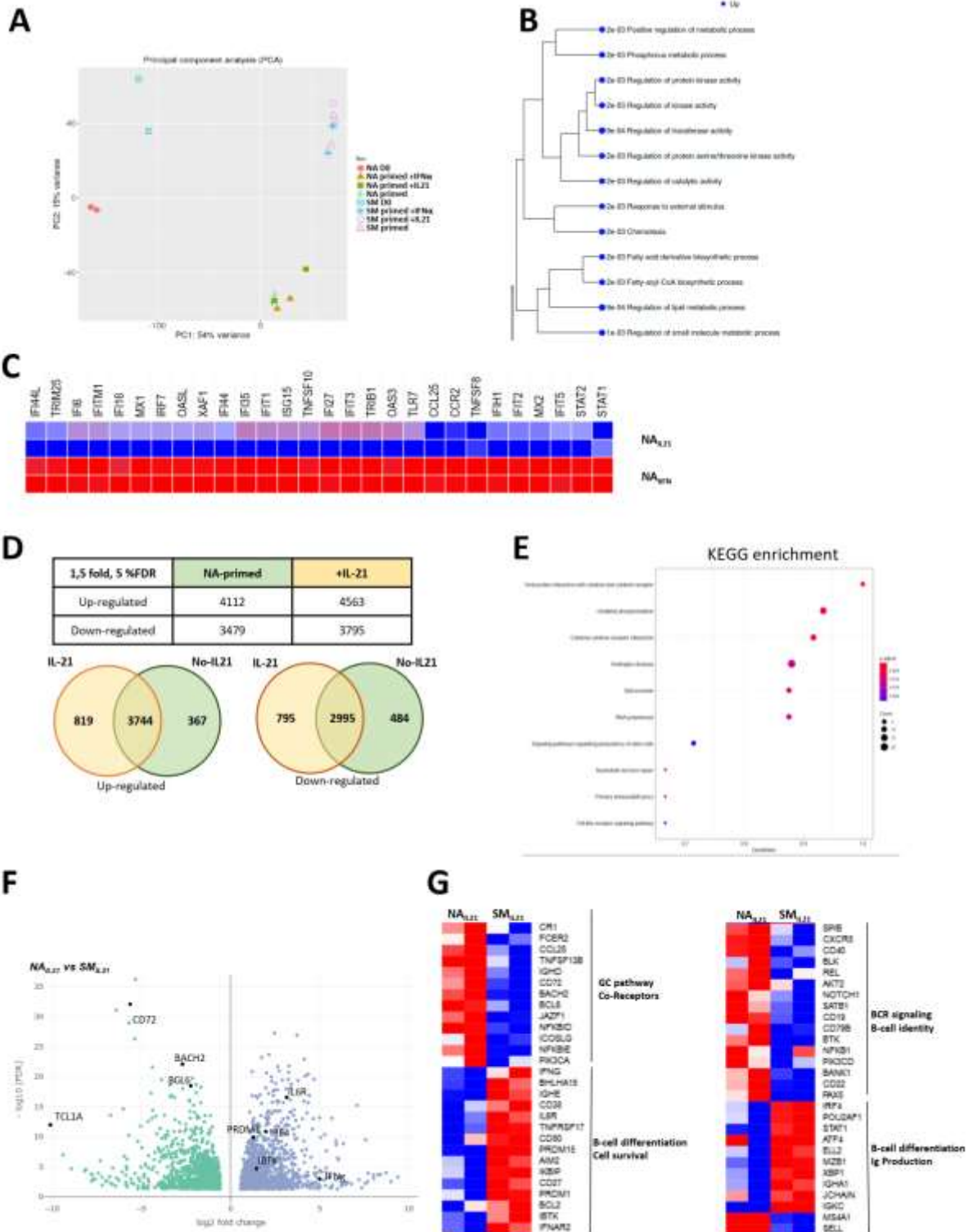
Fig.S4 Visualization of IgD⁺ CD27⁻ CD45RB⁺ (NARB⁺) cells and their neighborhood in tissues by imaging mass cytometry

(A) Expression of Ki67, CD45RB, CD27, IgD and PanKeratin in gut (left), in tonsil (middle) and spleen (right) with Hyperion mass imager. **(B)** Heatmaps of expression density of CCR6, CD138, CD20, CD45RB, IgD, Ki67, CD27, CD4, CD138, FOXP3, PD1, CD8a, CD68, ColII and MPO, PanKeratin and CD8a markers in the 10 meta-clusters obtained with FlowSOM clustering in gut (left), in spleen (middle), in tonsil (right). **(C)** Manual gating of the major cell subsets loaded on the t-SNE plots in gut (left), in spleen (middle), in tonsil (right): polymorphonuclear neutrophils (PMNs), germinal center B cells (GC), IgD⁺ CD27⁻ naive CD45RB⁺ B cells (NARB⁺) **(D)** Representative images of Ki67⁺ B cells, NARB⁺ B cells and CD4 T cells in the tonsil (left), and CD20⁺, NARB⁺, and CD4⁺ in the gut with the heatmap of NARB⁺. neighborhood analysis in the gut. dashed line squares identified cell interactions.

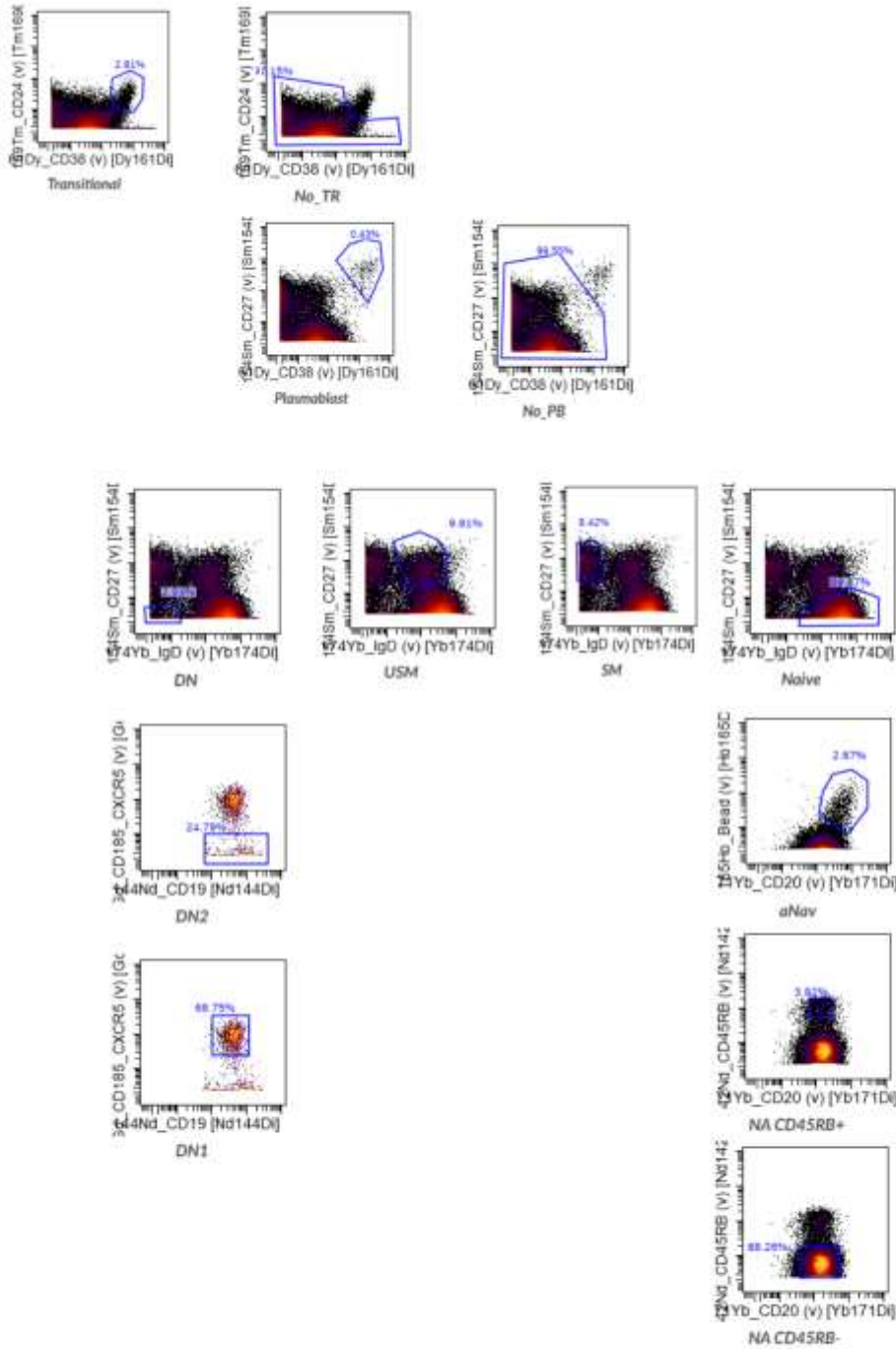
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

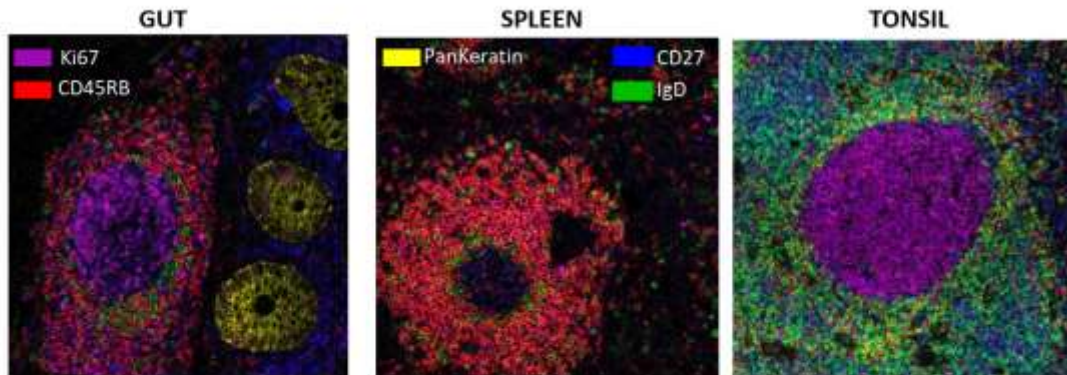


Supplementary Figure 3

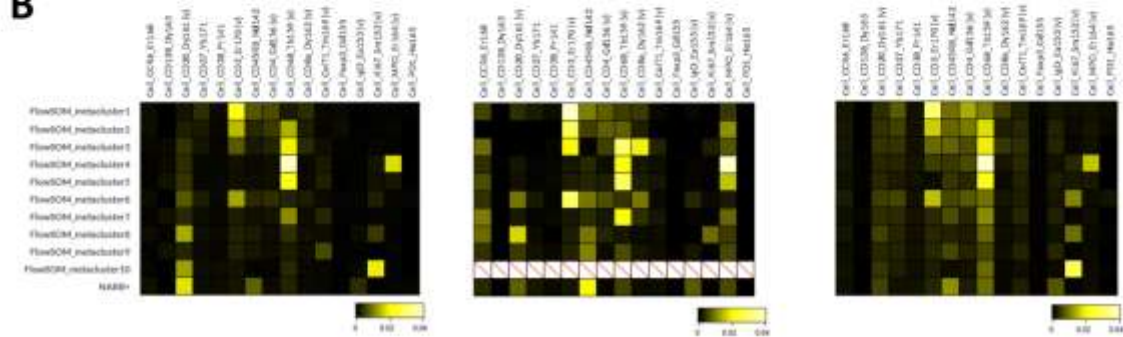


Supplementary Figure 4

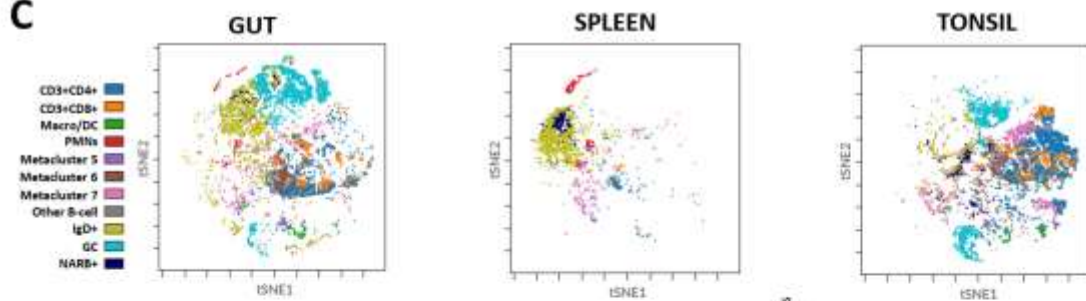
A



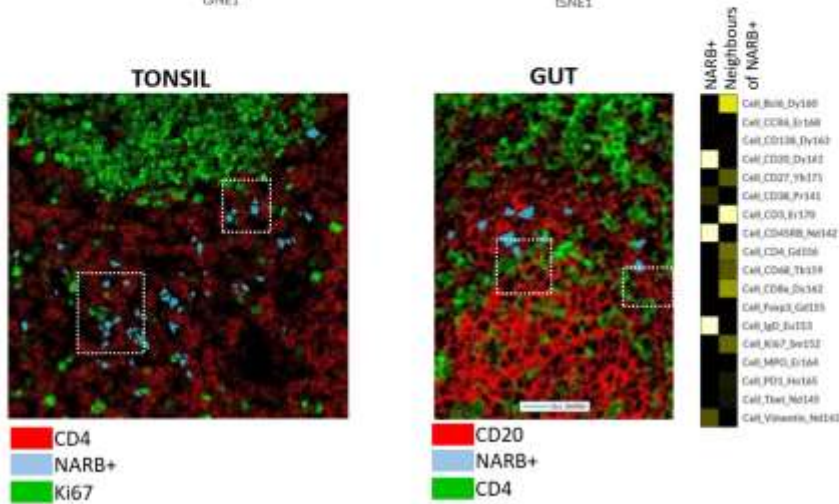
B



C



D



**ANNEXE 2 : THE DIVERSITY OF THE PLASMABLAST SIGNATURE
ACROSS SPECIES AND EXPERIMENTAL CONDITIONS : A META-
ANALYSIS**

The diversity of the plasmablast signature across species and experimental conditions: A meta-analysis

Alexis Grasseau¹ | Marina Boudigou¹ | Magalie Michée-Cospolite¹ | Céline Delaloy² | Olivier Mignen¹ | Christophe Jamin^{1,3} | Divi Cornec^{1,3} | Jacques-Olivier Pers^{1,3} | Laëtitia Le Pottier¹ | Sophie Hillion^{1,3} 

¹UMR1227, LBAI, INSERM, Univ Brest, Brest, France

²UMR U1236, INSERM, Etablissement Français du Sang (EFS) de Bretagne, Université de Rennes 1, Rennes, France

³UMR1227, LBAI, INSERM, CHU de Brest, Univ Brest, Brest, France

Correspondence

Sophie Hillion, UMR1227, LBAI, Brest University Medical School Hospital, BP824, F29609 Brest, France.
Email: sophie.hillion@univ-brest.fr

Senior author: Hillion Sophie

Funding information

This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n°ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program and by the ANR-18-CE15-0002-01 both managed by the French National Research Agency (ANR).

Abstract

Antibody-secreting cells (ASC) are divided into two principal subsets, including the long-lived plasma cell (PC) subset residing in the bone marrow and the short-lived subset, also called plasmablast (PB). PB are described as a proliferating subset circulating through the blood and ending its differentiation in tissues. Due to their inherent heterogeneity, the molecular signature of PB is not fully established. The purpose of this study was to decipher a specific PB signature in humans and mice through a comprehensive meta-analysis of different data sets exploring the PB differentiation in both species and across different experimental conditions. The present study used recent analyses using whole RNA sequencing in *prdm1*-GFP transgenic mice to define a reliable and accurate PB signature. Next, we performed similar analysis using current data sets obtained from human PB and PC. The PB-specific signature is composed of 155 and 113 genes in mouse and human being, respectively. Although only nine genes are shared between the human and mice PB signature, the loss of B-cell identity such as the down-regulation of PAX5, MS4A1, (CD20) CD22 and IL-4R is a conserved feature across species and across the different experimental conditions. Additionally, we observed that the IRF8 and IRF4 transcription factors have a specific dynamic range of expression in human PB. We thus demonstrated that IRF4/IRF8 intranuclear staining was useful to define PB *in vivo* and *in vitro* and able to discriminate between atypical PB populations and transient states.

KEYWORDS

B-cell differentiation, meta-analysis, plasmablast, transcriptome

Abbreviations: ASC, antibody-secreting cells; Bhlha15, basic helix–loop–helix protein 15; DEG, differentially expressed gene; ePB, ex vivo plasmablast; FC, fold change; FCS, fetal calf serum; FDR, false discovery rate; GEO, Gene Expression Omnibus; GO, gene ontology; GO-BP, gene ontology biological process; iPB, in vitro-generated plasmablast; LLPC, long-lived plasma cells; PC, plasma cells; PB, plasmablast; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RMA, robust multi-array average; RE, reticulum endoplasmic; SC, signature score; ssGSEA, single sample gene set enrichment analysis; TF, transcription factor; UPR, unfolded response.

Alexis Grasseau and Marina Boudigou contributed equally to the work.

INTRODUCTION

The production of antibodies protecting against viruses and other pathogens is the unique feature of antibody-secreting cells (ASC), the ultimate end-point of the B-cell differentiation. ASC have been for decades considered as a homogeneous stage. However, experimental data accumulated in recent years from both rodents and humans demonstrated that ASC are a complex and heterogeneous subset [1]. This heterogeneity stands on the localization of the ASC compartment throughout the body, their ability to proliferate or not, their life span and also their ultimate function. Usually, ASC are divided into two principal subsets including the long-lived plasma cell (LLPC) subset residing in the bone marrow and the short-lived PC subset or plasmablast (PB) that may be proliferating and could be released in the blood and towards tissues after an immune reaction [2]. The differentiation process of B cells towards ASC is controlled by a network of transcriptional factors displaying a strict time sequence expression [3]. A core triad of transcription factors (TFs) guides this developmental programme involving IRF4 (encoded by *IRF4*), BLIMP1 (encoded by *PRDM1*) and XBP1 (encoded by *XBP1*) [4]. Among them, BLIMP1 is the critical regulator of the loss of the B-cell identity by repressing BSAP (*PAX5*), PU.1 (*SPIB*), CD22 (*CD22*) and ID3 (*ID3*) but appears dispensable to maintain the global transcriptional identity of mature PC [5]. Moreover, the conditional deletion of *PRDM1* in PC was not essential to their long-term survival in bone marrow but impaired the function of immunoglobulin secretion.

However, less is known about the phenotype and the functional signature of the PB subset. The PB compartment has been described not only in peripheral blood of individuals after infection and vaccination [6,7] but also in a numerous autoimmune and inflammatory diseases [8–10]. PB may encompass cells with different origins from either naive or recall of cross-reactive memory B cells. The authors agree to define CD19⁺ CD38⁺⁺ CD27⁺⁺ as the most accurate representative subset of circulating human PB cells but with a high degree of heterogeneity [11–15]. In mice, CD138 (syndecan-1), CD22, CD19 and TNFRSF13B (TACI) are broadly used to identify PC and PB but with more limited analogy with human PB [13,16–18]. Although the mRNA signature of normal and malignant human PC in bone marrow [19–21] is well established, the molecular signature of PB appears to be highly dependent on the nature of the experimental set-up. Different human PB mRNA profiles were described from 1-ASC generated after *in vitro* B-cell activation [22–24]; 2-ASC sorted at steady state [11,25,26]; or 3-ASC sorted from *ex vivo* subsets after infection and vaccination [6,14,20]. Although these accumulating data provided a high quality of information about human ASC, they challenged an overall view of the molecular identity of PB not only across experimental conditions but also across species. Furthermore, beyond the Ig production, the functional identity of PB appears more complex as recent

studies have underlined that this subset could exert regulatory function on the immune response [27,28].

To gain insight into the understanding of the molecular identity of the PB population, we performed a meta-analysis of different data sets exploring the differentiation from mature B cell to PC in mice and humans. The present study attempted to use new recent analyses using whole RNA sequencing in *Prdm1*-GFP transgenic mice to define an accurate PB signature based on the reliability and the stability of the differential gene variation. We therefore drew a molecular identity of PB in mice revealing new molecular aspects on the *in vivo* progression of B cells towards terminal differentiation. We next performed a similar analysis using six recent available data sets from human PB and PC including RNA sequencing and microarray data. We uncovered unique and conserved molecular features for PB and pre-PB across experiments and species. Finally, we explored *ex vivo* and *in vitro* the protein-related expression of some conserved and atypical markers obtained from the human PB signature. We thus underlined the robustness of using intracellular markers targeting IRF4 and IRF8 to identify the heterogeneity of human PB subsets.

MATERIALS AND METHODS

Public data

RNA sequencing or microarray data were obtained from the public functional genomic data repository: Gene Expression Omnibus (GEO) (Table 1). All data were published during or after 2015. The different cell subsets used (*ex vivo* and *in vitro*) are detailed in Figure S1 for mouse and in Figure S2 for human being. Raw data in 'cel' format from the GSE68878, GSE69033, GSE75534 and E-MEXP-3034/E-MEXP-2360 experiments were exported and analysed with the 'oligo' R package v1.44.0, and a robust multi-array average (RMA) correction was used for the normalization. Probes were associated with their gene target using pd.huex.1.0.st.v2v3.14.1, pd.hugene.2.1.Stv3.14.1 and pd.hg.u133.plus.2v3.12.0 R packages. Normalized data and raw count (GSE60927) were analysed with iDEP platform [29], using DESeq2 or Limma R packages, respectively. Differentially expressed genes (DEGs) were obtained with a false discovery rate (FDR) of 5% and a fold change $|FC| > 2$ for RNA-seq and $|FC| > 1.5$ for microarrays.

RNA sequencing and sc-RNA sequencing on *in vitro*-differentiated B cells

Bulk RNA-sequencing data from *in vitro* differentiation of human naive B cells obtained from three independent healthy blood donors (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) were analysed. Cell culture conditions to differentiate

TABLE 1 Description of data sets used in the meta-analysis

Specie	ID	Sequencing platform	Reference genome	Aligner	Counting tool	Publishing date
<i>RNA-seq</i>						
Mouse	GSE60927	Illumina HiSeq 2500	GRCm37	Subread	FeatureCounts	2015
Mouse	GSE71698	Illumina HiSeq 2000	GRCm37	TopHat v.1.4.1	HTseq v.0.5.3	2015
Mouse	GSE77744	Illumina HiSeq 2500	GRCm37	TopHat v.1.4.1	HTseq v.0.5.3	2016
Mouse	GSE91040	AB 5500xl Genetic Analyzer	GRCm38	TopHat v.1.4.1	Cufflinks v.2.2.0	2017
Human	GSE81443	Illumina HiSeq 2500	Ensembl R72	TopHat	Partek	2016
Human	GSE107011	Illumina HiSeq 2000	GENCODE v.26	Kallisto	Tximport	2019
Specie	ID	Microarray	Scanner	Analysis package	Annotation source	Publishing date
<i>Microarray</i>						
Human	GSE41208	Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip	Illumina BeadScanner	Lumi	HUGO Gene Nomenclature Committee annotations	2012
Human	GSE75534	Affymetrix Human Gene 2.1 ST Array	–	Oligo v.1.44.0	pd.hugene.2.1.stv3.14.1	2016
Human	GSE68878/ GSE69033	Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array	–	Oligo v.1.44.0	pd.huex.1.0.st.v2v3.14.1	2016
Human	E-MEXP-- 3034/E- MEXP-2360	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	–	Oligo v.1.44.0	pd.hg.u133.plus.2.v3.12.0	2011

naïve B cells into PB were as described in Hipp et al. [30]. In vitro-generated PB (iPB) were sorted as CFSE^{low} CD20^{low} CD38⁺ at day 7 of culture to be compared with unstimulated naive B cells. Qualities of RNA-sequencing libraries were evaluated by FastQC-0.11.7-MultiQC-1.4.dev. FASTq was trimmed with Trimmomatic-0.33/BBMap_38.05 and aligned with STAR 2.5.3a over GRCh38.91. Raw and normalized counts were calculated with FeatureCounts (subread-1.6.0). The DEG analysis was performed on iDEP, and genes with FPKM ≤ 1 for 70% of samples were removed.

For single-cell RNA sequencing, bone marrow PC (CD38^{hi} CD138⁺) and iPB were sorted by flow cytometry and captured in C1 IFC for mRNA seq (10–17 μ m) (Fluidigm). The Seurat package was used for data filtering and DEG analysis. Cells with less than 1000 expressed genes and with more than 20% of mitochondrial genes were removed. Genes expressed in less than 3 cells and with a mean expression less than 20 reads were removed. RNA-seq counts and sc-RNA-seq comparison data for the 113 genes analysed are in Table S5.

Meta-analysis pipeline

Gene names in mouse and human data were harmonized before comparison, as detailed in Figure S3A,B. Briefly,

gene name synonyms were obtained from R packages 'org.Mm.eg.db' v3.6.0 for mouse data sets or from 'org.Hs.eg.db' v3.6.0 for human data sets. 'org.Mm.eg.db' and 'org.Hs.eg.db' contain toorg.Mm.eg.dbdatabase and toorg.Hs.eg.dbdatabase, respectively. Alias2Symbol function from 'Limma' v3.36.5 converts identified gene synonyms into a unique gene name. If gene names are not described in the first used database, a second research was performed in the database from 'HGNCHELPER' v0.5.2 package thanks to CheckGeneSymbols function. Gene names not identified in all tested databases keep their original names.

Normalized data and raw count (GSE60927) were analysed with the iDEP platform [30], using DESeq2 or Limma R packages, respectively (Figure S3A,C). Raw counts data were normalized by DESeq2, and then, normalized counts were filtered removing genes with FPKM ≤ 1 . Genes from microarray experiments were also filtered depending on the signal background. Finally, the DEGs were obtained with FDR of 5%, and a fold change IFCI > 2 for RNA-seq and IFCI > 1.5 for microarrays.

To construct the signature, an original approach was designed to compare DEG from several technologies and analysis methods (Figure S3A,D). Briefly, for each DEG, the frequency of up-regulation and down-regulation was calculated across all comparisons. Then, if the up-regulation frequency (*FreqUp*) > down-regulation frequency (*FreqDown*), a corrected

frequency (*Corr Freq*) was calculated in the following manner: $FreqUp - FreqDown = Corr Freq$. If $FreqDown > FreqUp$, $Corr Freq = FreqDown - FreqUp$. The median of fold change (*medFC*) was calculated using all comparisons. Finally, a signature score (*SC*) was obtained as follows: $MedFC * Corr Freq = SC$.

To define the murine signatures, genes were filtered using $medFC \geq 2$, $Corr Freq \geq 0.5$ and $|SC| \geq 1.5$. To define the human signatures, genes were filtered using $medFC \geq 2$, $Corr Freq \geq 0.5$ and $|SC| \geq 0.7$ due to the low resolution of the microarrays (Figure S3D). Genes related to light or heavy antibody chains were removed to gene lists.

Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA)

Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) was performed using ssGSEAProjection module v9.0.10 on the GenePattern platform with default parameter. For each data set, results were normalized through z-score. Mean and standard deviation were calculated using the correlation scores obtained across all samples from one data set. In Figure 2, we regrouped in 'Activated B cell' all samples including *in vitro*-activated B cells with different *stimuli* (LPS, CD40, IL4); in 'Mature B cell' samples including follicular B cells, spleen IgD⁺ and spleen B220⁺ B cells and in 'PC' Plasma cells samples obtained from the spleen and bone marrow.

Gene ontology analysis

Gene ontology biological process (GO-BP) annotation of each gene was performed in DAVID database and GO-BP, and the genes were grouped in global biological process based on MGI GO-BP classification.

Cell isolation and Flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on lymphocyte separating medium, Pancoll human (PAN Biotech). CD19⁺ B cells were purified from human PBMCs using the REAlease[®] CD19 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) with purity greater than 98%. Cells were cultured in 24-well plates (Falcon) in complete medium (RPMI 1640 medium, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (BD, Biosciences), 4 mM L-glutamine (Gibco) and penicillin (200 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). B cells were stimulated for 84 h (3, 5 days), in the presence of the AffiniPure Goat anti-Human IgG+IgM (H + L) (2 µg/mL), the AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum

IgA, α Chain Specific (2 µg/mL; Jackson ImmunoResearch Laboratories), CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (0, 25 µM; InvivoGen), Recombinant Human Interleukin-2 (rh IL-2) (20 ng/mL, ImmunoTools) and Recombinant Human Interferon alpha 2a (rh IFN-α2a) (10 µg/mL; ImmunoTools). Fresh PBMCs or stimulated B cells were stained with different combinations of fluorochrome-conjugated antibodies. All antibodies are listed in Table S4. Intracellular staining for the transcription factors was carried out after cell permeabilization using cytofix/cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Stained cells were analysed using a Navios cytometer (Beckman Coulter). The phenotype of the cells was analysed using Kaluza Flow Cytometry Analysis and FlowJo software.

RESULTS

A blimp-1-dependent PB signature in mice across different experimental data sets

In the first part of the analysis, we used four sources of data representing so far, in mice, the most exhausting publicity available data sets using RNA sequencing for pre-PB, PB and PC (Table 1, Table S3 and Figure S1). All the different studies were performed using the well-established mouse model expressing a GFP-reporter allele within the *Prdm1* locus [31]. These data sets encompassed not only *ex vivo*-sorted PB and PC based on GFP (*prdm1*) and CD138 expression but also *in vitro*-generated pre-PB and PB following 3–4 days of LPS or CD40 and IL-4 stimulation. The kinetic progression of the ASC differentiation is representing by the progressive acquisition of BLIMP1 following by the up-regulation of CD138 [32]. Therefore, we can distinguish in the spleen and lymph nodes, following LPS stimulation, between pre-PB GFP⁺ CD138⁻, PB GFP⁺ CD138⁺ and LLPC in bone marrow CD28⁺ CD138⁺ GFP⁺. Our primary objective was to define a mouse PB signature reliable across the different experimental conditions. We used a pipeline analysis (see Material and methods) that allowed us to compose with different data sets (Figure S3A). Briefly, after gene name normalization between the different experiments (Figure S3B), we first performed comparisons in each data set of the PB transcriptome vs the other B-cell subsets (referred to as early B cells) (Figure S3C). We chose to gather all other B-cell subsets to exclude potent differential expressed genes that would have appeared due to the intrinsic nature of the different B-cell subsets (marginal zone vs germinal centre cells as an example) and the different experimental conditions. We excluded PC from this analysis to keep the progressive dynamic of the gene network involved in the PB initiation programme. Next, from these 29 comparisons (Table S3), we realized the meta-analysis generating a 12,793 gene signature (Figure S3). We

filtered those genes using $FC < -2$ or >2 , a corrected frequency ≥ 0.5 and a $\text{Signature score (ISC)} \geq 1.5$ revealing a PB signature with 1068 genes (Table S1 and Figure S3D). As expected, the up-regulation of immunoglobulin-related gene transcription occurring at the PB stage represented up to 25% of the 704 up-regulated genes, which were thus filtered out. Therefore, we proposed a mouse PB signature of 882 genes with 520 up-regulated genes and 362 down-regulated genes highly conserved between the different experimental conditions (Figure 1a, Table S1 and Figure S3E).

The 882 gene PB signature delineated not only different groups of gene expression (Figure 1b), including a high number of genes involved in protein production, in transport and in the cellular cycle, but also a significant amount of surface cell receptors, transcription factors and genes involved in immune processes underlined in the gene ontology (GO) analysis (Figure 1c). As expected, the *Prdm1* gene ($SC = 4.7$) stands among the most up-regulated genes with several other transcription factors less described in the B-cell differentiation process. Two prominent families of transcription factors emerged ($SC > 4$): the basic helix–loop–helix family bHLH and the zinc finger proteins. The class A basic helix–loop–helix protein 15 (*Bhlha15*) known as *Mist1* is one of the most differentially expressed genes in PB ($SC = 6.2$), this protein is well established as a critical factor regulating secretory vesicle trafficking not only in zymogenic cells in the gut [33] but also in salivary secretory acinar cells [34]. Recently, *Mist1* was reported as a ‘scaling’ factor programming the secretory architecture in cells independently of the cell lineage [35]. This transcription factor is linked to a network of different regulators (*Xbp1*, *Ern1*, *Pycr1* and *Derl3*) involved in the resolution of secretory stress and the regulation of the unfolded response (UPR) [36]. This observation revealed that the ability to secrete protein is an early and stable feature acquired during the differentiation process that is not restricted to fully differentiated plasma cells. Only 55/362 down-regulated genes have a $SC < -3$ and 7 have a $SC < -4$. The vast majority of these genes are primary B-cell lineage regulators such as *Pax5*, *Bach2*, *Spib*, *Ciita* and genes involved in cell activation and signalling, including *Cd22*, *Fcer2a*, *Tlr9*, *Id3* and *Icosl*. Interestingly, the down-modulation of the B-cell identity occurs along with the up-regulation of atypical B-cell markers mostly involved in the negative regulation of immune processes (*Ctla4* ($SC = 3.2$), *Tigit* ($SC = 4$), *Lag3* ($SC = 2.6$), *Ili10* ($SC = 3.1$), *C4bp* ($SC = 3.8$) and *Cd9* ($SC = 1.8$)) [28] (Table S1).

The mouse PB signature is highly similar to PC

We next compared this PB signature with the different transcriptome data sets gathering activated, mature B-cell subsets, pre-PB and PC using single sample gene set enrichment

analysis (ssGSEA) (Figure 2a,b). Mature and activated B cells are strongly segregated from the PB signature ($r < 0.1$), and we observed a slightly but significant difference with the Pre-PB subset (*GFP-Prdm1⁺ CD138⁻*), suggesting that additional cofactors to the *Prdm1* gene are mandatory for the commitment of the PB differentiation. However, we did not observe a significant difference between the PB signature and individual data set coming from the fully differentiated PC (from spleen or bone marrow).

To gain insight into putative factors involved in the early PB commitment, we examined the genes differentially expressed between PB and pre-PB (Table S1), we found a group of 98 genes with a $FC > |2|$ and a frequency $> |0.5|$ (Figure S4A). Using EnrichR data analysis tools [37], we thus identified *Klf4*, *Suz12*, *Irf8*, *Rela* and the chromatin-modifying enzyme *Ezh2* as putative coregulatory genes of *Blimp1* conducting the first events towards the B-cell differentiation (Figure S4B). In this regard, *Ezh2* and *Suz12* were recently described as a key controller of the B-cell fate regulating epigenetic programmes during B-cell division and differentiation [38–40].

Towards a mouse PB-specific signature

Our precedent analysis revealed that the PB gene signature is shared with PC. To define a unique PB signature distinct from PC and other B-cell subsets, we next conducted a similar meta-analysis between the PB and PC transcriptomes applying $FC > |2|$, frequency $> |0.5|$ and $SC > |1.5|$ as filters. According to these standards, the Venn diagram of the 155 DEGs between both subsets defined four different clusters (Figure 3a, Table S1). Clusters A and B (121 genes) included DEGs with a progressive up- or down-regulation between mature B cells and PC. This kinetic occurs with successive gaps of gene induction and gene repression, suggesting that progressive and distinct environmental inputs might conduct transcriptional dynamics towards the PC differentiation (Figure 3b). We observed the evolution of B-cell trafficking receptor expression underlined by the progressive loss of *Ccr6*, *Ccr7*, *Siglecg*, *Cd22*, *S1rp3* and *Cxcr5* together with the up-regulation of *Ccr10*, *Cdh2*, *Ly6c1* and *Ly6c2* but also the syndecan family protein *Sdc1* that characterize profound modification in cell homing. Another interesting cluster of genes is involved in cytokine signalling and cell survival. These observations confirm previous experiments demonstrated that during the differentiation process PB and then PC acquire a specific localization that reprogrammes their survival-dependent signals. The loss of *Il4ra*, *Il21r*, *Cxcr5* and *Ccr6* is consistent with the exit of PB from secondary lymphoid organs together with the acquisition of their independency of follicular helper T cells. The subsequent expression of

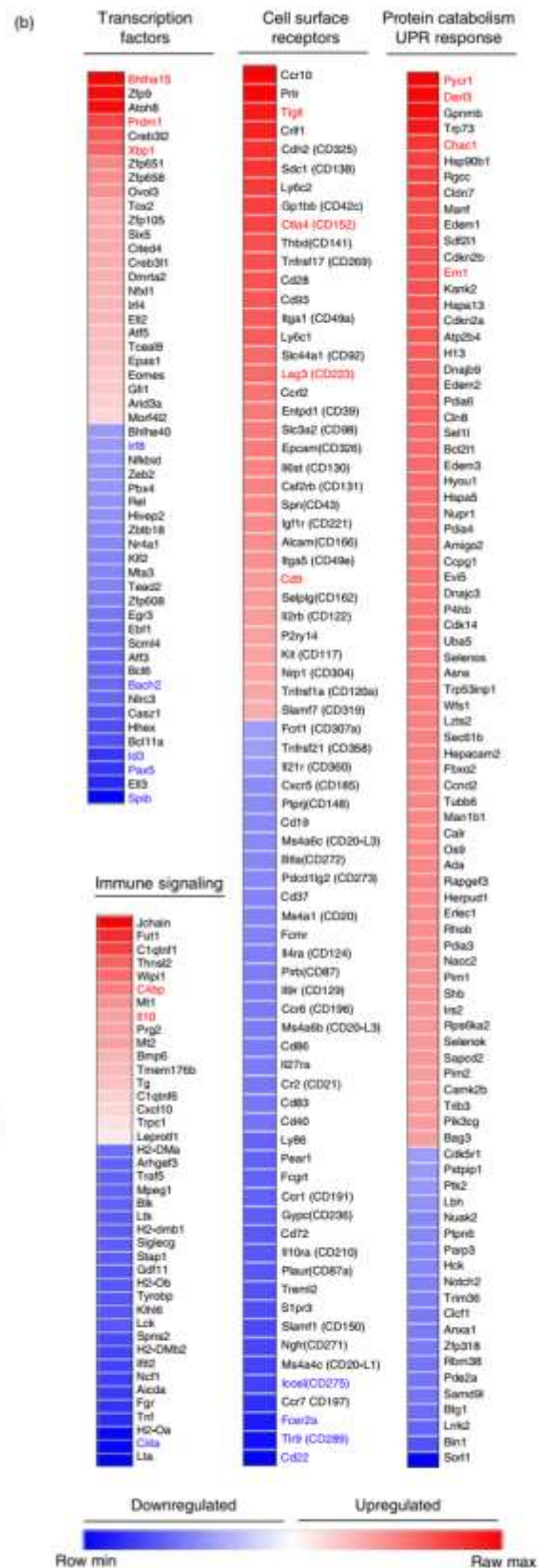
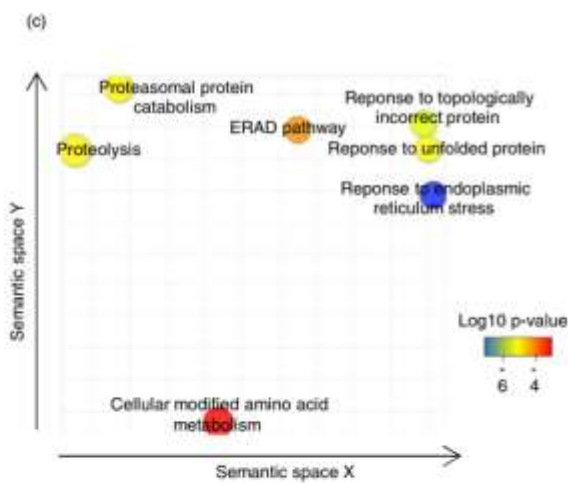
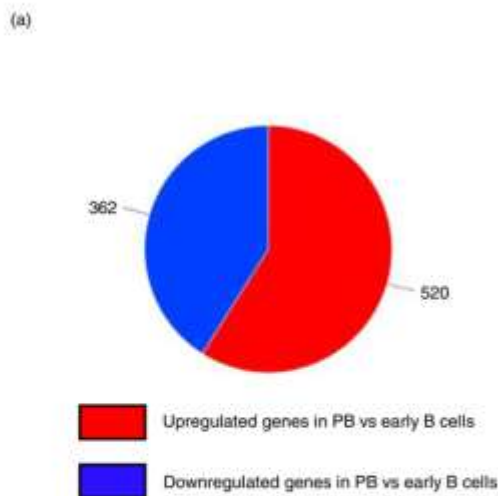


FIGURE 1 The plasmablast signature includes 880 differential expressed genes compared with early B cells. (a) Pie chart of the number of up-regulated and down-regulated genes in murine plasmablasts (PB) compared with early B cells (including all B-cell samples excepting plasma cells) based on the 882 gene signature. (b) Heatmaps of the signature score of murine genes according to their ontology and molecular function: cell surface receptor, reticulum endoplasmic (RE) stress and survival, transcription factor or immune signalling function. The genes mentioned in text are coloured in red for up-regulated and in blue for down-regulated genes. Row min and row max are minimal and maximal values for each row. (c) REVIGO representation of semantic association of gene ontology (GO) process significantly enriched in the murine molecular signature (FDR ≤ 0.05) (GO process enrichment test was performed with Gorilla)

Ccr10, *kit* and *Tnfrsf17* suggests that the final differentiation process occurs in different targeted tissues such as the mucosal tissues or the bone marrow, allowing PC to reside in survival niches highly dependent on the *Tnfrsf17* ligands *Tnfsf13b* (BAFF) and *Tnfsf13* (APRIL) [41]. The two last clusters represent genes that might be considered as the specific functional gene identity of PB. The clusters C and D (34 genes) present a pattern of expression including up-regulated or down-regulated genes from early B cells to PB and then inversely expressed in PC (Figure 3b, Table S1). Using functional gene annotation, we observed that the unique PB identity is related to cell adhesion (*Palpn*, *Hapln4*, *Nid2*) and cell proliferation (*Mki67*, *Amigo2*) (Figure 3c). However, except *Bcam* (*Cd239*), no specific membrane receptor defined the murine PB population. Finally, we underlined for the first time that the bHLH family protein atonal homolog 8 (*Atoh8*) might represent a TF for the PB subset. *Atoh8* is a TF implicated in the development of many tissues, including kidney, nervous system, retina and muscles (42), and performs lineage determination function by reprogramming cell specification [43]. However, its role in the B-cell terminal differentiation is unknown.

Altogether, these data suggest that a unique transcriptional gene network programme directs the identity of the PB population as a proliferative subset with tissue-dependent migration and survival abilities.

The comparison of the different PB signatures across species reveals an evolutionary conserved differentiation process

In the second part of this work, we realized the same analysis using 6 human data sets (Table 1, Table S3 and Figure S2). The definition of human PB populations in healthy situations is highly variable and depends on the nature of the experiment, the physiological conditions (vaccination or not) and also the B-cell sorting strategy. We thus gathered six data sets representing the diversity of these experimental conditions studying the generation of PB and PC in humans that included both ex vivo and in vitro studies. Because of the scarcity of studies using RNA sequencing, we used both microarray and NGS-based experiments. Using the same approach described in Figures 1–3, we first generated a human PB signature that regroups the most stable gene expression

across all the experimental conditions (Figure S5A and Table S2). This PB signature included 411 genes, with 129 genes that are shared with the mouse PB signature (Figure S5B). The core regulatory TF network driving the terminal B-cell differentiation in mouse is conserved in human and included *BHLHA15*, *PRDM1*, *MZB1*, *IRF4*, *ELL2* and *XPB1* as up-regulated genes and *BACH2*, *PAX5*, *IRF8*, *BANK1* and *SPIB* as down-regulated genes associated with a loss of mature B-cell identity markers (*CD22*, *MS4A1*, *CD40*, *CXCR5* and *CD72*). Interestingly, some other conserved genes have not been fully explored in human B cells and may have a decisive role in controlling PB and PC generation. In this regard, the involvement of the *FKBP11* gene (encoded the FKBP19 protein) is intriguing. Although its role in the B-cell differentiation process is not well understood, *FKBP11* was not only found as a putative target of IRF4 initiating the pre-PB stage [44] but also increased in lupus B cells inducing B-cell tolerance breakdown [45]. Additionally, we underlined proteins involving in cell survival that may be valuable targets for controlling lymphoid neoplastic disorders such as *PIM2*, *TRIB1*, *SEL1L* and *ELL2* [46,47]. On the other hand, the human PB signature encompassed 283 genes mostly involved in cell activation (Figure S5C,D). The up-regulation of *CD27* and *CD38* and the down-regulation of *CD24* and *CD1c* are consistent with the use of these markers for distinguishing differentiated B cells in humans. The absence of these proteins in mouse suggested that their expression may be uncoupled for the core transcriptional programme conducting the terminal B-cell differentiation but linked to the experimental activation conditions. Finally, we noticed that unlike what has been observed in mouse, the negative checkpoint inhibitors *Hlio*, *Tigit*, *Lag3* and *Ctla4* were not found in the human PB-specific signature.

The human PB signature underlined the importance of specific-metabolic pathways

We next generated the specific human PB signature by comparing this signature network with the different PC transcriptome (Figure 4a). The 113 stable DEGs clustered into four groups, as described in Figure 3. Both clusters A and D are under-represented with only three genes *AMPD1*, *RGCC* and *SEL* (in Cluster A) involved mostly in metabolic and activation pathways and one gene in the cluster D: *AKT3*. Cluster B is the more consistent group of

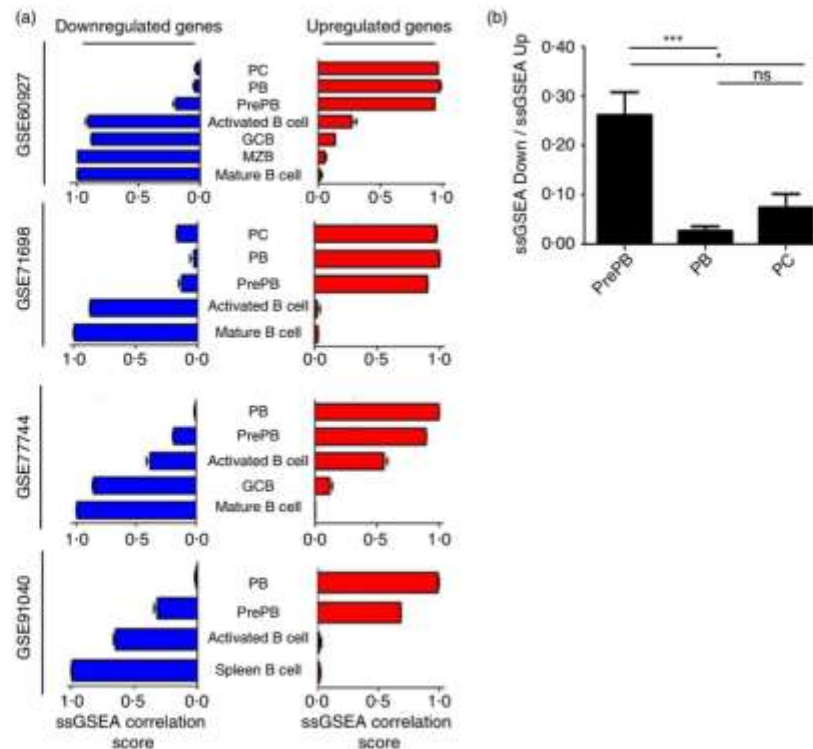


FIGURE 2 The core of the plasmablast signature is shared with plasma cells. (a) Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) correlation value for each sample or groups of samples with the plasmablast (PB) mouse signature (882 genes). Down-regulated genes are in blue, and up-regulated genes are in red. GCB, germinal centre B cell; MZB, marginal zone B cell; PB, plasmablast; PC, plasma cell; pre-PB, pre-plasmablast. Each group of samples is associated with its RNA-sequencing ID. (b) Ratio of the ssGSEA correlation for down-regulated genes and up-regulated genes in the pre-PB ($N = 4$), PB ($N = 4$) and PC ($N = 2$) murine molecular signatures. The Kruskal–Wallis test, ns: P -value > 0.05 , * P -value ≤ 0.05 , ** P -value ≤ 0.01 , *** P -value ≤ 0.001

genes and is related to the regulation of the transcription, cell proliferation and survival (Figure 4b). Surprisingly, none of these genes are shared with the cluster B identified in mouse but are present in the murine PB signature, revealing important differences in the quantitative variation of these genes in both species. As an example, *IRF8* has more important successive down-regulation gaps during human PB differentiation than in mice. Cluster C involved the metabolic enzymes *ADA*, *SGK1*, *GOT1*, *GGH*, *EDEM2*, *GALK2* (Figure 4a,b) underlining the importance of metabolic processes in the human terminal B-cell differentiation pathway and may represent future and ongoing exciting tracks into the comprehension of the ASC generation [48,49]. In cluster C, we found that *PRDM15* and *IRF4* have a unique expression peak at the human PB stage not observed in the murine PB signature.

To confirm these results, we analysed bulk RNA-seq (iPB versus naive B cells; Figure S6A and Table S5) and single-cell RNA-seq data (bone marrow PC versus iPB; Figure S6B and Table S5) generated from a model of in vitro differentiation of human naive B cells [30] (C. Delalay, unpublished data). We showed that PB-specific

genes (observed in cluster C) such as *PRDM15*, *IRF4*, *ADA*, *GGH*, *SKG1* and *EDEM2* were up-regulated in iPB, on the one hand in comparison with naive B cells and on the other hand versus bone marrow PC highlighting the soundness of our PB signature.

The loss of the B-cell lineage-related mRNA is the only feature that we observed conserved between humans and mice across all experimental variations (Figure 5c). We noticed that down-regulation of the gene *REL* is a conserved event during the PB generation between mice and humans. This observation underlined that the NF- κ B pathway could represent an important crossroad between the different activation processes leading to PB differentiation. *REL* is a crucial regulator of the expression of *BACH2* and may be implicated in B-cell survival and B-cell migration. PB seems to acquire an independency of the classical B-cell transcriptional programme very early in the differentiation process underlined by the progressive loss of *PAX5*, *IRF8* and *REL*. Our analyses have not revealed specific surface markers (belonging to cluster C or D) in the human PB signature confirming that typical and robust identity PB-related proteins are highly variable and are challenged by the diversity of the

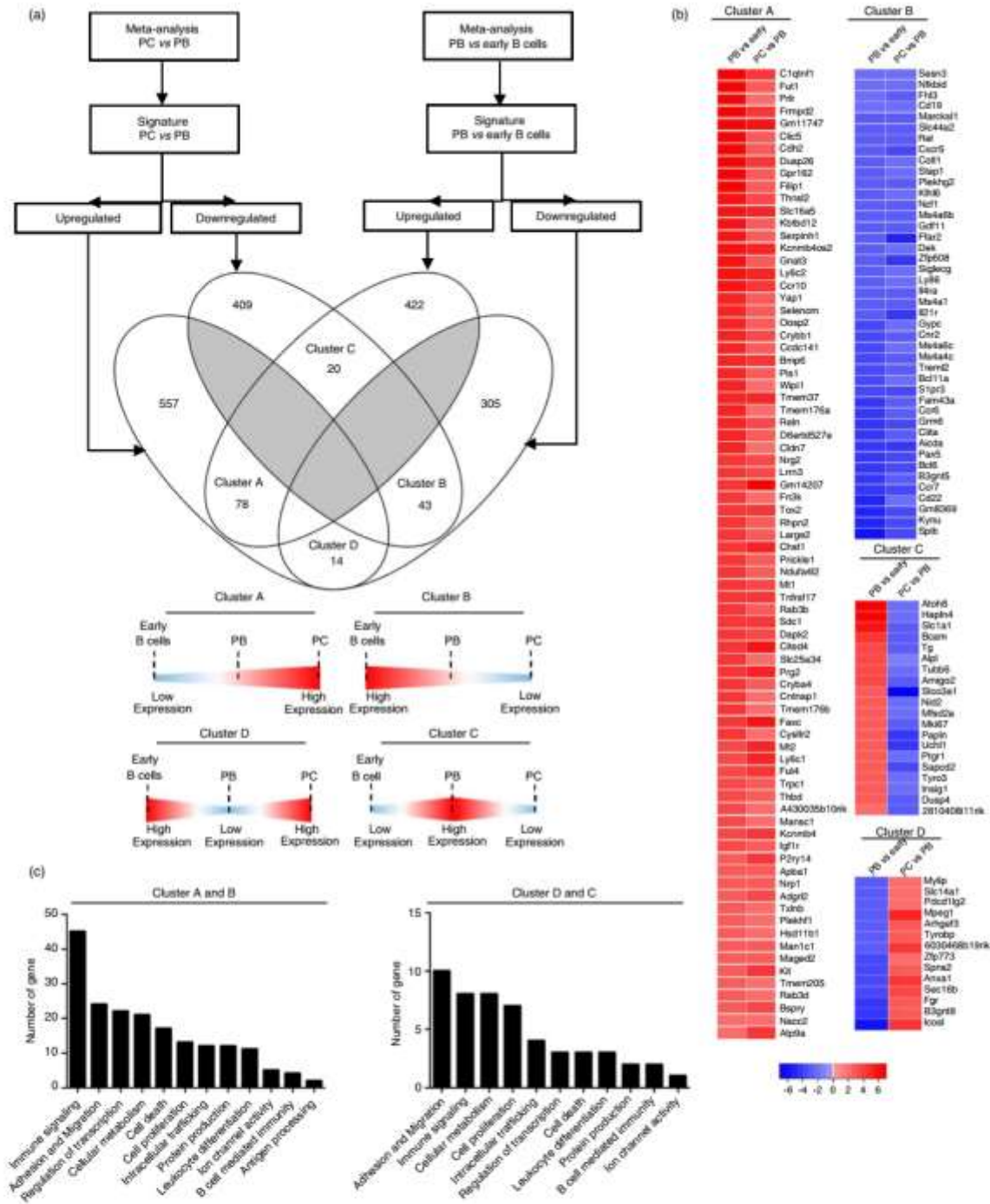


FIGURE 3 Definition of the murine plasmablast-specific signature. (a) Workflow defining the different clusters according to their gene expression patterns. The 155 genes dispatched in the 4 clusters characterize the plasmablast (PB)-specific gene expression compared with early B cells and plasma cells (PC), respectively. The clusters A and B described genes with a continuous up- or down-regulation during the B-cell differentiation (transitional expression level in PB). The clusters C and D described genes with a peak of up-regulation or down-regulation at the PB stage (specific expression level in PB). (b) Heatmaps of the median fold change (FC) of the differential expressed genes (DEGs) in PB versus early B cells and in PC versus PB. Each gene is classed in the four different clusters. The genes mentioned in text are coloured in red when up-regulated and blue when down-regulated genes in PB. Row min and row max are minimal and maximal values for each row. (c) Gene ontology analysis of the genes with transitional expression level in PB (clusters A and B) or with a specific expression level in PB (clusters C and D)

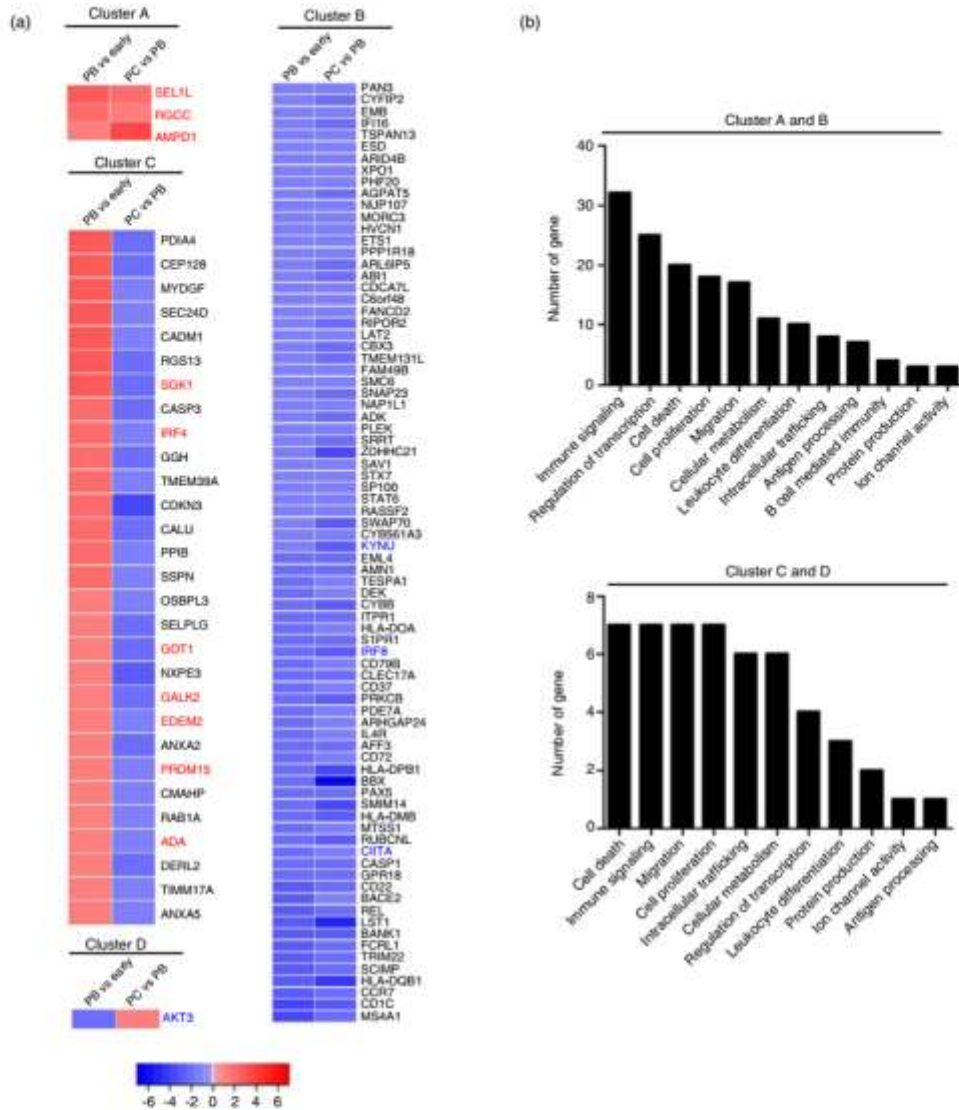


FIGURE 4 Definition of a human plasmablast-specific signature conserved across experimental conditions. (a) Heatmaps of median fold change (FC) of the differential expressed genes (DEGs) of the 113 common genes between human being and mouse. All genes are dispatched in the 4 clusters characterize the plasmablast (PB)-specific gene expression compared with early B cells and also with plasma cells (PC). The genes mentioned in text are coloured in red for up-regulated and in blue for down-regulated genes. Row min and row max are minimal and maximal values for each row. (b) Gene ontology analysis of the genes with a transitional expression level in PB (clusters A and B) or with a specific expression level in PB (clusters C and D). (c) Venn diagram between human and mouse PB-specific signature. Transcription factor and membrane receptor genes are shown for each group of genes with their associated cluster

experimental conditions. However, we observed that *IRF4* and *IRF8* progressive differential expression might represent a robust molecular identity to characterize the human terminal B-cell differentiation.

Experimental exploration of the human PB gene signature

Finally, to assess the protein relevance of the PB human signature, we conducted a phenotypic analysis of human ex vivo PB (ePB) and in vitro-generated PB (iPB) after 84 h of stimulation. Human PB are frequently characterized by the high expression of CD27 and CD38 compared with mature or activated B cells (Figure 5a and Figure S7A). The iPB and ePB shared the loss of the B-cell identity underlined by the down-regulation of CD19, CD20, CD22, CXCR5, CCR7 and CD40 (Figure 5a). Examining other up-regulating markers described in the mouse PB signature, we observed high heterogeneity of protein expression with significant difference between ePB and iPB (Figure 5b). Surprisingly, CXCR4 expression was observed to be down-regulated in ePB but stayed unchanged in iPB, which is in contrast with the requirement of this receptor for long-term survival in bone marrow. Inversely, CD43 was highly expressed in ePB, whereas we observed a dual expression in culture with positive and negative subsets. CXCR3 has an intermediate variation level, although its expression is slightly increased in ePB, we showed a decrease in CXCR3 expression between activated and differentiated B cells (Figure 5b). CD166 is only expressed in vitro, and CD138, robustly used to discriminate ASC in mice, is expressed in a subset of ePB and induced at low level in vitro in our experimental conditions. We noticed that CD239 (BCAM), the unique membrane receptor identified in the mouse PB signature, is expressed on ePB but not in vitro. We did not observe the up-regulation of CTLA-4, TIGIT, CD83 and SIGLEC10 in none of the human PB subsets (Figure S7B). Interestingly, we found a low expression of LAG-3 in ePB that could be induced in vitro but not restricted to PB. Overall, this first analysis revealed the complexity of defining a specific pattern of membrane receptor expression in PB. To overtake this limitation, we proposed to adopt a different population identification strategy using the molecular identity. Our precedent analysis has suggested that the progressive differential expression of *IRF4* and *IRF8*

may recapitulate the true *continuum* related to the human B-cell differentiation. We thus performed intracellular analysis of these two markers on ePB and in vitro-stimulated B cells (Figure 5c). We thus confirmed that the progressive acquisition of IRF4 coincided with the down-regulation of IRF8. Using supervised gating, we demonstrated that IRF8⁺ IRF4^{low} cells encompassed not only a majority of CD38^{high} CD27⁻ activated B cells but also 20% of CD27⁺ CD38^{low} cells. The IRF8^{low} IRF4⁺ population showed a great enrichment in CD27^{high} CD38^{high} cells but also in activated B cells suggesting the accurate ability to track the progressive evolution of B cells towards PB differentiation. We confirmed that the IRF8^{low} IRF4⁺ population expresses BLIMP1 and represents differentiated B cells (Figure 5c). In the in vitro experiments, we observed a third population expressing IRF8 with an intermediate level of IRF4 expression, this population has two distinct phenotypes (CD27⁺ and CD27⁻) that may represent two distinct progenitors of PB previously defined as pre-PB (Figure S7C). The subset of PB identified with IRF8^{low} IRF4⁺ phenotype was closed to the PB subset characterized in vitro by CD38^{high} CD20^{low} expression, as previously described [24] (Figure S8A), and includes the three populations (pop) of circulating ASC: (pop) 1 (CD19⁺ CD38⁺ CD138⁻), (pop) 2 (CD19⁺ CD38^{high} CD138⁻) and (pop) 3 (CD19⁺ CD38^{high} CD138⁺) recently described by Garimalla et al. [14] (Figure S8).

Altogether, this analysis emphasized that consistent phenotypic characterization of human PB may be challenged by the nature of the experiments. However, we underlined the existence of different PB populations and PB progenitors expressing different densities of CD27, CD38 or CD138 but sharing a unique molecular identity highlighted by the differential expression of IRF8 and IRF4.

DISCUSSION

The approach adopted in the present report was a horizontal genomic meta-analysis based on the variation of differentially expressed genes across several comparisons. This qualitative approach allows performing meta-analysis using data processed with different methods (e.g. RNA-seq or microarray), instruments (e.g. Illumina 2500 or Illumina 2000), analysis pipeline (e.g. reference genome or aligner) and experimental protocols (Table 1). This strategy opens up a large

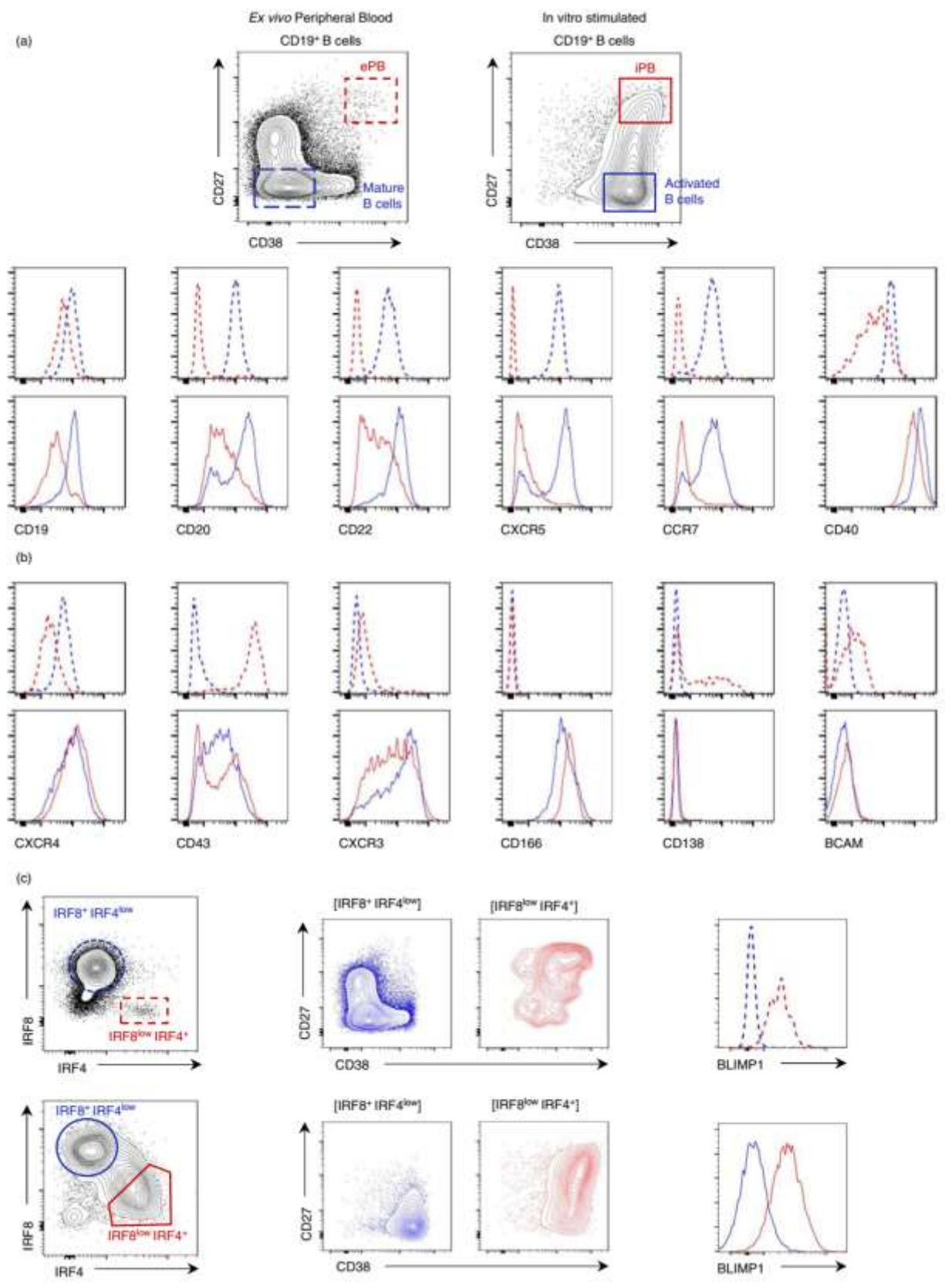


FIGURE 5 Experimental exploration of the human plasmablast gene signature in ex vivo and in vitro-induced plasmablast. (a) Dot plots depicted ex vivo plasmablast (PB) from peripheral blood (ePB; dotted red line), or in vitro-induced PB (iPB; red line) and ex vivo mature B cells (dotted blue line) and in vitro-activated B cells (blue line) according to CD27 and CD38 expression. Below panels depicted expression of B-cell-related canonical surface markers. (b) Expression of up-regulated markers identified in the mouse and human PB signature. (c) Representative dot plots of identification of B-cell subsets according to IRF4 and IRF8 expression ($N = 5$ for ex vivo B cells and $N = 13$ for in vitro-stimulated B cells). Differentiated B cells (IRF8^{low} IRF4⁺ B cells are in red) and activated B cells (IRF8⁺ IRF4^{low} B cells are in blue) (left). For each subset, the expression of surface markers CD27 and CD38 was analysed (middle panel), as well as the expression of the transcription factor BLIMP1 (right panel)

possibility of usable datasets and increases the robustness of results. The ssGSEA has demonstrated that the PB signature effectively discriminates PB against early B cells and pre-PB supporting the soundness of such approach. However, such analyses rely on the quality of the data sets and are expected to be more robust using RNA sequencing. At the time of the analysis, human PB and human PC data available were coming essentially from microarray experiments (4/6 data sets) leading to the inevitably loss of information [50,51], but the pipeline presented here could be easily adapted to future data sets.

This meta-analysis revealed the complexity of defining a PB signature. Our work underlined that the loss of the B-cell identity during the late differentiation of B cells into PB and PC is an evolutionary conserved mechanism. The down-regulation of canonical B-cell markers CD19, CD20, CD22, CXCR5, CCR7 and CD40 mRNA is well conserved between mouse and human being, and is also found in human ex vivo PB and in vitro-induced PB at the protein level. However, we observed a high heterogeneity within up-regulated markers, in particular regarding the chemokine receptors and markers involved in the immune regulation (CTLA-4, TIGIT or SIGLEC10) that we could not detect in human PB at steady state. These observations may underline that such protein expression is dependent on a particular physiological or pathological context. Indeed, PB harbouring immune-regulatory properties have been related to controlling experimental autoimmune encephalomyelitis, the response to chemotherapy, but also increasing bacterial infection susceptibility [52–55]. Similar observation was made regarding the expression of syndecan-1 (CD138). Although this marker appears greatly associated with the murine PB signature ($SC = 3.5$), we did not find its expression significantly enriched in the human PB signature. Moreover, only a few parts of IRF8^{low} IRF4⁺ ePB expressed CD138. Recent studies underlined that CD138 expression is dependent on cell-to-cell contact with stroma and specific soluble derived factors [41] and that its ability to bind APRIL in bone marrow promotes PC survival [56]. However, CD138 expression seems not required to the human PB generation (at least in the early events).

Based on our results, we explored the differential expression of IRF4 and IRF8 as molecular markers to track the human PB. This double-negative feedback loop was demonstrated in mice regulating the initial developmental bifurcation of LPS-activated B cells [57]. IRF8 is a key actor controlling

GC B-cell selection while antagonizing the PB fate [58], whereas IRF4 is an obligate controller of the formation of the germinal centre and the PC differentiation [59]. Both of these TFs have revealed a similar pattern of expression in the human PB signature belonging to the two-opposite clusters (B and C). We thus used and validated this approach for the first time in human identifying in vitro-generated PB but also circulating PB based on their differential expression of IRF8 and IRF4. Moreover, this strategy revealed the existence of an intermediate phenotype during the in vitro differentiation with an increase in IRF4 expression while conservation of IRF8 that might represent the pre-PB stage. Tracking more carefully the different trajectories leading to the generation of PB could be a crucial advantage in the understanding of infection and vaccination response [60,61]. This identification strategy has the advantage to be well conserved between species, which facilitates the translation of findings to human system; unfortunately, it remains incompatible with cell sorting and functional experiments.

Altogether, our analysis attempts to draw a comprehensive overview of the PB and PC transcriptomes across species and across experimental conditions. This analysis provides exploratory resources and new insights not only into the tissue-dependent expression of PB-specific membrane markers but also into the molecular programme of human and mouse PB, offering reliable tools to follow those subsets in animal models and diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Valérie Le Troadec for her secretarial assistance. The authors would like to acknowledge the Cytometry Core Facility Hyperion (Brest, France) for their technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.G, M.B, L.L.P and S.H designed the study, performed experiments, analysed data and wrote the paper. M.M.C and C.D performed experiments and analysed data. O.M, D.C, C.J and J-O. P discussed data and edited the manuscript.

ORCID

Sophie Hillion  <https://orcid.org/0000-0002-3354-0981>

REFERENCES

- Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev*. 2012;247:52–63.
- Yoshida T, Mei H, Dorner T, Hiepe F, Radbruch A, Fillatreau S, et al. Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev*. 2010;237:117–39.
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:160–71.
- Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, et al. Analysis of interleukin-21-induced *Prdm1* gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity*. 2009;31:941–52.
- Tellier J, Shi W, Minnich M, Liao Y, Crawford S, Smyth GK, et al. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat Immunol*. 2016;17:323–30.
- Ellebedy AH, Jackson KJ, Kissick HT, Nakaya HI, Davis CW, Roskin KM, et al. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat Immunol*. 2016;17:1226–34.
- Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J Immunol*. 2004;173:7317–23.
- Mei HE, Hahne S, Redlin A, Hoyer BF, Wu K, Baganz L, et al. Plasmablasts with a mucosal phenotype contribute to plasmacytosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69:2018–28.
- Fournier EM, Velez MG, Leahy K, Swanson CL, Rubtsov AV, Torres RM, et al. Dual-reactive B cells are autoreactive and highly enriched in the plasmablast and memory B cell subsets of autoimmune mice. *J Exp Med*. 2012;209:1797–812.
- Hiepe F, Dorner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:170–8.
- Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 2002;99:2154–61.
- Auladell M, Nguyen TH, Garcillan B, Mackay F, Kedzierska K, Fox A. Distinguishing naive- from memory-derived human B cells during acute responses. *Clin Transl Immunol*. 2019;8:e01090.
- Qian Y, Wei C, Eun-Hyung Lee F, Campbell J, Halliley J, Lee JA, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(Suppl 1):S69–82.
- Garimalla S, Nguyen DC, Halliley JL, Tipton C, Rosenberg AF, Fucile CF, et al. Differential transcriptome and development of human peripheral plasma cell subsets. *JCI Insight*. 2019;4:126732.
- Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Perng GC, Polsrila K, Chandele A, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol*. 2012;86:2911–8.
- Pracht K, Meinzinger J, Daum P, Schulz SR, Reimer D, Hauke M, et al. A new staining protocol for detection of murine antibody-secreting plasma cell subsets by flow cytometry. *Eur J Immunol*. 2017;47:1389–92.
- Wilmore JR, Jones DD, Allman D. Protocol for improved resolution of plasma cell subpopulations by flow cytometry. *Eur J Immunol*. 2017;47:1386–8.
- Fink K. Origin and function of circulating plasmablasts during acute viral infections. *Front Immunol*. 2012;3:78.
- Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoretti IV, et al. Long-lived plasma cells are contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) subset in human bone marrow. *Immunity*. 2015;43:132–45.
- Valor LM, Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya AB, Brieva JA, Campos-Caro A. The transcriptional profiling of human in vivo-generated plasma cells identifies selective imbalances in monoclonal gammopathies. *PLoS One*. 2017;12:e0183264.
- de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125:1830–9.
- Cocco M, Stephenson S, Care MA, Newton D, Barnes NA, Davison A, et al. In vitro generation of long-lived human plasma cells. *J Immunol*. 2012;189:5773–85.
- Quach TD, Hopkins TJ, Holodick NE, Vuyyuru R, Manser T, Bayer RL, et al. Human B-1 and B-2 B cells develop from Lin-CD34+CD38lo stem cells. *J Immunol*. 2016;197:3950–8.
- Le Gallou S, Caron G, Delaloy C, Rossille D, Tarte K, Fest T. IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol*. 2012;189:161–73.
- Petri A, Dybkaer K, Bogsted M, Thruue CA, Hagedorn PH, Schmitz A, et al. Long noncoding RNA expression during human B-cell development. *PLoS One*. 2015;10:e0138236.
- Covens K, Verbinnen B, Geukens N, Meyts I, Schuit F, Van Lommel L, et al. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood*. 2013;121:5176–83.
- Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2014;28:77–83.
- Hoyer BF, Radbruch A. Protective and pathogenic memory plasma cells. *Immunol Lett*. 2017;189:10–2.
- Ge SX, Son EW, Yao R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*. 2018;19:534.
- Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, et al. IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nat Commun*. 2017;8:1443.
- Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med*. 2004;200:967–77.
- Minnich M, Tagoh H, Bonelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol*. 2016;17:331–43.
- Ramsey VG, Doherty JM, Chen CC, Stappenbeck TS, Konieczny SF, Mills JC. The maturation of mucus-secreting gastric epithelial progenitors into digestive-enzyme secreting zymogenic cells requires Mist1. *Development*. 2007;134:211–22.

34. Chen FY, Lee A, Ge S, Nathan S, Knox SM, McNamara NA. Aire-deficient mice provide a model of corneal and lacrimal gland neuropathy in Sjogren's syndrome. *PLoS One*. 2017;12:e0184916.
35. Lo HG, Jin RU, Sibbel G, Liu D, Karki A, Joens MS, et al. A single transcription factor is sufficient to induce and maintain secretory cell architecture. *Genes Dev*. 2017;31:154–71.
36. Hess DA, Strelau KM, Karki A, Jiang M, Azevedo-Pouly AC, Lee AH, et al. MIST1 links secretion and stress as both target and regulator of the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2016;36:2931–44.
37. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W90–7.
38. Scharer CD, Barwick BG, Guo M, Bally APR, Boss JM. Plasma cell differentiation is controlled by multiple cell division-coupled epigenetic programs. *Nat Commun*. 2018;9:1698.
39. Guo M, Price MJ, Patterson DG, Barwick BG, Haines RR, Kania AK, et al. EZH2 represses the B cell transcriptional program and regulates antibody-secreting cell metabolism and antibody production. *J Immunol*. 2018;200:1039–52.
40. Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*. 2003;4:124–31.
41. Nguyen DC, Garimalla S, Xiao H, Kyu S, Albizua I, Galipeau J, et al. Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. *Nat Commun*. 2018;9:3698.
42. Inoue C, Bae SK, Takatsuka K, Inoue T, Bessho Y, Kageyama R. Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes Cells*. 2001;6:977–86.
43. Li Y, Li H, Zhang L, Xiong S, Wen S, Xia X, et al. Growth/differentiation 5 promotes the differentiation of retinal stem cells into neurons via Atoh8. *J Cell Physiol*. 2019;234:21307–15.
44. Herviou L, Jourdan M, Martinez AM, Cavalli G, Moreaux J. EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in human plasma cell differentiation. *Leukemia*. 2019;33:2047–60.
45. Ruer-Laventie J, Simoni L, Schickel JN, Soley A, Duval M, Knapp AM, et al. Overexpression of Fkbp11, a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3:265–79.
46. Fujii S, Nakamura S, Oda A, Miki H, Tenshin H, Teramachi J, et al. Unique anti-myeloma activity by thiazolidine-2,4-dione compounds with Pim inhibiting activity. *Br J Haematol*. 2018;180:246–58.
47. Woodland RT, Fox CJ, Schmidt MR, Hammerman PS, Opferman JT, Korsmeyer SJ, et al. Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival. *Blood*. 2008;111:750–60.
48. Tsui C, Martinez-Martin N, Gaya M, Maldonado P, Llorian M, Legrave NM, et al. Protein kinase C-beta Dictates B cell fate by regulating mitochondrial remodeling, metabolic reprogramming, and heme biosynthesis. *Immunity*. 2018;48:1144–59 e5.
49. Sandoval H, Kodali S, Wang J. Regulation of B cell fate, survival, and function by mitochondria and autophagy. *Mitochondrion*. 2018;41:58–65.
50. Tseng GC, Ghosh D, Feingold E. Comprehensive literature review and statistical considerations for microarray meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:3785–99.
51. Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One*. 2014;9:e78644.
52. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41:1040–51.
53. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Sterybo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014;507:366–70.
54. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015;521:94–8.
55. Lino AC, Dang VD, Lampropoulou V, Welle A, Joedicke J, Pohar J, et al. LAG-3 inhibitory receptor expression identifies immunosuppressive natural regulatory plasma cells. *Immunity*. 2018;49:120–33.e9.
56. McCarron MJ, Park PW, Fooksman DR. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood*. 2017;129:2749–59.
57. Xu H, Chaudhri VK, Wu Z, Biliouris K, Dienger-Stambaugh K, Rochman Y, et al. Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nat Immunol*. 2015;16:1274–81.
58. Carotta S, Willis SN, Hasbold J, Inouye M, Pang SH, Emslie D, et al. The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J Exp Med*. 2014;211:2169–81.
59. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. 2013;38:918–29.
60. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev*. 2018;283:138–49.
61. Andrews SF, Chambers MJ, Schramm CA, Plyler J, Raab JE, Kanekiyo M, et al. Activation dynamics and immunoglobulin evolution of pre-existing and newly generated human Memory B cell responses to influenza hemagglutinin. *Immunity*. 2019;51:398–410 e5.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Grasseau A, Boudigou M, Michée-Cospolite M, et al. The diversity of the plasmablast signature across species and experimental conditions: A meta-analysis. *Immunology*. 2021;00:1–15. <https://doi.org/10.1111/imm.13344>

**ANNEXE 3 : MOLECULAR MECHANISMS DRIVING IL-10 PRODUCING B
CELLS FUNCTION : STAT3 AND MAF AS UNDERESTIMATED
CENTRAL KEY REGULATORS**



Molecular Mechanisms Driving IL-10-Producing B Cells Functions: STAT3 and c-MAF as Underestimated Central Key Regulators?

Magalie Michée-Cospolite^{1†}, Marina Boudigou^{1†}, Alexis Grasseau¹, Quentin Simon¹, Olivier Mignen¹, Jacques-Olivier Pers², Divi Comec², Laëtizia Le Pottier¹ and Sophie Hillion^{2*}

¹ U1227, LBAI, Univ Brest, Inserm, Brest, France, ² U1227, LBAI, Univ Brest, Inserm, and CHU Brest, Brest, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Luman Wang,
Fudan University, China

Reviewed by:

Avijit Ray,
GlaxoSmithKline, United States
Hong Zan,
The University of Texas Health Science
Center at San Antonio, United States

*Correspondence:

Sophie Hillion
sophie.hillion@univ-brest.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
B Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 November 2021

Accepted: 11 February 2022

Published: 10 March 2022

Citation:

Michée-Cospolite M,
Boudigou M, Grasseau A,
Simon Q, Mignen O, Pers J-O,
Comec D, Le Pottier L and Hillion S
(2022) Molecular Mechanisms Driving
IL-10-Producing B Cells Functions:
STAT3 and c-MAF as Underestimated
Central Key Regulators?
Front. Immunol. 13:818814.
doi: 10.3389/fimmu.2022.818814

Regulatory B cells (Bregs) have been highlighted in very different pathology settings including autoimmune diseases, allergy, graft rejection, and cancer. Improving tools for the characterization of Bregs has become the main objective especially in humans. Transitional, mature B cells and plasma cells can differentiate into IL-10 producing Bregs in both mice and humans, suggesting that Bregs are not derived from unique precursors but may arise from different competent progenitors at unrestricted development stages. Moreover, in addition to IL-10 production, regulatory B cells used a broad range of suppressing mechanisms to modulate the immune response. Although Bregs have been consistently described in the literature, only a few reports described the molecular aspects that control the acquisition of the regulatory function. In this manuscript, we detailed the latest reports describing the control of IL-10, TGF β , and GZMB production in different Breg subsets at the molecular level. We focused on the understanding of the role of the transcription factors STAT3 and c-MAF in controlling IL-10 production in murine and human B cells and how these factors may represent an important crossroad of several key drivers of the Breg response. Finally, we provided original data supporting the evidence that MAF is expressed in human IL-10-producing plasmablast and could be induced *in vitro* following different stimulation cocktails. At steady state, we reported that MAF is expressed in specific human B-cell tonsillar subsets including the IgD⁺ CD27⁺ unswitched population, germinal center cells and plasmablast.

Keywords: regulatory B cells, molecular drivers, c-MAF, STAT3, B-cell differentiation

INTRODUCTION

B cells with immunosuppressive function (Bregs) have been highlighted for the first time in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model (1). Although the induction of the disease was not influenced by the absence of B cells, B-cell depleted mice exhibited no substantial recovery suggesting a regulatory role. During the past decade, various studies have reported this regulatory B cell-induced immune response suppression in very diverse pathophysiological settings

like autoimmune diseases, transplantation, virus immunity, and cancer. The heterogeneity of the Breg subsets is a subject of interest for many years (2–5) and consensus opinions suggest that Bregs may arise from multiple progenitors depending on the microenvironment. Beyond their phenotypic status, Bregs used different immunosuppressive mechanisms such as the production of interleukin (IL)-10, granzyme B (GZMB), and transforming growth factor (TGF) β to regulate other immune cells (3, 6, 7). IL-10 has become the most documented suppressive mechanism by B cells and in many cases, IL-10 can be often co-expressed with other regulatory molecules such as TGF β or IL-35 (8). New studies are now starting to clarify the different molecular mechanisms that may control the acquisition of the Breg function. In this review, we described the last reports establishing new insights into the molecular control of TGF β , GZMB, and IL-10 producing B cells (B10) with a specific focus of an understudied transcription factor (TF) in B cells: *the avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene c-MAF* (MAF).

MOLECULAR CONTROL OF THE PRODUCTION OF TGF β AND GZMB IN B CELLS

TGF β -Producing Regulatory B Cells

TGF β -producing B cells with regulatory properties were first described in cancer, especially in lung metastasis from breast cancer in mouse models (9). TGF- β ⁺ Bregs that exhibited a particular phenotype (CD19⁺, CD25^{high}, IgD^{high}, CD21^{low}, CD23^{low}, CD43⁺, IgM^{int}, and CD62L^{low}) were able to decrease T cell proliferation and induce *de novo* regulatory T cells (Tregs) (Foxp3⁺) *in vivo* and *in vitro*. In this study, they demonstrated that the tumor-microenvironment was necessary to both mouse and human Breg development. These TGF β -expressing Bregs expressed high levels of phosphorylated-STAT3 (pSTAT3). The same group further demonstrated that the inhibition of STAT3 phosphorylation by resveratrol (phytoalexin found in some plants as mulberries or peanuts) induced the decreased expression of TGF β by Bregs leading to the reduced expansion of Tregs *in vivo* and *in vitro* (10). Inhibitory effect of the resveratrol as a potent inhibitor of STAT3 phosphorylation and acetylation is mostly mediated by the Sirtuin 1 protein (SIRT1) an NAD⁺-dependent class III histone deacetylase (HDAC). Although SIRT1/STAT3 axis has been extensively studied in cancer cells (11, 12), there are few reports on its role on B-cells. However, it was recently demonstrated that B-cell specific SIRT1 deficient cells displayed an increase of IL10 expression *in vitro* following LPS stimulation (13). Moreover, SIRT1 is highly expressed in resting naïve mouse B cells but dramatically reduced following cell activation and immunization. In this context, SIRT1 suppressed AICDA expression and the class switch DNA recombination through the regulation of the acetylation of STAT3 and the NF κ B p65, another important target of SIRT1 (14). Underlying mechanisms of these different interactions with other molecular drivers of TGF β are still unclear, especially in B cells.

Some studies highlighted the role of the different TGF β isoforms in the regulatory properties of B cells. A first mouse study revealed the co-expression of TGF β 1 and TGF β 3 at similar levels in resting B cells but in IgM-activated B cells, TGF β 1 was increased and TGF β 3 was highly reduced. In a coculture model with resting B cells and T cells, Treg expansion was only dependent on the TGF β 3 isoform (15). However, in the EAE mouse model, TGF β 1-deficient B cells led to increased EAE score level and the disease severity was linked to the expansion of T cell helper (Th)1 in conserved non-coding sequences (CNS) (16). So, the two isoforms TGF β 1 and TGF β 3 seem to be implicated in Breg properties but with microenvironment-dependent mechanisms. Unlike in mice, the activation of human B cells upon BCR and Toll-like receptor (TLR) 9 induced decreased expression of TGF β 1 (highly expressed in resting B cells) but an increase of IL-10 expression (17). Unfortunately, in most of the studies on TGF β -expressing Bregs, the nature of the isoform involved is still elusive.

The co-expression of TGF β and IL-10 by Bregs is frequently reported in the literature but the role of TGF β is controversial. One study demonstrated that B cells infiltrating tumors expressed TGF β and IL-10 and inhibited T cell proliferation and the generation of interferon (IFN) γ -CD8⁺ T cells. This mechanism was TGF β -dependent (18). However, in the model of low-dose methotrexate-induced tolerance in mice, the generated Bregs co-expressed TGF β and IL-10, but only IL-10 seemed to be implicated in the tolerance mechanism (19). Two additional studies performed in humans demonstrated the role of TGF β in Bregs-mediated regulation. In the first study, *in vitro* Bregs were induced following a CD40 ligand (CD40L), CpG, and IL-4 stimulation and were able to decrease T-cell proliferation and induce the Tregs expansion. FoxP3 expression and Tregs generation were reduced in the presence of the anti-TGF β blocking antibody (Ab) but not after IL-10 blocking (6). We also demonstrated that *in vitro*-induced Bregs used a TGF β -dependent mechanism in controlling T-cell proliferation whereas the decrease of IFN γ -Th1 cells was IL-10-dependent (20).

Other information puzzled the understanding of the generation of TGF β -producing-Bregs because TGF β was first described as able to inhibit B cell proliferation and Ig production (21). Moreover, a recent study highlighted the synergy between IL-10 and TGF β 3 to inhibit B-cell proliferation and Ig production after TLR4 or TLR7 activation by decreasing energy metabolism of B cells such as glycolysis. Interestingly, pSTAT3 was also expressed in these B cells (22). However, the synergistic role of IL-10 and TGF β in controlling Bregs function remains to be explored.

Expression of GZMB in B Cells

Initially, the GZMB had been described as a compound of the cytoplasmic granules of cytotoxic cells that induced targeted cell death when accompanied by perforin (23). However, over the last decade, the secretion of GZMB by B cells, Tregs, or plasmacytoid dendritic cells, has been found to exert an immunosuppressive effect through performing-independent mechanisms. This GZMB-expressing Breg subset has been

detected in a variety of pathological contexts: chronic lymphocytic leukemia (CLL) (24), solid tumor infiltration (7), autoimmune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (25), viral infections (26) and in the context of the transplantation (27). Although GZMB-expressing B cells were found to be enriched in differentiated B cells like plasmablasts (PB), less than 3% of circulating B cells seemed to express GZMB in healthy individuals (28).

One of the key inducers of the production of GZMB in B cells is IL-21. Jahrsdörfer's group first reported that IL-21 directly induced the secretion of enzymatically active GZMB by human B cells. The effect of IL-21 is synergically enhanced by CpG-ODN or BCR engagement (24, 29). Moreover, they demonstrated that GZMB and IL-21 serum levels are highly correlated in SLE and that CD5⁺ B cells from SLE and Sjögren syndrome patients, which constitutively expressed GZMB, displayed higher expression of IL-21 receptor (30). IL-21 is mainly secreted by activated CD4⁺ T cells, especially Th17 and follicular helper T cell (T_{fh}) subsets and natural killer T cell (NKT) (31). A study has shown that macrophages-derived IL-15 synergized with IL-21 to promote GZMB expression and B cell differentiation into CD38⁺ CD20⁺ PB. While IL-21 alone induced a quick and massive transcription of GZMB mRNA but a minimal production of the protein, the addition of IL-15 allowed efficient translation and/or secretion of the GZMB protein (32).

Little is known about the molecular control of GZMB production in B cells and the generation of GZMB⁺ Bregs remains to be understood. Besides, the inability of mouse B cells to secrete GZMB further complicates addressing this question (33). Nevertheless, it would appear that pSTAT3 signaling is implicated in GZMB expression. IL-21 signaling is known to activate JAK/STAT pathways, especially pSTAT1 and pSTAT3, and to a lesser extent pSTAT5a and pSTAT5b (34). An up-regulation of pJAK1, pJAK3, and pSTAT3, but not pTYK2 or pSTAT1, was observed in B cells stimulated with IL-21 and anti-BCR, and the use of a JAK inhibitor abrogated the GZMB production (29). The use of STAT1, STAT3, or STAT5 inhibitors confirmed the involvement of STAT3 signaling but not STAT1 and STAT5, in GZMB synthesis. Moreover, B cells failed to produce GZMB in patients with the autosomal-dominant hyper-IgE syndrome which exhibit heterozygous STAT3 mutations, confirming the unique role of STAT3 in GZMB production (32).

Recently, Sophie Brouard's group has developed an expansion mixture containing IL-21, anti-BCR, CpG ODN, IL-2, and CD40L, to induce GZMB expression in more than 90% of B cells. While the presence of IL-21 and anti-BCR seemed indispensable to induce a strong expression of GZMB, the presence of CpG ODN and IL-2 seemed to be necessary for the maintaining of B-cell survival in culture (28). To better characterize GZMB-producing Bregs, they performed RNAseq analysis of sorted *in vitro*-expanded GZMB-positive and GZMB-negative B cells (35). Thirty-six genes were found to be differentially expressed between these two populations, including the top differential expressed genes (DEGs) *GZMB*, *LAG3*, and *FASLG*, which were already described for their role in

immune regulation. They revealed a higher frequency of LAG-3⁺ cells but a similar expression of IL-10 in GZMB-positive Bregs when compared to GZMB-negative B cells. In this transcriptomic analysis, *SOX5* was the only gene encoding a TF found to be differentially expressed. While *SOX5* was found to be downregulated during the proliferation of B cells, its high expression might limit proliferation allowing PB differentiation (36). However, as an autocrine production in GZMB⁺ Bregs, the GZMB stimulates the proliferation of these cells (28). At this point, it is difficult to say whether the *SOX5* down-regulation may play a role in the generation and function of GZMB-positive Bregs or whether it is only a consequence of the autocrine production of GZMB itself.

STAT3 AND ITS PARTNERS IN THE GENERATION OF IL-10- PRODUCING B CELLS

IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by virtually all immune cell types and possesses immunosuppressive properties. IL-10 is an inhibitor of a broad spectrum of monocytes/macrophages and T-cell functions, including cytokine synthesis, effector subset differentiation, and expression of co-stimulatory molecules such as CD80/CD86. However, the role of IL-10 on B cells was described as ambivalent. First reports described IL-10 as a growth factor for B cells. It promotes B-cell proliferation, Ab production, and class II MHC expression depending on their activation state (37). The addition of IL-10 in CD40-activated B cells results in a very high immunoglobulin production indicating differentiation of B cells into plasma cells (38, 39). IL-10 was an essential factor for isotype switching in presence of anti-CD40 stimulation leading to the production of IgM, IgG, and IgA (IgA1 and IgA2) in combination with TGFβ (40). Subsequent important reports described the role of IL-10 in promoting the differentiation of memory B cells into PB and plasma cells (41, 42).

B cells secrete a very low amount of IL-10 at a quiescent state however specific stimulatory signals were described to be involved in the induction of IL-10 producing B cells with suppressive functions: the BCR, CD40, TLR, and cytokine signaling including IL-21, IL-6, or TGFβ (43–45). Although the time-sequence and location of these events have to be clarified *in vivo*, the molecular signals leading to IL-10 production by B cells have been studied less thoroughly than in Th cells and macrophages (reviewed in (46)). Among the key factors involved in the control of IL-10 production, STAT3 appears to be involved in the different activation cascades leading to IL-10 secretion by B cells (Figure 1). It was demonstrated in CD1d^{hi} CD5⁺ B10 cells, that whilst the absence of the B-cell linker protein (BLNK) had no consequence on the distribution of Bregs in tissues, its expression was indispensable to IL-10 production. After TLR4 activation by lipopolysaccharide (LPS), phosphorylated BLNK interacts with the Bruton tyrosine kinase (Btk) leading to the phosphorylation of STAT3 that next translocates to the nucleus to transactivate the *IL10* gene (47) (Figure 1).

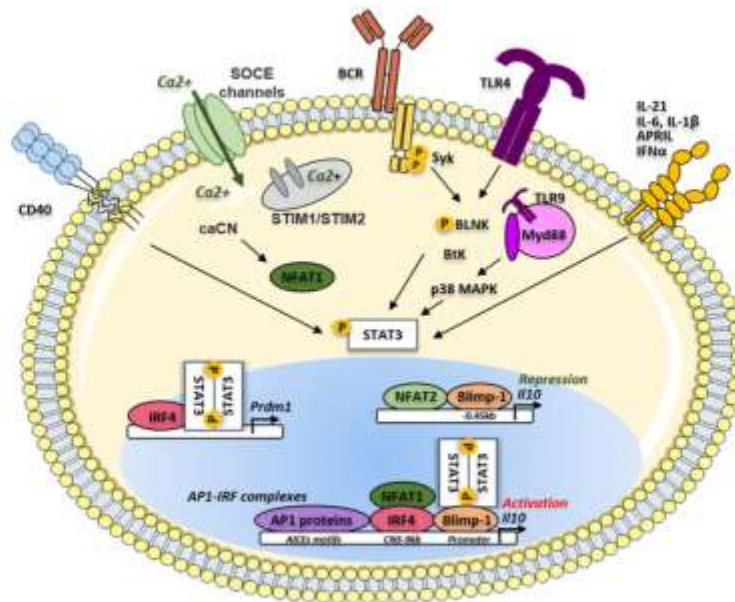


FIGURE 1 | IRF4/Blimp-1/STAT3 activation pathways on *Il10* gene regulation in Bregs. The phosphorylation of STAT3 could be activated following different microenvironment signals such as different cytokines (APRIL, IL-21, IL-6, IL-1 β and IFN α), the antigen or TLR ligands. Phosphorylated STAT3, translocates to the nucleus and could bind IRF4 to induce the transcription of the *Prdm1* gene. The translation of *Prdm1* gene leads to the production of the Blimp-1 protein supporting the binding of STAT3 on the *Il10* gene promoter. The binding of Blimp-1 together with NFAT2 could induce repression of the *Il10* gene transcription. The different AP1 proteins such as BATF, Jun B and Jun D could bind the AICES motifs on the *Il10* gene to promote its transcription through the cooperation of IRF4. IL, Interleukin; IFN α , Interferon alpha; APRIL, A Proliferation inducing ligand; SOCE, Store operated calcium entry; TLR, toll-like receptor; CNS, conserved non-coding sequence; TLR, toll-like receptor; BCR, B-cell receptor; BTK, Bruton tyrosine kinase; BLNK, B-cell linker protein; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; Syk, Spleen associated tyrosine kinase; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; NFAT, Nuclear factor of activated T-cells; STIM, Stromal interaction molecules; CaCN, active calcineurin A; Myd88, Myeloid differentiation primary response protein; Blimp-1, B lymphocyte-induced maturation protein 1; *Prdm1*, PR domain zinc finger protein 1; AP1, Activator protein 1; IRF, Interferon regulatory factor; AICES, AP1-IRF-composite elements.

In SLE patients, CD24^{high} CD38^{high} Bregs exhibited a defect in CD40 signaling with impairment of STAT3 phosphorylation and IL-10 production (48). Similar results were described in patients with systemic sclerosis where TLR9-induced IL-10 production by B cells was impaired because of a defect in p38 MAPK and STAT3 signaling (49, 50). Various cytokines increased *in vitro* the generation of human B10, often in combination with TLR activation in a STAT3-dependent manner including APRIL (51), IFN α (52, 53), IL-35 (54), IL-21 (55), IL-6, or IL-1 β (56). Interestingly mice with the specific deletion of STAT3 in B cells developed a severe experimental autoimmune uveitis and displayed exacerbated EAE (57). In both diseases, the deficiency of STAT3 in B cells induced a defect not only in the induction of B10 cells but also in the generation of Tregs. Moreover, the authors demonstrated that expression of the CD80 and CD86 costimulatory molecules was markedly upregulated on B cells in STAT3-deficient mice, suggesting that STAT3 signaling may also contribute to restraining excessive activation of T cells.

Cooperation of BLIMP1 and IRF4 in the Generation of IL10 Producing B Cells

Once activated, STAT proteins can directly bind on a single motif on the *Il10* promoter (58) or may interact with other TF to

induce IL-10 expression. The mouse *Il10* locus has been extensively studied in naive and differentiated T cells (59–61) mostly using DNase I hypersensitivity approaches highlighting at least nine genomic regions with potent high transcriptional activity. These several conserved noncoding sequences (CNS) presented a great homology between mice and humans. Together with the promoter, the CNS-9, CNS-4.5, located at 9 kb and 4.5 kb, respectively, upstream the *Il10* gene transcription start site (TSS), and the CNS+3, and CNS+6.5 Kb, located downstream the TSS, have been described as the main activator sites of the *Il10* transcription in T-cell subsets (62, 63). In Th1 cells, the B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1) binds the CNS-9 site in a STAT4-dependent manner, and mice with a T-cell-specific Blimp-1 deficiency had a severe inflammatory response during *T. gondii* infection, suggesting that Blimp-1 was involved in the IL-10-dependent control of Th1 immune responses (64).

However, the role of Blimp-1 in the generation of B10 is conflicting. In a recent study, *Prdm1* mRNA expression was shown upregulated in IL10-positive compared to IL-10-negative B cells following LPS stimulation. This was then confirmed *in vivo* using a *Prdm1*-EYFP reporter mouse model. This group also demonstrated that the deletion of *Prdm1* led to the increased

frequency of B10 cells following LPS injection suggesting a negative role of Blimp-1 on the *Il10* transcription. Using luciferase reporter assays and chromatin immunoprecipitation (ChIP), these authors demonstrated that the CNS-0.45 kb site on the *Il10* gene was the major Blimp-1 suppressive site of the *Il10* transcription (Figure 1). They further demonstrated that STAT3 needed the Blimp1 DNA-binding domain to efficiently transactivate the *Il10* promoter indicating that Blimp1 could exhibit alternatively a positive role and negative role depending on the presence or absence of its molecular partners (65). However, these binding sites were not reported in primary studies identifying the pattern of regulatory regions within the *Il10* gene in T cells suggesting a B cell-specific regulation of the *Il10* transcription (46, 59, 61).

The Blimp-1 regulated genes have been extensively studied during the B-cell differentiation, revealing that Blimp1 could act as both transcriptional repressor and activator. Using streptavidin-mediated chromatin precipitation coupled with deep sequencing (Bio-ChIP), the *Il10* gene was robustly identified among the 93 genes potentially directly activated by Blimp-1 (66, 67). Regulatory plasma cells producing IL-10 have been reported in mice in EAE and during the *Salmonella Typhimurium* infection (3, 4). In EAE, the PB (CD138⁺ CD44^{high}) subset was the main IL-10 producer population, generated through a germinal center (GC) independent pathway as the EAE course remained unchanged in Bcl6^{hi/hi} knock-out mice. By investigating the mechanisms by which PB produced IL-10, it was demonstrated that B cells lacking IRF4 but not Blimp-1 have an impairment of IL-10 production. The TF IRF4 binds to the *Il10* CNS-9 enhancer site in mouse PB as previously described in T cells (68). This region highly conserved in the vertebrate genome has been also described as a major site of fixation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT1 also named NF-ATc2) (69). The involvement of different CNS in the regulation of *Il10* transcription was significantly studied in different Th cell populations. Whereas the CNS-9 seemed to be potentially active in both Th1 and Th2 lineages, the CNS+6.45 and CNS-26 are specific for Th2 cells (68), where the CNS+6.45 region is a binding site for the activator protein 1 (AP1) proteins JunB, and c-Jun. However, such distinctions are not yet clearly established in human B10 compared to other B-cell subsets. Furthermore, the TF IRF4 itself binds to the DNA in a weak-dependent manner due to its carboxy-terminal auto-inhibitory domain. IRF4 has to form a complex with AP1 family proteins like BATF or JunB to increase its binding affinity and thus regulates genes expressing the AP1-IRF consensus motif elements (AICEs) (70, 71). In B cells, IRF4 through the cooperation with BATF, JunB, and JunD was described to bound to AICEs of *Il10* and *Ebi3* (coding for an IL-35 subunit) loci (70, 72). In T cells, Blimp-1 expression was required in a subset of IL-10 expressing Tregs localized at mucosal sites (73). In this subset, IRF4 directly regulated Blimp-1 expression at the transcriptional level. These data were also observed in B cells following IL-21 stimulation showing that STAT3 and IRF4 cooperate to promote *Prdm1* expression (74) (Figure 1). More recently an elegant study investigated the IL27-driven

transcriptional network highlighting several key IL-10 molecular regulators (63) suggesting that *Prdm1*, *Irf4*, and *Irf8* may have a suppressive role in the production of IL-10 in type 1 Tregs (Tr1). Interestingly, IRF4 and IRF8 antagonized during B-cell activation and differentiation (75) suggesting opposite roles in the control of B-cell-specific *Il10* transcription.

We thus could hypothesize that IRF4 by utilizing distinct binding partners could mediate cell-type and stimulus-specific IL-10 production in different lymphocyte subsets. Furthermore, the time-frame of the molecular control of IL-10 is crucial and may explain contradictory relationships. The molecular mechanisms required for the induction of *Il10* in B cells may change throughout time to ensure its maintenance leading to important modification in the cooperative binding factors. Further studies, especially kinetics studies have to be designed to identify how the core triad including BLIMP-1, IRF4 and STAT3 may cooperate or act independently in the generation of B10 cells (Figure 1).

STAT3 and the NFAT Family in the Generation of IL-10 Producing B Cells

STAT3 signaling is involved in the early activation of B cells, especially in the BCR signalosome recruitment and the STAT3 deficiency led to reduction of pAkt and pErk1/2 and both mTORC1 and mTORC2 activity following BCR stimulation (76). Furthermore, STAT3 has also a non-canonical function and its localization to the endoplasmic reticulum (ER) modulates ER-mitochondria calcium (Ca²⁺) release by interacting with the Ca²⁺ channel IP3R3 (77).

The implication of the BCR signaling in the generation of B10 is still discussed. Although *in vitro* activation of splenic B cells with anti-IgM Ab failed to induce IL-10 production compared to TLR signaling, there is a dramatic decrease of B10 cell numbers in the MD4 transgenic mice with a fixed BCR rearrangement suggesting that BCR diversity may direct B10 development (43). A report using TgVH3B4 mice that express a VH derived from an actin-reactive natural Ab, 3B4 revealed that B10 cells mainly targeted self-antigens (Ag). This study also suggest that B10 could be positively selected by self Ag and that high BCR signaling could promote B10 development and IL-10 production (78). In contrast to the MD4 model where there is no virtually Ag recognition, the interaction with the Ag seems mandatory for the maintenance and generation of B10. This study is in agreement with others showing that B10 induction is negatively or positively modulated in CD19^{-/-} and CD22^{-/-} KO mice, respectively where BCR signaling is directly altered.

B cells from mice that are deficient for the ER calcium sensors stromal interaction molecules 1 and 2 (STIM1 and STIM2) have normal B-cell development but display defective activation of NFAT1 and aberrant calcium (Ca²⁺) signaling following BCR ligation (79) (Figure 1). In these mice, the BCR-induced dephosphorylation of NFAT1 was markedly impaired in B cells leading to a defect in IL-10 production, observations that were recapitulating with NFAT1 inhibitors such as cyclosporine or Tacrolimus (FK506). The authors further demonstrated that the double STIM1/STIM2 KO mice developed an exacerbated EAE

due to a dramatic depletion of B10. These data support that a Store Operated Calcium (SOC) influx induced by BCR stimulation drove IL-10 expression in a STIM-dependent NFAT1 activation manner. Several years later, the same group demonstrated that the transfection of active calcineurin A markedly increased BCR-induced IL-10 production through activation of NFAT1 in B cells using an *Il10-GFP* reporter mouse model. Furthermore, they showed that this induction is repressed in *Irf4* KO mice suggesting that NFAT1-dependent IL-10 production required IRF4 and was dependent on the Ca^{2+} influx (3).

On the other hand, another report showed that mice with an NFAT2 deficiency in the B-cell compartment have two-fold more B10 cells compared with wild-type B cells and lead to the amelioration of EAE (80). More recently, similar results showed that NFAT2 ablation in B cells suppressed the induction of skin inflammation by an increase of B10 (CD1d⁺ CD5⁺ and CD138⁺ PB) in the spleen, the lymph nodes, and the blood (81). They have further shown that NFAT2 binds directly to the *Il10* gene *in vivo* and suppresses its transcription. However, the role of NFAT1 and NFAT2 in IL-10 production by B cells remains complex and differs between normal and malignant B cells. We previously demonstrated that the CD5 molecule, overexpressed in CLL B cells, promoted IL-10 expression and cell survival through a STAT3 and NFAT2-dependent pathway (82) and that IL-10 expression by B cells was directly connected with the aggressivity of the disease (83). These studies were further extended, demonstrating that NFAT2 controls multiple anergy-associated genes, BCR expression, and Ca^{2+} response in CLL B cells (84) and that knockdown of STAT3 significantly impaired the ability of CLL B cells to produce IL-10 and reverse T-cell dysfunction (85). Interestingly similar observations were made in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) showing that STAT3 and NFAT2 interaction induced an immunoregulatory phenotype in malignant B cells with the upregulation of IL-10 and programmed Death-Ligand 1 (PDL1) (86).

This fine-tune regulation of Ca^{2+} signaling in B cells by its different partners including the balance between NFAT1 and NFAT2 and their interaction with STAT3 may be an important crossroad in the generation of B10 in normal and malignant B cells.

STAT3 and Metabolic Pathways in the Generation of IL-10 Producing B Cells

The STAT3 dimers translocate to the nucleus and regulate promoter genes with STAT3-binding elements exhibiting a broad range of cellular processes (87). Among the different STAT3 responsive genes, STAT3 induces the transcription of the Hypoxia-inducible factor (HIF) 1a in BCR and LPS-activated B cells through the ERK and NFkB-dependent pathways, respectively (88, 89) (Figure 2). HIFs are heterodimeric TF, consisting of an oxygen-labile alpha subunit (HIF- α) and a stable beta subunit (HIF- β). Three O₂-sensitive HIF α proteins have been described so far, HIF-1 α , HIF-2 α -also known as EPAS1, and HIF-3 α (90). The B-cell-specific deletion of HIF-1 α , but not HIF-2 α , resulted in a defect in IL-10 production by B cells (88). Except for an important decrease of the B1a population in the

peritoneum observed in Mb1^{cre}Hif1a^{fl/fl} mice, no other defect in the B-cell maturation was observed. This group further demonstrated that in BCR-stimulated B cells, HIF-1 α cooperated with pSTAT3 to bind to hypoxia-responsive element (HRE) I and HRE II regions on the *Il10* promoter under hypoxic conditions. These authors showed that HIF-1 α controlled the glycolytic metabolism required for the normal expansion of CD1d^{high} CD5⁺ Bregs *in vivo*. This report was supported by an additional study demonstrating that the suppression of HIF-1 α in B cells led to exacerbated colitis through CD11b and IL-10 downregulation (89). The hypoxic microenvironment has been described in the physiological situation as during the GC reaction in secondary lymphoid organs (91), but also in solid tumors, transplantation, or inflammatory diseases. The fine characterization of Bregs in normal or pathophysiological tissues promises new stimulating insights in the better comprehension of these pathophysiological mechanisms.

Beyond the control of the glycolysis pathway, another metabolic driver involved in the control of IL-10 expression in B cells was recently described implying lipid metabolism through the multi-step process of transformation of Acetyl CoA to Cholesterol. The abrogation of the HMG-CoA reductase enzyme activity by atorvastatin led to the suppression of TLR9-induced regulatory capacities of human B cells (92). It was further demonstrated that IL-10 production was dependent on the geranylgeranyl transferase (GGTase) 1 (GGTi) that catalyzes conversion of Geranyl-Geranyl-PP (GGPP) toward the isoprenylation pathway. By controlling the downstream Ras-dependent PI3K-AKT signaling following TLR9 stimulation, the GGTase *via* inhibitory phosphorylation on the Serine 9 prevented the activity of the glycogen synthase kinase 3 (GSK3 β) and the subsequent *Il10* transcription inhibition (Figure 2). GSK3 was already described as an important repressor of *Il10* among the Th1, Th2, and Th17 subsets (93, 94) and in dendritic cells (95) at the epigenetic level. The comparative RNA-sequencing analysis of TLR9 stimulated B cells in the presence or absence of GGTi revealed the strong downregulation of several TF including *Prdm1*, *Batf* (Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor), and the *Aryl-hydrocarbon receptor (AhR)*. Finally, the siRNA-knockdown of Blimp-1 *in vitro* led to the reduction of the TLR9-mediated IL-10 production by B cells. This study is, so far, the only report that established the direct involvement of Blimp-1 in the generation of B10 cells.

In B cells, different studies have shown the AhR implication in IL-10 production in collaboration with numerous transcriptional cofactors (96) (Figure 3). The AhR is an environmental sensor that binds on a variety of ligands such as exogenous toxins (dioxin), xenobiotics, and endogenous derivatives metabolites from cells or microbiota. Mauri's group has established the involvement of the AhR in the control of *Il10* transcription in the immature CD19⁺ CD21^{high} CD24^{high} B cell population in mice. *In vivo*, B cell-specific deletion of AhR caused exacerbated arthritis and promoted excessive inflammation by depleting B10. The AhR binding site seems to be located at -3.5 kb upstream of the TSS on the *Il10* gene in a non-CNS region suggesting putative difference with human Bregs (97). This study was further extended by demonstrating that change in the short-chain fatty

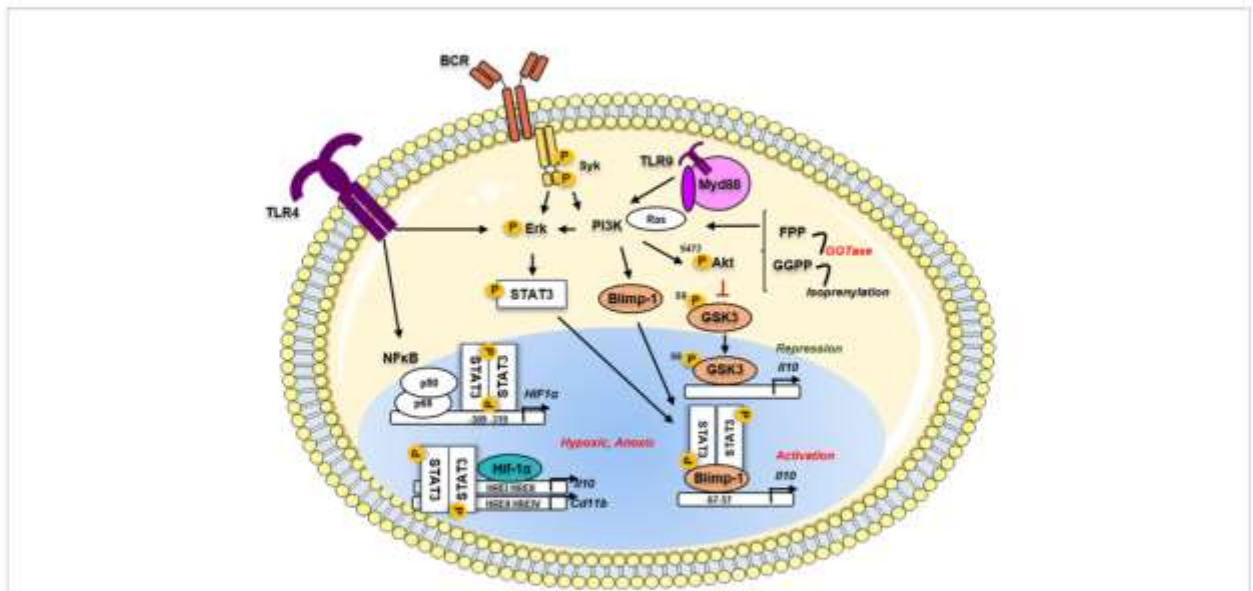


FIGURE 2 | Implication of the metabolic pathways in the regulation of the *I10* gene in Bregs. Phosphorylated STAT3 could induce metabolic pathways such as the Hypoxia sensing by the transcription of Hif-1 α . The Hif1 α protein binds on the HRE sites located on the *I10* gene to induce its transcription and its production by Bregs. In parallel, another metabolic driver implicated in the multi-step transformation of acetyl-CoA to cholesterol, the geranylgeranyl transferase I (GGT) catalyses the conversion of geranylgeranyl-PP (GGPP) to drive the isoprenylation process. This mechanism controls the Ras-dependent downstream signal of the PI3K-Akt pathway, leading to the restriction of the inhibitory GSK3 activity and thus activation of the *I10* transcription. The GGP-dependent pathway via the regulation of the PI3K downstream signaling regulated the *Prdm1* gene translation and the Blimp-1 translation directly promoting *I10* production, TLR, toll-like receptor; BCR, B-cell receptor; Myd88, Myeloid differentiation primary response protein; Syk, Spleen associated tyrosine kinase; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; Blimp-1, B lymphocyte-induced maturation protein 1; PI3K, Phosphoinositide 3 Kinase; Erk, Extracellular signal-regulated kinase; GSK3, glycogen synthase kinase; Akt, Protein kinase B; Ras, Rat sarcoma virus protein; FPP, Farnesyl pyrophosphate; GGPP, Geranylgeranyl pyrophosphate; GGTase, geranylgeranyl transferase; HIF1 α , hypoxia inducible factor 1 subunit alpha; NF κ B, Nuclear factor kappa B; p50, p50 protein; p65, p65 protein; HRE, hypoxia response element.

acid (SCFA) butyrate levels influenced the generation of IL10⁺ CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} B cells in patients with rheumatoid arthritis. By using an antigen-induced mouse model of arthritis, the authors established that the butyrate supplementation was sufficient to suppress the disease by increasing Bregs suppressive ability through an AhR dependent-manner (98). Moreover, AhR seems to also regulate the inhibitory receptor TIGIT and *I10* expression in TIM1⁺ B cells (99). Several years before, the fatty acid palmitate was demonstrated in synergy with CXCL12 able to induce IL-10 production in adipose B cells through the PI3K and NF κ B signaling (100). News studies have recently demonstrated the role of SCFA in controlling B10 generation with some discrepancies mainly due to the different *in vitro* stimulation cocktails used for the B10 induction. The SCFA acetate, known to influence the lipid and the tricarboxylic acid (TCA) cycle, was demonstrated directly promoting the differentiation of IL-10 producing B cells from B1a progenitors in mice or from CD24^{high} CD27⁺ B cells in humans with a more potent activity than the butyrate (101). The inhibition of the conversion of acetate to acetyl-CoA by the repression of acetyl-CoA synthetase member 2 (ACSS2) decreases the IL-10 production suggesting that acetate is an essential regulator fueling the energy production necessary to B10 differentiation. In another report, when B cells were pre-activated with CD40, LPS, or CpG, the addition of butyrate, and pentanoate, but not acetate, increased

the percentage of B10 cells (102). They demonstrated that the molecular mechanisms of butyrate-dependent B10 expansion are independent of the mammalian G-protein-coupled receptor pair activity but acted through HDAC inhibitory action *via* a p38 MAPK and PI3K-dependent pathway. However, the precise role of histone acetylation in B10 generation remains to be established. To note, the epigenetic regulation of *I10* expression especially in B cells is still an unresolved field of research.

Overall, these reports about metabolism control of regulator B cells have opened an exciting new area of investigation, recently reviewed by the Mauri's group and ours (103, 104).

C-MAF AS A KEY DRIVER OF THE B-CELL IMMUNOREGULATORY FUNCTION?

The Transcription Factor c-MAF

c-MAF (MAF) is a basic region-leucine zipper (bZIP) TF belonging to the AP-1 superfamily and more specifically to the large MAF family proteins. Large MAF proteins include MafA, MafB, MAF, and Nrl, which possess a transactivation domain and activate transcription by forming a homodimer. MAF contains basic regions allowing the recognition of a palindromic sequence

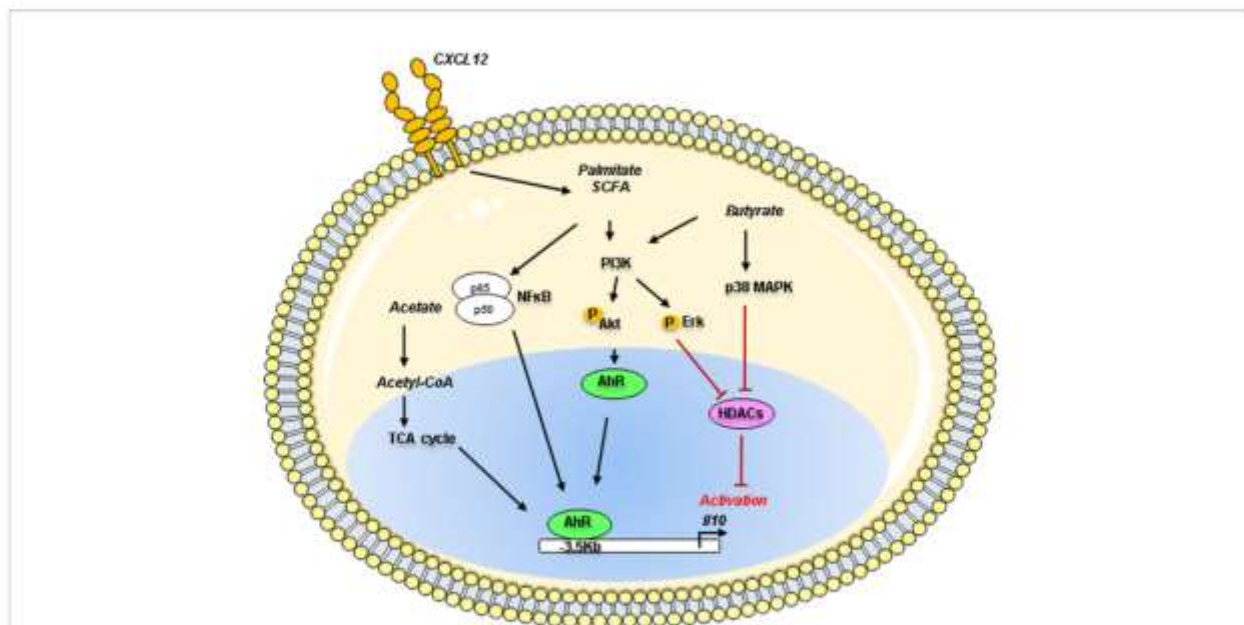


FIGURE 3 | Metabolites action on the IL10 gene regulation in Bregs. Metabolites such as acetate, palmitate and butyrate can control IL-10 production in B cells through the activation of the environmental sensor Aryl-hydrocarbon receptor (AHR) known to bind on a variety of derivative metabolites. Palmitate in synergy with CXCL12 induces IL-10 production through the PI3K and NFκB pathways. Acetate through its conversion into acetyl-coA could act as a regulator of the TCA cycle, fueling the differentiation of murine B1a cells or human CD24^{high} CD27⁺ into IL-10 producing B cells (B10). Butyrate can mediate B10 expansion via the p38 MAPK and PI3K pathways using the histone deacetylases (HDACs). PI3K, Phosphoinositide 3 Kinase; Erk, Extracellular signal-regulated kinase; Akt, Protein kinase B; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; NFκB, Nuclear factor kappa B; AHR, Aryl hydrocarbon receptor; TCA, tricarboxylic acid; Acetyl-CoA, Acetyl-coenzyme A; SCFA, short-chain fatty acid; HDACs, histone deacetylases; p50, p50 protein; p65, p65 protein.

named MAF Recognition Element (MARE) in the promoter region of target genes of which there are two types: a 13-bp T-MARE (TGCTGAG/CTCAGCA) with a TPA-Responsive Element (TRE) and a 14-bp C-MARE (TGCTGAGC/CGTCAGCA) with an AMP-Responsive Element (CRE). The MAF gene is located on chromosome 16q23.2 in humans and on chromosome 8 in mice, on the reverse strand for both (105).

Two forms of MAF mRNA have been described in humans, the variant MAF-201 referred to as the small transcript and the MAF-202 variant referred to as the long transcript. The small transcript MAF-201 (2 646 bases) was made up of the 2 exons of the MAF gene after splicing of the intron (4 231 bases) which was not spliced in the long MAF-202 transcript (Figure 4A). The intron retention in MAF-202 has resulted in the introduction of a premature stop codon in the open reading frame leading to the production of a short protein isoform (c-MAF b), whereas the small transcript MAF-201 encoded a longer protein isoform (c-MAF a). The c-MAF a and c-MAF b proteins from these transcripts comprised 403 and 373 amino acids, respectively. A putative third protein and mRNA (referred to as medium variant MAF-203) have been described in the *Ensembl* database, however, neither the mRNA nor the protein have been reported in experimental data. The c-MAF a protein is only found in humans whereas the c-MAF b is present in both murine and human species. The different constitutive domains of the c-MAF proteins are highly

conserved between the different isoforms (Figure 4B). The basic domain is requisite for DNA binding while the leucine zipper allows dimerization. The EHR domain (extended homology region) is specific for the MAF proteins and is also required for MAF binding to DNA. Finally, the transactivation domain which is rich in acidic residues responsible for protein's transcriptional activator functions is separated from the bZIP domain by a Hinge region (106).

The c-MAF proteins are subject to some post-translational modifications that could modulate their activity (Figure 4C). In T cells, the phosphorylation of c-MAF by the tyrosine-protein kinase Tec or by the CARMA1-dependent activation of the IκB kinase (via IKKβ) was required for c-MAF nuclear translocation and DNA binding (107–109). The serine-threonine protein kinase GSK3β-dependent c-MAF phosphorylation has been described with antagonist outcomes. GSK3β mediated c-MAF-phosphorylation and subsequent degradation through the ubiquitin-proteasome pathway in multiple myeloma. However, in presence of a coactivator complex, the phosphorylation and possibly its mono-ubiquitination may also result in the increase of its transcriptional activity (110, 111). At least nine phosphorylation sites located specifically in the activation domain of c-MAF (Figure 4C) were described, supporting their essential role in c-MAF activity. The SUMOylating, a post-translational modification resulting in the covalent binding of one or more SUMO proteins to a lysine motif was reported on the c-MAF protein at the lysine 33 leading to a

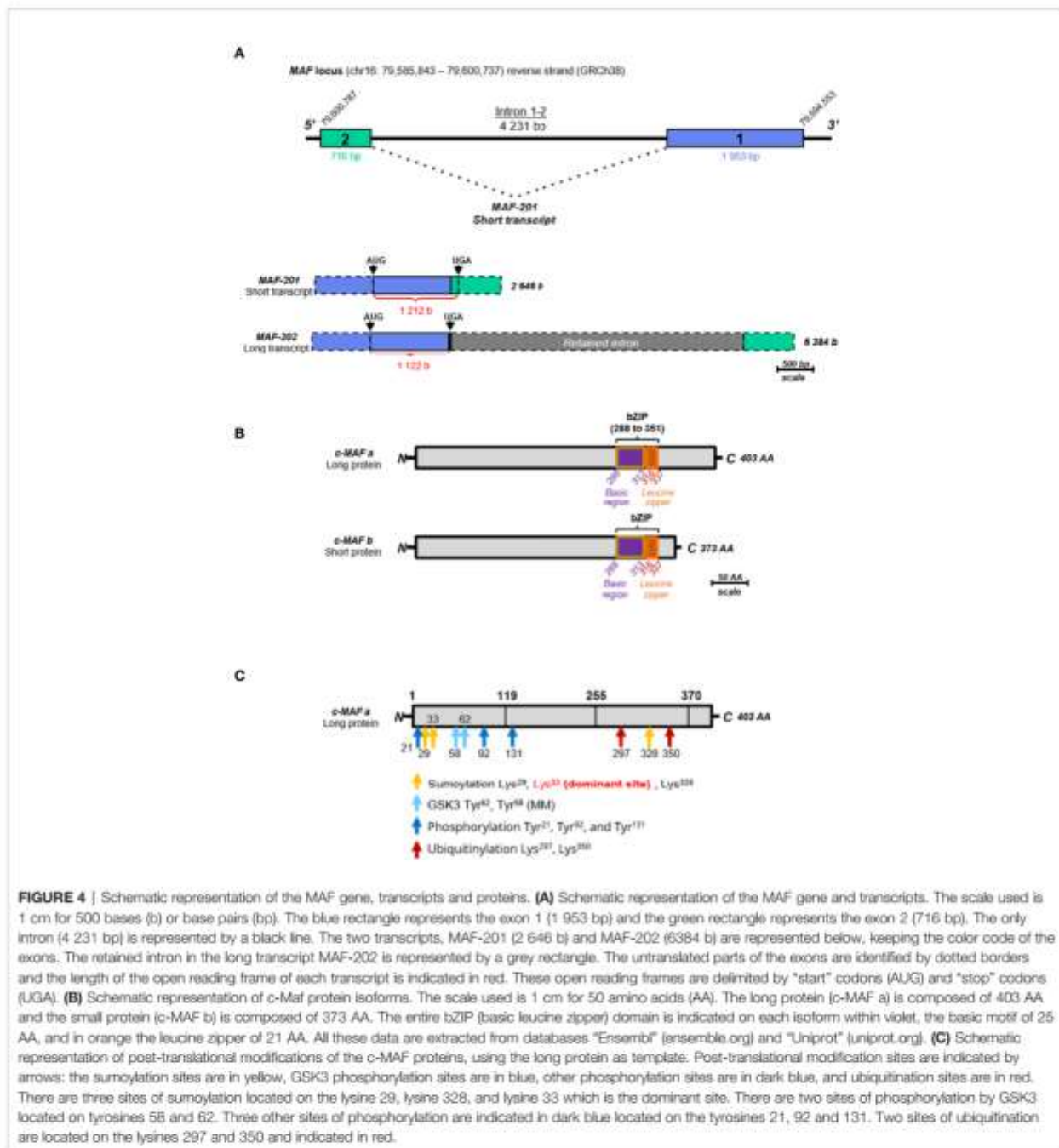


FIGURE 4 | Schematic representation of the MAF gene, transcripts and proteins. **(A)** Schematic representation of the MAF gene and transcripts. The scale used is 1 cm for 500 bases (b) or base pairs (bp). The blue rectangle represents the exon 1 (1 953 bp) and the green rectangle represents the exon 2 (716 bp). The only intron (4 231 bp) is represented by a black line. The two transcripts, MAF-201 (2 646 b) and MAF-202 (6384 b) are represented below, keeping the color code of the exons. The retained intron in the long transcript MAF-202 is represented by a grey rectangle. The untranslated parts of the exons are identified by dotted borders and the length of the open reading frame of each transcript is indicated in red. These open reading frames are delimited by “start” codons (AUG) and “stop” codons (UGA). **(B)** Schematic representation of c-Maf protein isoforms. The scale used is 1 cm for 50 amino acids (AA). The long protein (c-MAF a) is composed of 403 AA and the small protein (c-MAF b) is composed of 373 AA. The entire bZIP (basic leucine zipper) domain is indicated on each isoform within violet, the basic motif of 25 AA, and in orange the leucine zipper of 21 AA. All these data are extracted from databases “Ensembl” (ensembl.org) and “Uniprot” (uniprot.org). **(C)** Schematic representation of post-translational modifications of the c-MAF proteins, using the long protein as template. Post-translational modification sites are indicated by arrows: the sumoylation sites are in yellow, GSK3 phosphorylation sites are in blue, other phosphorylation sites are in dark blue, and ubiquitinylation sites are in red. There are three sites of sumoylation located on the lysine 29, lysine 328, and lysine 33 which is the dominant site. There are two sites of phosphorylation by GSK3 located on tyrosines 58 and 62. Three other sites of phosphorylation are indicated in dark blue located on the tyrosines 21, 92 and 131. Two sites of ubiquitinylation are located on the lysines 297 and 350 and indicated in red.

decrease of the c-MAF transcriptional activity on the *IL-4* and *IL-21* genes (112, 113).

MAF Regulation of the IL-10 Locus

MAF binds directly the MARE sequences of the *Il10* promoter in human macrophages (114), mouse B cells (115), Tr1 cells (96), or Th17 (116). However, several reports suggested that c-MAF could not induce *Il10* or even bound the *Il10* locus in the

absence of other co-regulatory factors like BATF or IRF1 as described in Tr1 cells (117). The protein c-MAF binds the CNS -9 together with BLIMP-1 and STAT4 and induces *Il10* in Th1 cells, but the binding of MAF is independent of BLIMP-1 expression (64). Although *Il10* represents a main target of the MAF gene, this target is far from being the only gene regulated by c-MAF. Indeed, c-MAF regulates a broad range of immune molecules as described for *RoRa*, *Il21*, *Il2*, *Il22* in Th17 (118),

colony-stimulating factor 1 receptor (*Csf-1r*), and metabolic pathways in macrophages (119) or *Tbx21* (encoding the TF Tbet) in group 3 innate lymphoid cells (120) underlined its crucial regulatory role in the immune system (121).

MAF Expression in IL-10 Producing T Cells and Macrophages

In T cells, extensive literature exists on the role of c-MAF and its relationship with IL-10 production [recently reviewed in (122)]. One recent elegant study underlined the context-specificity of the role of MAF in the T-cell response across different diseases model demonstrating that beyond the control of IL-10 expression, MAF acted as a negative regulator of *Il2* (123). One study has examined the role of both isoforms in the modulation of IL-10 production in human stimulated Th17 cells (116). Only the overexpression of c-MAF b (short protein) led to upregulation of IL-10 production suggesting a unique specific function of the different isoforms. Interestingly, extensive ChIP-sequencing studies revealed that c-MAF binding domains are mostly localized outside the promoters and may target enhancer sequences. Furthermore, c-MAF overexpression alone was not sufficient to convert Th17 IL-10⁺ cells into Th17 IL-10⁺ highlighting its primary role as a co-activator or co-repressor factor. The availability or competition of other cooperating factors together with the epigenetic accessibility of regulatory regions seem to be crucial for the c-MAF activity supporting its highly versatile broad range of action in many immune cells.

c-MAF is also essential during innate immunity and was first reported as a key element in macrophage polarization leading to IL-10 production and establishing the immunoregulatory M2 program (124). A recent report demonstrated that c-MAF contributes to the tumor-associated macrophages (TAMs) dampening T-cell effector function during lung cancer (119). Through ChIP-sequencing analysis, c-MAF was shown to directly regulate *Csf-1r* transcription and control important M2 markers as *Il12*, *Il1b*, *Il6*, *Arg1*, *Il10*, *Tgfb*, *Irf4*, and *Ccr2*. This study further demonstrated that c-MAF may act as a metabolic switch in macrophage inhibiting the glycolysis and promoting the TCA cycle and UDP-GlcNAc activity to favor macrophage conversion into immunosuppressive M2 within the tumor suggesting an important role of MAF on cell metabolic activity (119).

MAF in B Cells

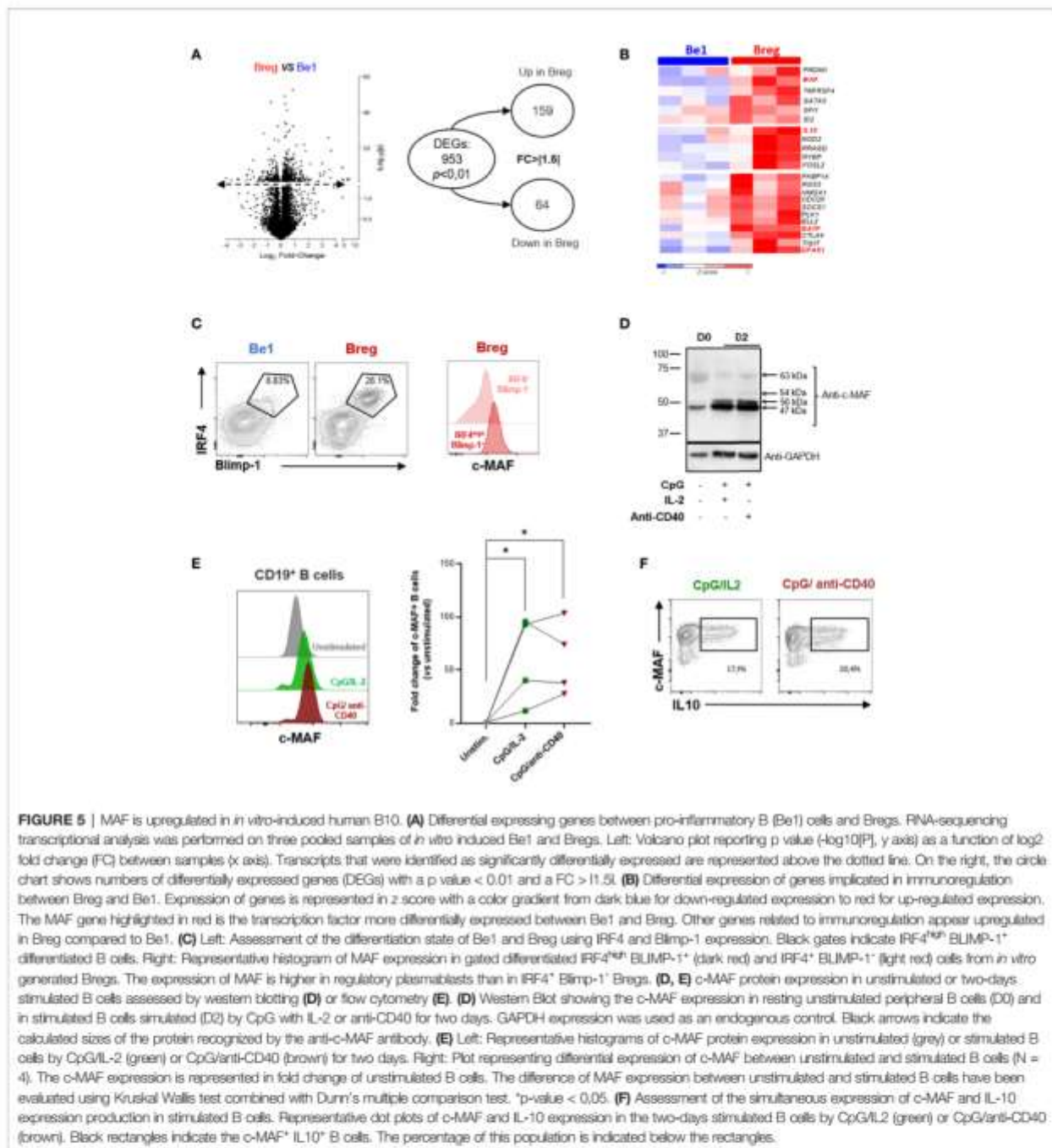
The role of MAF in B cells is very less documented and a large gap in knowledge remains regarding the intrinsic function of c-MAF in B cells. Two recent papers suggested that c-MAF could exert an activity by controlling the IL-10 production in murine and human B cells suggesting an underestimated role in Breg function.

The first study demonstrated that MAF was constitutively expressed in B220⁺ B cells isolated from the spleen and could be upregulated following LPS stimulation together with IL-10 expression (115). ChIP-PCR identified that c-MAF directly bound a MARE sequence located at the CNS-0.5 on the *Il10* gene. The knockdown of MAF using specific shRNA in LPS-

stimulated B cells resulted in the decrease but not a complete abrogation of *Il10* production. A second group has more recently suggested the role of c-MAF in regulating B10 during EAE. The B-cell specific deletion of the signaling lymphocytic activating molecules (SLAM)F5 (CD84) led to an important amelioration of the disease with delayed onset and attenuate clinical score (125). This disease improvement is accompanied by an increase in the different IL-10 producing Breg populations (CD5⁺ CD1d^{high}, T2-MZP, and CD138⁺ PB) in the spinal cord but also the spleen and lymph nodes. Using the Vert-x mice which express a GFP reporter on the *Il10* gene, they analyzed the transcriptome of CD19⁺ GFP⁺ cells in mice treated or not with a SLAMF5 blocking Ab revealing that SLAMF5 downmodulation increased c-MAF and AhR expression. Interestingly, these observations were also confirmed in humans showing that c-MAF is upregulated *in vitro* following SLAMF5 inhibition in total B cells. Although indirect, these results suggest that MAF could exert a key role in regulating Breg populations both in humans and mice. One interesting point is that MAF expression seems not restricted to a specific Breg subset but is broadly associated with *Il10* expression whereas AhR was demonstrated as specific to the T2/MZP subset (97). Interestingly, SLAMF5 (CD84) was also found to be downregulated in the human signature of GZMB⁺ B cells (35), suggesting maybe a broad inhibitory role in multiple Breg populations.

We recently developed an *in vitro* model of B-cell polarization to induce pro-inflammatory B (Be1) cells and Bregs suppressing CD4⁺ T cell proliferation (126). *In vitro*-induced Breg cells included mostly activated B cells (IgM⁺ CD38⁺ CD27⁺) and unswitched PB (CD19⁺ IgM⁺ CD27^{low} CD38⁺ CD20⁺) able to simultaneously produce IL-10 and IgM. To further characterize the co-cultured B-cells, we performed RNA-sequencing (RNA-seq) transcriptional analyses on three pooled samples of B cells sorted from the two different co-culture conditions. We assessed the differential expressing genes (DEGs) between Bregs and Be1 (Figure 5A). We observed 953 DEGs (P-value < 0.01) and 223 genes with a FC > |1.5| (Figure 5A). We underlined a significant up-regulation of genes involved in immune regulation and PB differentiation including *Il-10*, *ELL2*, *Igf*, *PRDM1*, and the transcription factor *MAF* (Figure 5B). We also highlighted several key molecules that could contribute to the immunoregulatory phenotype observed *in vitro* such as BATF, FOSL2, GATA3, CTLA4, TIGIT, or EPAS1 (HIF2- α). Interestingly, FOSL2 (also called Fra-2, an IL-2 regulator), and BATF are AP1 family transcription factors that have already been described as able to interact with MAF proteins (118). We confirmed at the protein level that c-MAF is upregulated together with BLIMP-1 and IRF4 in Bregs induced in our co-culture, suggesting that in these conditions c-MAF is associated with IL-10⁺ regulatory PB (Figure 5C).

To examine the conditions required for c-MAF induction, we stimulated peripheral B cells with CpG and IL-2 and or anti-CD40 Ab for two days, both simulations described as potent IL-10 inducers (127, 128). Whereas c-MAF is low expressed in resting peripheral B cells, c-MAF could be induced following stimulation with an optimal response through the combination



of TLR9 with IL-2 or CD40 signaling (**Figure 5D**). As previously described, the western blotting analysis revealed different sizes of proteins recognized by anti-MAF Ab suggested some post-translational modifications (107, 129). The main form (47 kDa) observed in resting peripheral B cells was preferentially increased after stimulation. Two other c-MAF isoforms of 50 and

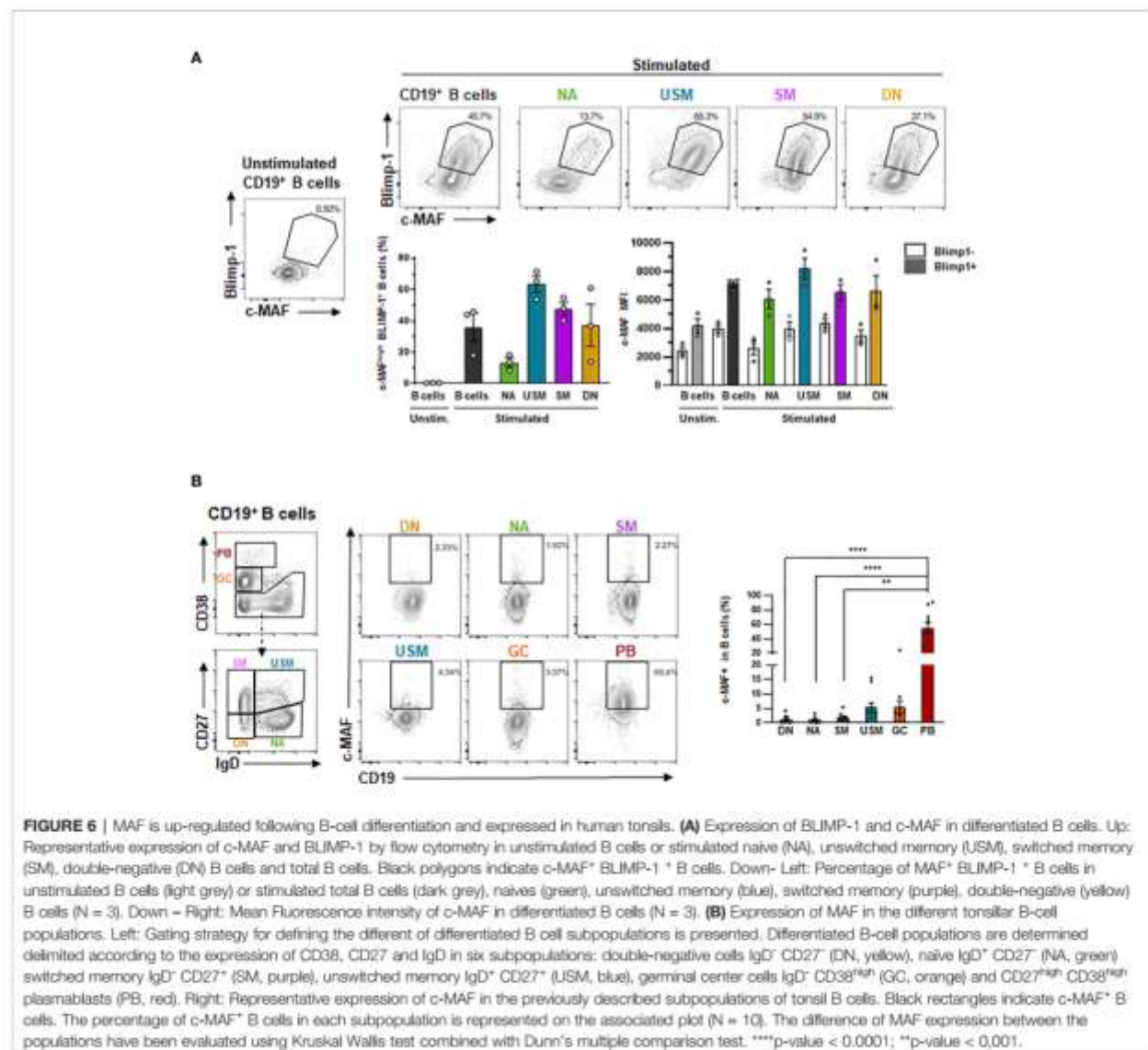
54 kDa were absent in resting B cells but induced following stimulation. The higher form (63 kDa) could correspond to the SUMOylated c-MAF described in mice (**Figure 5D**) (112, 113). Further investigations will be necessary to elucidate the post-translational modifications and the transcripts implicated in different c-MAF proteins. We further confirmed these results

by flow cytometry, with an expression 10 to 100 times higher (p -value < 0,05) compared with resting B cells (Figure 5E). We finally analyzed the production of IL-10 together with the c-MAF expression in stimulated B cells (Figure 5F). IL-10 intracellular detection was shown to be associated only with MAF-expressing B cells but was not observed in MAF negative B cells. However, such observation only suggested a correlative phenomenon and further experiments are mandatory to understand the precise role of MAF on IL-10 production.

We next addressed whether MAF could be preferentially induced from a specific mature B-cell population (Figure 6A) and could be associated with B-cell differentiation. We thus sorted four B-cell populations according to IgD and CD27 expression and stimulated them for three days following BCR, TLR9, and IL-2 stimulation. We observed that c-MAF was

upregulated in all mature B-cell subsets, however, we showed that the co-expression of c-MAF and BLIMP-1 expression is mainly observed in CD27⁺ mature differentiated B cells. Finally, as c-MAF was weakly expressed in circulating resting B-cells but could be induced following activation, we hypothesized that c-MAF could be expressed in the secondary lymphoid tissues as described in mice. We then examined MAF expression in human tonsils, showing that MAF was barely detectable in naive B cells but was found significantly increased in IgD⁺ CD27⁺ unswitched memory, GC cells, and PB (Figure 6B).

Although preliminary and mostly correlative, our analyses emphasized that the TF MAF is expressed in human mature B cells and could be observed in IL-10⁺ producing B cells as well as in BLIMP-1⁺ PB. We also showed that c-MAF could be physiologically observed in secondary lymphoid organs open



new directions about its putative role in human B-cell homeostasis. However, further experiments are needed to fully understand its role in these different B-cell subsets. Furthermore, as described in T cells, we anticipated that MAF function will may be highly dependent on its different interacting molecular partners.

DISCUSSION: MAF ASSOCIATION WITH OTHER REGULATORS

A study providing a highly comprehensive view of the TF network regulating Th17 has underlined the key role of MAF in adaptive immunity (118). In Th17, c-MAF was shown as a negative regulator attenuating expression of several pro-inflammatory genes such as *Rora*, *Runx1*, *Iir1*, *Ccr6*, or *Tnf* while upregulating immunoregulatory other ones such as *Il10* or *Ctla4* suggesting that its role is not restricted to cytokine regulation. As a bZIP TF, c-MAF could virtually interact with all AP1 protein members. We reported as follows the MAF relationships that may be relevant in B cells (Figure 7).

STAT3

STAT3 represents a key element in the transcriptional regulation of MAF expression in all helper T cells, but the mechanism remains unclear. MAF and SOX5 were demonstrated to be regulated by IL-6-mediated STAT3 activation driving Th17 expansion (130). Moreover, STAT3 binding on class II IL-6 responsive elements was observed on the MAF promoter in Th2 cells after TCR and IL-6 activation (131). This observation was also reproduced in CD69⁺ FOXP3⁺ Tregs where the treatment of cells with STAT3 and STAT5 siRNA reduced MAF expression (132). The TGFβ seems to synergically act with IL-6 to induce MAF expression by sustaining the STAT3 expression (133). IL-21 and IL-6 are upstream inducers of STAT3 activation and highly involved in plasma cell differentiation suggesting that they could also act in inducing MAF in B cells (134). Moreover, dysregulated STAT3 signaling has been reported in B cells in autoimmune diseases associated with abnormal GC reaction or plasma cell expansion (135). Does STAT3 influence B10 generation by regulating MAF expression? It is an ongoing question and several reports have already suggested that STAT3 deficient signaling contributes to impair IL-10 production in SLE B cells (48, 53).

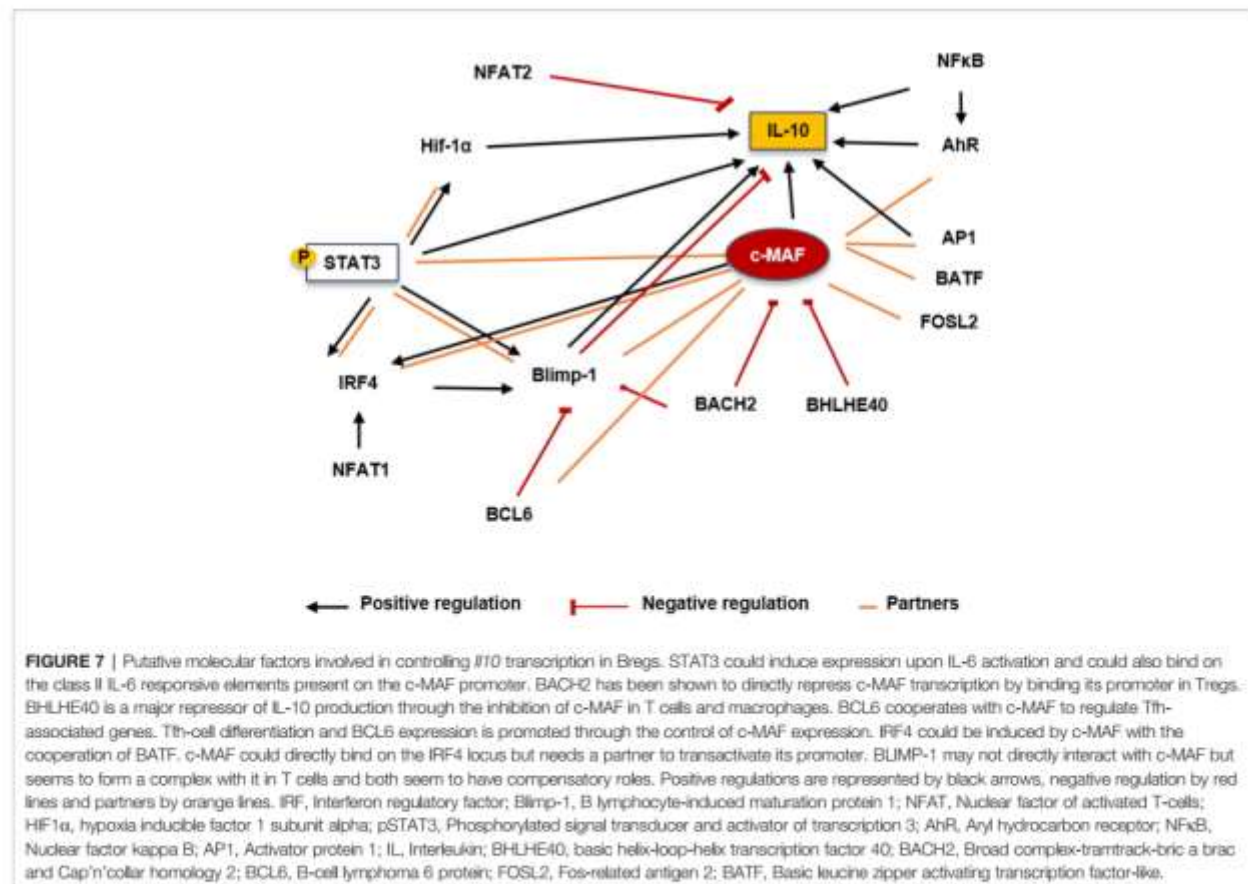


FIGURE 7 | Putative molecular factors involved in controlling *Il10* transcription in Bregs. STAT3 could induce expression upon IL-6 activation and could also bind on the class II IL-6 responsive elements present on the c-MAF promoter. BACH2 has been shown to directly repress c-MAF transcription by binding its promoter in Tregs. BHLHE40 is a major repressor of IL-10 production through the inhibition of c-MAF in T cells and macrophages. BCL6 cooperates with c-MAF to regulate Th-associated genes. Th-cell differentiation and BCL6 expression is promoted through the control of c-MAF expression. IRF4 could be induced by c-MAF with the cooperation of BATF. c-MAF could directly bind on the IRF4 locus but needs a partner to transactivate its promoter. BLIMP-1 may not directly interact with c-MAF but seems to form a complex with it in T cells and both seem to have compensatory roles. Positive regulations are represented by black arrows, negative regulation by red lines and partners by orange lines. IRF, Interferon regulatory factor; Blimp-1, B lymphocyte-induced maturation protein 1; NFAT, Nuclear factor of activated T-cells; HIF1α, hypoxia inducible factor 1 subunit alpha; pSTAT3, Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; AhR, Aryl hydrocarbon receptor; NFκB, Nuclear factor kappa B; AP1, Activator protein 1; IL, Interleukin; BHLHE40, basic helix-loop-helix transcription factor 40; BACH2, Broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2; BCL6, B-cell lymphoma 6 protein; FOSL2, Fos-related antigen 2; BATF, Basic leucine zipper activating transcription factor-like.

BACH2

BACH2 is a TF involved in B cell differentiation and is controlled in human B cells by the IL-2 signaling (136, 137). BACH2 was mostly described as able to form heterodimers with small c-MAF proteins (136) binding to MARE domains. BACH2 interacts with MAFK to negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer and the PRDM1 gene (138) controlling B cell differentiation and isotype switching. The BACH2 and the large MAF proteins interaction was not reported in B cells but BACH2 deletion in T cells led to an increase of the generation of Tfh-producing IL-4 and subsequent generated humoral autoimmunity (139). In this study, BACH2 was shown to directly repress *MAF* transcription by binding its promoter. BACH2 inhibits the differentiation of mature Tregs by competition with IRF4-recruiting AP-1 complexes for MARE genomic binding sites resulting in the decrease of Treg-associated genes such as *Il10*, *Tigit*, and *Maf*. Interestingly, our previous data have shown that B-cell differentiation is associated with an upregulation of a similar pattern of genes suggesting that BACH2 could also repress *MAF* and *IRF4* expression in B cells.

BHLHE40

The basic helix-loop-helix transcription factor 40 (Bhlhe40) is a member of the basic helix-loop-helix transcription factor family. BHLHE40 is a central mediator of both inflammation and pathogen control in T cells and macrophages (review in (140)). BHLHE40 was found as a major repressor of *Il10* in IL-27 driven Tr1 or Th1 cells through the inhibition of MAF (63, 141). During *Mycobacterium tuberculosis* infection, BHLHE40 was shown to bind directly to the +6kb (CNS3) enhancer of the *Il10* locus in T cells and myeloid cells (142). BHLHE40 also named DEC1, STRA13, or Clast5, was first described as a negative regulator of B-cell activation and is downregulated following LPS or BCR stimulation (143). BHLHE40 overexpression led to cell cycle arrest in WEHI231 B lymphoma cells. By studying *Bhlhe41*^{-/-} mice, and DKO *Bhlhe41*^{-/-} *Bhlhe40*^{-/-}, it was demonstrated that compared to BHLHE41, BHLHE40 contributes slightly to B1 development and it is still not clear whether BHLHE40 possesses intrinsic action on murine B-cell development (144). However, it was shown that BHLHE40 was induced in human B cells following BCR or TLR9 stimulation restraining proliferating capacities (145). Moreover, BHLHE40 is overexpressed in anergic CD21^{low} B cells of patients with hepatitis C virus, a subset recently underlined as pathogenic in autoimmune diseases. The role of BHLHE40 in controlling Breg expansion has to be determined and interestingly, we recently underlined that BHLHE40 is a common factor downregulated during the PB differentiation (67).

BCL6

The BCL6 protein was first described as a master regulator of B cells during the GC reaction (146, 147). There exists a reciprocal regulatory loop between Blimp-1 and BCL6 during the B-cell differentiation, whereby both TF antagonize the expression of each other (148, 149). This antagonism between BCL6 and BLIMP-1 was also described as a critical mechanism regulating

the development of Tfh (150). BCL6 and c-MAF cooperate to regulate the expression of Tfh-associated genes like *PD1* or *CXCR5* (151). Furthermore, T cells lacking MAF expression failed to develop into Tfh after immunization (152). More recently the regulatory circuit between c-MAF, BLIMP-1, and BCL6 during the Tfh differentiation was examined in *Thpok* (encoded by the *Zbtb7b* gene) deficient mice (153). *Thpok* promoted Tfh cell differentiation and *Bcl6* expression through controlling *MAF* expression but independently of the repression of BLIMP-1.

IRF4

IRF4 is a key factor in the induction of regulatory plasma cells. Through a multi-layer -omics approach, c-MAF was suggested to interact with IRF4 in normal and myeloma plasma cells although no experimental data supported this idea (154). In T cells BATF and c-MAF cooperated to induce IRF4, to promote IL-4 production, and it was observed that c-MAF could bind to the IRF4 locus although it could not transactivate the promoter alone (155). To note, the action of c-MAF and IRF4 was also described in the M12 B cell lymphoma line acting in synergy with NFAT1 to enhance the IL-4 transcriptional activity (156)

BLIMP-1

The relationship between *MAF* and *PRDM1* has been studied with attention in Th1 and Th17. Although both factors seem to be required for *Il10* expression in both subsets, there are contradictory reports about their putative interaction as previously discussed (64). Whereas some reports suggested no physical interaction between both TFs, another study using co-immunoprecipitation assay suggested that MAF, Blimp-1, and ROR γ t form a complex in IL-27 stimulated T cells (157)

Moreover, a study that recently examined the regulatory network involved in the control of T-cell exhaustion in tumors underlined that although *MAF* and *PRDM1* are together involved in controlling several co-inhibitory receptors expression in T cells, both factors do not interact together and that *PRDM1* function in tumor-infiltrating T cells is independent of MAF suggesting that both TFs may have a compensatory role (116) Indeed, regression of tumor was observed more significantly in *MAF*, *PRDM1* double KO mice than in mice with a single gene deletion. Our data reported an association of *MAF* and *PRDM1* during the B cell differentiation, thus a role of MAF in the B-cell central regulatory network involving *BACH2*, *BCL6*, *IRF4*, and *PRDM1* is likely to also operate in the B cell differentiation and need to be further examined.

Role of the MicroRNAs miR155 and miR 21

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that control gene expression by binding messenger RNA (mRNA). Whereas most of the studies demonstrated that the binding of miRNAs to 5' UTR and coding regions have silencing effects, some others have also suggested that miRNA interaction with promoter region could have a positive effect and induce transcription (158). Of particular interest in B-cell physiology are the miR-155 and the miR-21.

First observations in *mir155*-deficient mice suggested that miR-155 control the GC formation, as well as, the extrafollicular response (159). It was further demonstrated that one main target of the miR155 was a member of the Ets domain-transcription factor family the TF PU.1 (160). Interestingly, the deletion of miR155 led to the overexpression of PU.1 resulting in the impairment of class switch recombination and plasma cell formation mostly by controlling the TF Pax5 (161).

The failure to downregulate Pax5 in PU.1-overexpressing cells prevented them from upregulating Blimp1 and thus initiating the plasma cell differentiation program. However, no direct role of miR155 on Blimp1 has been established so far.

The role of miRNA on IL-10 production is not clear. A recent report suggested that miR155 increased the expression of IL-10 by both upregulating the STAT3 phosphorylation and repressing the epigenetic regulator *Jarid2* leading to the decrease in histone H3 lysine 27 trimethylation of the IL-10 promoter (162). On the other hand, the IL-10 production following LPS stimulation could inhibit miR155 in B cells in a STAT3-dependent manner (163). These complex interactions between IL-10, miR155, and STAT3 at the crossroad between B-cell differentiation and B-cell regulatory function need to be further elucidated but underlined their close relationship.

In one seminal paper, MAF has been described as an important target of miR-155 in T cells, and the increase of the Th2 profile observed in the miR-155 KO mice (*bic^{mi1/m1}* and *bic^{mi2/m2}*) was partially attributed to the upregulation of the MAF protein in absence of its antagonist (164). The miR-155 suppressed MAF expression in microglia leading to the decrease of IL-10 thus promoting neuroinflammation (165). In Group 2 innate lymphoid cells (ILC2), miR-155 targets the 3'-UTR of the *Maf* mRNA and increased the production of IL-5, IL-9, and IL-13 Th2 cytokines in culture. Moreover, the treatment of mice with induced-allergic rhinitis with miR-155 antagonist significantly increased the expression of c-Maf and reduced allergic symptoms (166). Furthermore, another report described that c-MAF binding to the *Il10* promoter is restricted by *jarid2* in miR-155-deficient Th17 cells, emphasizing the importance of this network in regulating IL-10 expression.

Considering the key role of miR-155 in controlling the GC reaction, PB differentiation, IL-10 production, and MAF expression, we could anticipate that its expression may highly vary throughout the B-cell maturation. An in-depth investigation of these interactions could decipher important regulator mechanisms of the B-cell effector function.

The miR-21 was also described as a critical regulator of the B-cell differentiation and IL-10 production. Analysis of miR-21 levels in B cells revealed higher expression in activated B cells, especially in GC and memory B cells, and decreased expression in plasma cell differentiation (167). BLIMP-1 binds to the promoter of the pre-miR-21 to repress its expression upregulating miR-21 target genes, *BTG2*, *PDCD4*, and *RHOB*.

The miR-21 downregulated IL-10 expression in LPS-stimulated B cells *in vitro* and its expression is reduced in *CD1d^{hi}CD5⁺* and *Tim-1⁺* regulatory B cells. Furthermore, the administration of miR-21 antagonist *in vivo* decreased neuroinflammation and ameliorated

the clinical symptoms of the EAE mostly through the increase of IL-10 producing B cells (168). However, the fine-tune mechanisms of miR-21 regulating IL-10 expression appear more elaborate, as one of its main targets the *PDCD4* protein was also described as a potent IL-10 inhibitor (169). Interestingly, *PDCD4* controls MAF expression by sequestering the Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors *Twist2* from the MAF promoter (170).

The list of miRNAs that could potentially control IL-10 producing B cells described here is far from being exhaustive, and it is not clear how the interplay between these different actors could influence the B-cell function. However, this entire field remains an exciting area of investigation still uncovered.

CONCLUDING REMARKS

The idea of a unique TF regulating all Breg populations seems unlikely, the diversity of precursors and mechanisms of action of Bregs are more compatible with microenvironmental plasticity and multiple molecular mechanisms. However, the extreme flexibility of the c-MAFs proteins to directly or indirectly cooperate with diverse partners modulating cell specification makes it a promising candidate in regulating B-cell effector functions such as Ab production or immune regulation.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Samples

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by ethical committees. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

RNA Sequencing Sample Preparation

The *in-vitro*-induced Be1 and Be2/Breg were obtained in coculture with naive and memory T cells, respectively, as previously described (126). After coculture, B cells were sorted with the "FACS MoFlo XDP cell sorter" (Beckman Coulter) with a purity greater than 98%.

RNA-Sequencing

RNA-seq (50 bp paired-end) was performed on a Nextseq500 instrument (Illumina). The library preparation was done using the Illumina TruSeq® Stranded mRNA Sample preparation kit. The starting material (1 µg) of total RNA was mRNA enriched using the oligodT bead system. The isolated mRNA was subsequently digested using enzymatic fragmentation. Then, the first strand and second strand synthesis were performed and purified (AMPure XP, Beckman Coulter). Next, the double-stranded cDNA was end repaired, 3' adenylated, and Illumina sequencing adaptors were ligated onto the fragment ends. Finally, purified mRNA-stranded libraries were pre-amplified by PCR and the library size distributions were validated and quality inspected on a Bioanalyzer (high sensitivity DNA chip). High quality libraries were quantified using qPCR, the

concentration was normalized, and the 12 samples from six independent experiments were randomly pooled in six final libraries, three for the Be1 conditions and three for the B reg conditions. The library pools were re-quantified with qPCR and the optimal concentration of the library pools was used to generate the clusters on the surface of a flow cell before sequencing on a Nextseq500 instrument using a High Output sequencing kit (2 x 50 cycles) according to the manufacturer's instructions (Illumina). The quality of the Raw.fastq files was analyzed using the bcl2fastq software (Illumina), with a Q-score greater than 30. Reads mapping to the reference genome (GRCh37/hg19) were performed on quality-checked reads using STAR 2.4.1c. The reference annotation used was Ensembl_75. The overlap of reads with annotation features found in the reference *gtf* file was calculated using featureCount. The output computed for each sample (raw read counts) was then used as the input for Edge R analysis. Genes that had an expression level of under 10 counts per million (cpm) were excluded from the analysis. The quantile-adjusted conditional maximum likelihood (qCML) method was used to determine differentially expressed genes (DEGs) with p-value filters <0,01 and |fold-change (FC)|≥1,5.

Peripheral Blood B-Cell Isolation, Sorting, and Culture

The leukoreduction system chambers (LRSC) of Peripheral blood from healthy donors were obtained during routine plateletpheresis at the "Etablissement français du sang". The peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated using density gradient centrifugation on lymphocyte separation medium, Pancoll human (PAN Biotech). CD19⁺ B cells were purified from human PBMCs using the REAlease[®] CD19 Microbead Kit (Miltenyi Biotec) with a purity greater than 98%, according to the manufacturer's instructions.

Isolated B cells were cultured in 96-well plates (BD Falcon) at 2×10^5 cells per 200 μ L/wells in complete medium (RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich)) supplemented with 10% of heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS) (BD Biosciences), 2 mM Glutamax (Gibco) and penicillin (200 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). B cells were stimulated for 48 h (2 days) in the presence of CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (1 μ M; *In vivo*Gen), recombinant human Interleukin-2 (rh IL-2) (20 ng/mL, ImmunoTools) or anti-CD40 (1 mg/mL) (MAB-59; Beckman Coulter).

For the sorting of B cell subsets, isolated B cells were stained for 30 min at 4°C into the dark with IgD (IA6-2, Biolegend), CD10 (ALB1, Beckman coulter), CD27 (1A4CD27, Beckman coulter), CD19 (J3-119, Beckman coulter) Abs. CD10⁺-positive B cells, which correspond to the transitional subset, were excluded from the cell sorting. Naive (NA, IgD⁺ CD27⁻ CD10⁻), unswitched memory (USM, IgD⁺ CD27⁺ CD10⁻), switched memory (SM, IgD⁺ CD27⁺ CD10⁺) and double negative B cells (DN, IgD⁻ CD27⁻ CD10⁻) were sorted. Sorted cells were cultured in 96-well plates (Falcon) at 2×10^5 cells per 200 μ L/well in complete medium (RPMI 1640 medium supplemented with 10% of heat-inactivated FCS, 4 mM L-Glutamine (Gibco) and penicillin and streptomycin. B cell subsets were stimulated for 84 h (3,5 days), in the presence of the AffiniPure

Goat anti-Human IgG+IgM (H+L) (2 μ g/mL), the AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α Chain Specific (2 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch Laboratories), CpG oligodeoxynucleotide (ODN-2006) (0,25 μ M), recombinant human Interleukin-2 (rh IL-2) (20 ng/mL), as previously described (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.31.437810v1>).

Isolation of Tonsil B Cells

Tonsils were collected during tonsillectomy. The Tonsillar Mononuclear Cells (TMCs) were isolated by mechanical disruption of tonsil tissue followed by Pancoll gradient centrifugation. Isolated TMCs were diluted in FCS up to a concentration of $10 \cdot 10^6$ TMCs/mL. Sheep red blood cells (Boehringer Ingelheim Therapeutics) were pre-incubated with Alserver solution (114 mM of dextrose, 27 mM of sodium citrate, 71 mM of sodium chloride, 1 M of citric acid diluted in distilled water) for 5 minutes and washed before an incubation at 37°C with 1 U/mL of neuraminidase (Sigma-aldrich) for 1 h. Neuraminidase-treated sheep red blood cells were washed and then incubated with the diluted TMCs during 10 minutes at 37°C. B cells from TMCs were then isolated following Pancoll gradient centrifugation, with a purity greater than 96%.

Flow Cytometry

All staining was performed using the Navios II flow cytometer (Beckman Coulter). The Abs with the following specificities were used: CD19 (J3-119), CD38 (LS198-4-3), CD27 (1A4CD27), IgD (IA6-2) c-MAF (T54-853, BD Biosciences), BLIMP-1 (646702, R&D systems) and IRF4 (REA201, Miltenyi Biotec), IL-10 (JES3-9D7, Biolegend). Intranuclear staining of IRF4, BLIMP-1 and c-MAF (T54-853, BD Biosciences) were performed using the Transcription Factor Buffer Set according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). For the detection of IL10 and c-MAF together, we used the CytoFast Perm Fix Set (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. The c-MAF expression was analyzed using an unconjugated rabbit anti-MAF (BLR045F, Bethyl laboratories) revealed by a Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Flow cytometry data were analyzed using Kaluza Analysis (v2.1) and FlowJo (v10.7.2) softwares.

Western Blot

Total proteins were extracted with RIPA Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1% of protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich). Samples treated with reducing Laemmli buffer (1.8% β -mercaptoethanol; Sigma Aldrich) were separated on SDS-PAGE with 10% acrylamide/bis (37,5:1) solution (Biorad) with the Mini-PROTEAN[®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Biorad) at 120 volts for 20 minutes and then at 160 volts for 45 minutes. Separated proteins were then transferred to a 0,2 μ m PVDF membrane (Biorad) using the Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) at 20 volts during 90 min. After washing in Tris Buffered Saline 0,1% Tween (TBST), the membrane was blocked for 1 hour in TBST containing 5% of fat dry milk (for c-MAF) or 5% of BSA (for GAPDH) at room temperature. The polyclonal rabbit c-MAF Ab

(ProteinTech) at 0,7 µg/mL in TBST containing 1% of fat dry milk and the membrane was incubated in this solution for 2 hours at room temperature. The secondary antibody used was a peroxidase conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L) Ab (GE Healthcare) at 0,2 µg/mL in 1% of fat dry milk TBST during one hour at room temperature. The HRP-Rabbit polyclonal to GAPDH (Abcam) in TBST containing 1% of BSA and the membrane was incubated overnight. The PVDF membranes were revealed by chemiluminescence (Immobilon Fort Western HRP substrate, Merck Millipore) by using the ChemiDoc™ XRS system (Biorad, Quantity One® Software).

Statistics

All statistics and graph representation were performed with GraphPad Prism (v.8.8.2). The Kruskal Wallis test combined with Dunn's multiple comparison test was used.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE112448.

ETHICS STATEMENT

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Brest Hospital ethical

committee. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LLP and SH designed the study. MB, MM-C, and LLP wrote the first draft of the manuscript and figures. AG, MB, MM-C, and QS performed and analyzed the experiments. SH wrote the final version of the manuscript. DC, J-OP, and OM participated in the text edition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the Cytometry Core Facility Hyperion (Brest, France) for their technical assistance in cell sorting.

REFERENCES

- Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA Jr. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell-Deficient Mice. *J Exp Med* (1996) 184(6):2271–8. doi: 10.1084/jem.184.6.2271
- Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-Antigen Presentation by CD1d(+) B Cells Is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. *Immunity* (2012) 36(3):477–90. doi: 10.1016/j.immuni.2012.02.008
- Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* (2014) 41(6):1040–51. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.016
- Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-Producing B Cells are Critical Regulators of Immunity During Autoimmune and Infectious Diseases. *Nature* (2014) 507(7492):366–70. doi: 10.1038/nature12979
- Simon Q, Pers JO, Cornec D, Le Pottier L, Mageed RA, Hillion S. In-Depth Characterization of CD24(high)CD38(high) Transitional Human B Cells Reveals Different Regulatory Profiles. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137(5):1577–84.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.014
- Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19(+) CD25(high) B Regulatory Cells Suppress Proliferation of CD4(+) T Cells and Enhance Foxp3 and CTLA-4 Expression in T-Regulatory Cells. *Autoimmun Rev* (2012) 11(9):670–7. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.018
- Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-Induced Granzyme B-Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Res* (2013) 73(8):2468–79. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3450
- Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguilón JC, et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol* (2021) 12:611795. doi: 10.3389/fimmu.2021.611795
- Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejszka K, et al. Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4+ T Cells to T-Regulatory Cells. *Cancer Res* (2011) 71(10):3505–15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4316
- Lee-Chang C, Bodogai M, Martin-Montalvo A, Wejszka K, Sanghvi M, Moaddel R, et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Resveratrol-Mediated Inactivation of Tumor-Evoked Regulatory B Cells. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2013) 191(8):4141–51. doi: 10.4049/jimmunol.1300606
- Bernier M, Paul RK, Martin-Montalvo A, Scheibye-Knudsen M, Song S, He HJ, et al. Negative Regulation of STAT3 Protein-Mediated Cellular Respiration by SIRT1 Protein. *J Biol Chem* (2011) 286(22):19270–9. doi: 10.1074/jbc.M110.200311
- Li Y, Zhu W, Li J, Liu M, Wei M. Resveratrol Suppresses the STAT3 Signaling Pathway and Inhibits Proliferation of High Glucose-Exposed HepG2 Cells Partly Through SIRT1. *Oncol Rep* (2013) 30(6):2820–8. doi: 10.3892/or.2013.2748
- Han Y, Kang Y, Yu J, Yu SL, Park HW, Shin J, et al. Increase of Hspa1a and Hspa1b Genes in the Resting B Cells of Sirt1 Knockout Mice. *Mol Biol Rep* (2019) 46(4):4225–34. doi: 10.1007/s11033-019-04876-7
- Gan H, Shen T, Chupp DP, Taylor JR, Sanchez HN, Li X, et al. B Cell Sirt1 Deacetylates Histone and non-Histone Proteins for Epigenetic Modulation of AID Expression and the Antibody Response. *Sci Adv* (2020) 6(14):eay2793. doi: 10.1126/sciadv.aay2793
- Shah S, Qiao L. Resting B Cells Expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg Population via TGF-Beta3. *Eur J Immunol* (2008) 38(9):2488–98. doi: 10.1002/eji.200838201

16. Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Merkler D, Weber MS, Payne NL, Bernard CCA, et al. B Cell-Derived Transforming Growth Factor- β Expression Limits the Induction Phase of Autoimmune Neuroinflammation. *Sci Rep* (2016) 6:34594. doi: 10.1038/srep34594
17. Molnarfi N, Bjarnadóttir K, Benkhoucha M, Juillard C, Lalive PH. Activation of Human B Cells Negatively Regulates TGF- β Production. *J Neuroinflamm* (2017) 14(1):13. doi: 10.1186/s12974-017-0798-5
18. Zhang Y, Morgan R, Chen C, Cai Y, Clark E, Khan WN, et al. Mammary-Tumor-Educated B Cells Acquire LAP/TGF- β and PD-L1 Expression and Suppress Anti-Tumor Immune Responses. *Int Immunol* (2016) 28(9):423–33. doi: 10.1093/intimm/dxw007
19. Joly MS, Martin RP, Mitra-Kaulshik S, Phillips L, D'Angona A, Richards SM, et al. Transient Low-Dose Methotrexate Generates B Regulatory Cells That Mediate Antigen-Specific Tolerance to Alglucosidase Alfa. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2014) 193(8):3947–58. doi: 10.4049/jimmunol.1303326
20. Nouël A, Pochard P, Simon Q, Ségalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells Induce Regulatory T Cells Through TGF- β /IDO Production in a CTLA-4 Dependent Manner. *J Autoimmun* (2015) 59:53–60. doi: 10.1016/j.jaut.2015.02.004
21. Kehr JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming Growth Factor Beta is an Important Immunomodulatory Protein for Human B Lymphocytes. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (1986) 137(12):3855–60.
22. Komai T, Inoue M, Okamura T, Morita K, Iwasaki Y, Sumitomo S, et al. Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. *Front Immunol* (2018) 9:1364. doi: 10.3389/fimmu.2018.01364
23. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A Quarter Century of Granzymes. *Cell Death Differ* (2012) 19(1):28–35. doi: 10.1038/cdd.2011.153
24. Jahrsdörfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, Huang J, Andreski MW, Jacobus LS, et al. B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and Other B Cells can Produce Granzyme B and Gain Cytotoxic Potential After Interleukin-21-Based Activation. *Blood* (2006) 108(8):2712–9. doi: 10.1182/blood-2006-03-014001
25. Hagn M, Ebel V, Sontheimer K, Schwesinger E, Lunov O, Beyer T, et al. CD5+ B Cells From Individuals With Systemic Lupus Erythematosus Express Granzyme B. *Eur J Immunol* (2010) 40(7):2060–9. doi: 10.1002/eji.200940113
26. Kaltenmeier C, Gawwabacht A, Beyer T, Lindner S, Trzaska T, van der Merwe JA, et al. CD4+ T Cell-Derived IL-21 and Deprivation of CD40 Signaling Favor the *In Vivo* Development of Granzyme B-Expressing Regulatory B Cells in HIV Patients. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2015) 194(8):3768–77. doi: 10.4049/jimmunol.1402568
27. Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, et al. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells With Regulatory Properties. *J Am Soc Nephrol* (2015) 26(10):2588–98. doi: 10.1681/ASN.2014040404
28. Chesneau M, Mai HL, Danger R, Le Bot S, Nguyen TV, Bernard J, et al. Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B Cells With Potent Regulatory Properties. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2020) 205(9):2391–401. doi: 10.4049/jimmunol.2000335
29. Hagn M, Schwesinger E, Ebel V, Sontheimer K, Maier J, Beyer T, et al. Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2009) 183(3):1838–45. doi: 10.4049/jimmunol.0901066
30. Papp G, Gyimesi E, Szabó K, Zöld É, Zeher M. Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5(+) B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjögren's Syndrome. *Mediators Inflamm* (2016) 2016:4328372. doi: 10.1155/2016/4328372
31. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its Receptor are Involved in NK Cell Expansion and Regulation of Lymphocyte Function. *Nature* (2000) 408(6808):57–63. doi: 10.1038/35040504
32. Xu W, Narayanan P, Kang N, Clayton S, Ohne Y, Shi P, et al. Human Plasma Cells Express Granzyme B. *Eur J Immunol* (2014) 44(1):275–84. doi: 10.1002/eji.201343711
33. Hagn M, Belz GT, Kallies A, Sutton VR, Thia KY, Tarlinton DM, et al. Activated Mouse B Cells Lack Expression of Granzyme B. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2012) 188(8):3886–92. doi: 10.4049/jimmunol.1103285
34. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: A Modulator of Lymphoid Proliferation, Apoptosis and Differentiation. *Nat Rev Immunol* (2005) 5(9):688–98. doi: 10.1038/nri1688
35. Dubois F, Limou S, Chesneau M, Degauque N, Brouard S, Danger R. Transcriptional Meta-Analysis of Regulatory B Cells. *Eur J Immunol* (2020) 50(11):1757–69. doi: 10.1002/eji.201948489
36. Rakhmanov M, Sic H, Kienzler AK, Fischer B, Rizzi M, Seidl M, et al. High Levels of SOX5 Decrease Proliferative Capacity of Human B Cells, But Permit Plasmablast Differentiation. *PLoS One* (2014) 9(6):e100328. doi: 10.1371/journal.pone.0100328
37. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 Prevents Spontaneous Death of Germinal Center B Cells by Induction of the Bcl-2 Protein. *J Clin Invest* (1994) 93(1):424–8. doi: 10.1172/JCI116977
38. Banchereau J, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, Garrone P, Hermann P, et al. Role of Cytokines in Human B Lymphocyte Growth and Differentiation. *Nouv Rev Fr Hematol* (1993) 35(1):61–6.
39. Banchereau J, Brière F, Liu YJ, Rousset F. Molecular Control of B Lymphocyte Growth and Differentiation. *Stem Cells* (1994) 12(3):278–88. doi: 10.1002/stem.5530120304
40. Saeland S, Duvert V, Moreau I, Banchereau J. Human B Cell Precursors Proliferate and Express CD23 After CD40 Ligation. *J Exp Med* (1993) 178(1):113–20. doi: 10.1084/jem.178.1.113
41. Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells *In Vitro*. *Sci (New York NY)* (1995) 268(5211):720–2. doi: 10.1126/science.7537388
42. Agematsu K, Nagumo H, Oguchi Y, Nakazawa T, Fukushima K, Yasui K, et al. Generation of Plasma Cells From Peripheral Blood Memory B Cells: Synergistic Effect of Interleukin-10 and CD27/CD70 Interaction. *Blood* (1998) 91(1):173–80. doi: 10.1182/blood.V91.1.173.173_180
43. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsuhashita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2009) 182(12):7459–72. doi: 10.4049/jimmunol.0900270
44. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, et al. Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity During Salmonella Typhimurium Infection. *Immunity* (2010) 33(5):777–90. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.016
45. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol* (2012) 30:221–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934
46. Saraiva M, O'Garra A. The Regulation of IL-10 Production by Immune Cells. *Nat Rev Immunol* (2010) 10(3):170–81. doi: 10.1038/nri2711
47. Jin G, Hamaguchi Y, Matsuhashita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, et al. B-Cell Linker Protein Expression Contributes to Controlling Allergic and Autoimmune Diseases by Mediating IL-10 Production in Regulatory B Cells. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 131(6):1674–82. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.044
48. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* (2010) 32(1):129–40. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009
49. Mion F, Tonon S, Toffoletto B, Cesselli D, Pucillo CE, Vitale G. IL-10 Production by B Cells is Differentially Regulated by Immune-Mediated and Infectious Stimuli and Requires P38 Activation. *Mol Immunol* (2014) 62(2):266–76. doi: 10.1016/j.molimm.2014.05.018
50. Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, et al. Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* (2016) 68(2):494–504. doi: 10.1002/art.39437
51. Hua C, Audo R, Yeremenko N, Baeten D, Hahne M, Combe B, et al. A Proliferation Inducing Ligand (APRIL) Promotes IL-10 Production and Regulatory Functions of Human B Cells. *J Autoimmun* (2016) 73:64–72. doi: 10.1016/j.jaut.2016.06.002
52. Liu BS, Cao Y, Huizinga TW, Hafler DA, Toes RE. TLR-Mediated STAT3 and ERK Activation Controls IL-10 Secretion by Human B Cells. *Eur J Immunol* (2014) 44(7):2121–9. doi: 10.1002/eji.201344341
53. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback Between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic

- Lupus Erythematosus. *Immunity* (2016) 44(3):683–97. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.012
54. Zhu Z, Zhang Y, Ye J, Wang X, Fu X, Yin Y, et al. IL-35 Promoted STAT3 Phosphorylation and IL-10 Production in B Cells, But Its Production was Reduced in Patients With Coronary Artery Diseases. *Hum Immunol* (2018) 79(12):869–75. doi: 10.1016/j.humimm.2018.10.009
55. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, et al. IL-21 Signaling via STAT3 Primes Human Naive B Cells to Respond to IL-2 to Enhance Their Differentiation Into Plasmablasts. *Blood* (2013) 122(24):3940–50. doi: 10.1182/blood-2013-06-506865
56. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B Cells are Induced by Gut Microbiota-Driven Interleukin-1 β and Interleukin-6 Production. *Nat Med* (2014) 20(11):1334–9. doi: 10.1038/nm.3680
57. Oladipupo FO, Yu CR, Olumuyide E, Jittaysothorn Y, Choi JK, Egwuagu CE. STAT3 Deficiency in B Cells Exacerbates Uveitis by Promoting Expansion of Pathogenic Lymphocytes and Suppressing Regulatory B Cells (Bregs) and Tregs. *Sci Rep* (2020) 10(1):16188. doi: 10.1038/s41598-020-73093-1
58. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Gene Expression. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2000) 165(3):1612–7. doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1612
59. Im SH, Hueber A, Monticelli S, Kang KH, Rao A. Chromatin-Level Regulation of the IL10 Gene in T Cells. *J Biol Chem* (2004) 279(45):46818–25. doi: 10.1074/jbc.M401722200
60. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. *Immunity* (2009) 31(2):209–19. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.012
61. Wang ZY, Sato H, Kusam S, Sehra S, Toney LM, Dent AL. Regulation of IL-10 Gene Expression in Th2 Cells by Jun Proteins. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2005) 174(4):2098–105. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.2098
62. Lee CG, Kang KH, So JS, Kwon HK, Son JS, Song MK, et al. A Distal Cis-Regulatory Element, CNS-9, Controls NFAT1 and IRF4-Mediated IL-10 Gene Activation in T Helper Cells. *Mol Immunol* (2009) 46(4):613–21. doi: 10.1016/j.molimm.2008.07.037
63. Zhang H, Madi A, Yosef N, Chihara N, Awasthi A, Pot C, et al. An IL-27-Driven Transcriptional Network Identifies Regulators of IL-10 Expression Across T Helper Cell Subsets. *Cell Rep* (2020) 33(8):108433. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108433
64. Neumann C, Heinrich F, Neumann K, Junghans V, Mashreghi MF, Ahlers J, et al. Role of Blimp-1 in Programming Th Effector Cells Into IL-10 Producers. *J Exp Med* (2014) 211(9):1807–19. doi: 10.1084/jem.20131548
65. Wang YH, Tsai DY, Ko YA, Yang TT, Lin IY, Hung KH, et al. Blimp-1 Contributes to the Development and Function of Regulatory B Cells. *Front Immunol* (2019) 10:1909. doi: 10.3389/fimmu.2019.01909
66. Minnich M, Tagob H, Bönelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, et al. Multifunctional Role of the Transcription Factor Blimp-1 in Coordinating Plasma Cell Differentiation. *Nat Immunol* (2016) 17(3):331–43. doi: 10.1038/ni.3349
67. Grasseau A, Boudigou M, Michée-Cospolito M, Delalay C, Mignen O, Jamin C, et al. The Diversity of the Plasmablast Signature Across Species and Experimental Conditions: A Meta-Analysis. *Immunology* (2021) 164(1):120–34. doi: 10.1111/imm.13344
68. Lee CG, Hwang W, Maeng KE, Kwon HK, So JS, Sahoo A, et al. IRF4 Regulates IL-10 Gene Expression in CD4(+) T Cells Through Differential Nuclear Translocation. *Cell Immunol* (2011) 268(2):97–104. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.02.008
69. Jones EA, Flavell RA. Distal Enhancer Elements Transcribe Intergenic RNA in the IL-10 Family Gene Cluster. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2005) 175(11):7437–46. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7437
70. Glasmacher E, Agrawal S, Chang AB, Murphy TL, Zeng W, Vander Lugt B, et al. A Genomic Regulatory Element That Directs Assembly and Function of Immune-Specific AP-1-IRF Complexes. *Sci (New York NY)* (2012) 338(6109):975–80. doi: 10.1126/science.1228309
71. Li P, Spolski R, Liao W, Wang L, Murphy TL, Murphy KM, et al. BATF-JUN Is Critical for IRF4-Mediated Transcription in T Cells. *Nature* (2012) 490(7421):543–6. doi: 10.1038/nature11530
72. Yu CR, Choi JK, Uche AN, Egwuagu CE. Production of IL-35 by Bregs Is Mediated Through Binding of BATF-IRF-4-IRF-8 Complex to Ii12a and Ebi3 Promoter Elements. *J Leukocyte Biol* (2018) 104(6):1147–57. doi: 10.1002/JLB.3A0218-071RRR
73. Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, et al. The Transcription Factors Blimp-1 and IRF4 Jointly Control the Differentiation and Function of Effector Regulatory T Cells. *Nat Immunol* (2011) 12(4):304–11. doi: 10.1038/ni.2006
74. Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, et al. Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. *Immunity* (2009) 31(6):941–52. doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.008
75. Xu H, Chaudhri VK, Wu Z, Bilouris K, Dienger-Stambaugh K, Rochman Y, et al. Regulation of Bifurcating B Cell Trajectories by Mutual Antagonism Between Transcription Factors IRF4 and IRF8. *Nat Immunol* (2015) 16(12):1274–81. doi: 10.1038/ni.3287
76. Du Z, Chen A, Huang L, Dai X, Chen Q, Yang D, et al. STAT3 Couples With 14-3-3 ζ to Regulate BCR Signaling, B-Cell Differentiation, and IgE Production. *J Allergy Clin Immunol* (2021) 147(5):1907–23.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2020.09.033
77. Avalle L, Camporeale A, Morciano G, Caroccia N, Ghetti E, Orecchia V, et al. STAT3 Localizes to the ER, Acting as a Gatekeeper for ER-Mitochondrion Ca(2+) Fluxes and Apoptotic Responses. *Cell Death Differ* (2019) 26(5):932–42. doi: 10.1038/s41418-018-0171-y
78. Zhang Z, Zhou L, Yang X, Wang Y, Zhang P, Hou L, et al. Notch-RBPJ-Independent Marginal Zone B Cell Development in IgH Transgenic Mice With VH Derived From a Natural Polyreactive Antibody. *PLoS One* (2012) 7(6):e38894. doi: 10.1371/journal.pone.0038894
79. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B Cell Regulatory Function Through Interleukin-10 Production. *Immunity* (2011) 34(5):703–14. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.016
80. Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Thuy Pham DA, Chen W, Vaeth M, et al. NFATc1 Affects Mouse Splenic B Cell Function by Controlling the Calcineurin-NFAT Signaling Network. *J Exp Med* (2011) 208(4):823–39. doi: 10.1084/jem.20100945
81. Alrefai H, Muhammad K, Rudolf R, Pham DA, Klein-Hessling S, Patra AK, et al. NFATc1 Supports Imiquimod-Induced Skin Inflammation by Suppressing IL-10 Synthesis in B Cells. *Nat Commun* (2016) 7:11724. doi: 10.1038/ncomms11724
82. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, et al. CD5 Promotes IL-10 Production in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Through STAT3 and NFAT2 Activation. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2011) 186(8):4835–44. doi: 10.4049/jimmunol.1003050
83. Mohr A, Cumin M, Bagacean C, Pochard P, Le Dantec C, Hillion S, et al. The Regulatory Capacity of B Cells Directs the Aggressiveness of CLL. *Oncotarget* (2019) 8(3):1554968. doi: 10.1080/2162402X.2018.1554968
84. Märklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmüller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a Critical Regulator of the Anergic Phenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Nat Commun* (2017) 8(1):755. doi: 10.1038/s41467-017-00830-y
85. Shaim H, Estrov Z, Harris D, Hernandez Sanabria M, Liu Z, Ruvolo P, et al. The CXCR4-STAT3-IL-10 Pathway Controls the Immunoregulatory Function of Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Modulated by Lenalidomide. *Front Immunol* (2017) 8:1773. doi: 10.3389/fimmu.2017.01773
86. Li L, Zhang J, Chen J, Xu-Monette ZY, Miao Y, Xiao M, et al. B-Cell Receptor-Mediated NFATc1 Activation Induces IL-10/STAT3/PD-L1 Signaling in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* (2018) 132(17):1805–17. doi: 10.1182/blood-2018-03-841015
87. Darnell JE Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Sci (New York NY)* (1994) 264(5164):1415–21. doi: 10.1126/science.8197455
88. Meng X, Grötsch B, Luo Y, Knaup KX, Wiesener MS, Chen XX, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α is a Critical Transcription Factor for IL-10-Producing B Cells in Autoimmune Disease. *Nat Commun* (2018) 9(1):251. doi: 10.1038/s41467-017-02683-x
89. Qian T, Hong J, Wang L, Wang Z, Lu Z, Li Y, et al. Regulation of CD11b by HIF-1 α and the STAT3 Signaling Pathway Contributes to the

- Immunosuppressive Function of B Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Mol Immunol* (2019) 111:162–71. doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.005
90. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol Cell* (2010) 40(2):294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022
91. Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, et al. Gsk3 is a Metabolic Checkpoint Regulator in B Cells. *Nat Immunol* (2017) 18(3):303–12. doi: 10.1038/ni.3664
92. Bibby JA, Purvis HA, Hayday T, Chandra A, Okkenhaug K, Rosenzweig S, et al. Cholesterol Metabolism Drives Regulatory B Cell IL-10 Through Provision of Geranylgeranyl Pyrophosphate. *Nat Commun* (2020) 11(1):3412. doi: 10.1038/s41467-020-17179-4
93. Hu X, Paik PK, Chen J, Yarinina A, Kocikeriz L, Lu TT, et al. IFN-Gamma Suppresses IL-10 Production and Synergizes With TLR2 by Regulating GSK3 and CREB/AP-1 Proteins. *Immunity* (2006) 24(5):563–74. doi: 10.1016/j.immuni.2006.02.014
94. Hill EV, Ng TH, Burton BR, Oakley CM, Malik K, Wraith DC. Glycogen Synthase Kinase-3 Controls IL-10 Expression in CD4(+) Effector T-Cell Subsets Through Epigenetic Modification of the IL-10 Promoter. *Eur J Immunol* (2015) 45(4):1103–15. doi: 10.1002/eji.201444661
95. Wang H, Brown J, Garcia CA, Tang Y, Benakanakere MR, Greenway T, et al. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 in Regulating IFN- β -Mediated IL-10 Production. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2011) 186(2):675–84. doi: 10.4049/jimmunol.1001473
96. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Interacts With C-Maf to Promote the Differentiation of Type 1 Regulatory T Cells Induced by IL-27. *Nat Immunol* (2010) 11(9):854–61. doi: 10.1038/ni.1912
97. Piper CJM, Rosser EC, Oleinika K, Nistala K, Krausgruber T, Rendeiro AF, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep* (2019) 29(7):1878–92.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.018
98. Rosser EC, Piper CJM, Matei DE, Blair PA, Rendeiro AF, Orford M, et al. Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. *Cell Metab* (2020) 31(4):837–51.e10. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.003
99. Xiao S, Bod L, Pochet N, Kota SB, Hu D, Madi A, et al. Checkpoint Receptor TIGIT Expressed on Tim-1(+) B Cells Regulates Tissue Inflammation. *Cell Rep* (2020) 32(2):107892. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107892
100. Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, et al. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab* (2013) 18(5):759–66. doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.017
101. Daien CI, Tan J, Audo R, Mielle J, Quek LE, Krycer JR, et al. Gut-Derived Acetate Promotes B10 Cells With Antiinflammatory Effects. *JCI Insight* (2021) 6(7):e144156. doi: 10.1172/jci.insight.144156
102. Zou F, Qiu Y, Huang Y, Zou H, Cheng X, Niu Q, et al. Effects of Short-Chain Fatty Acids in Inhibiting HDAC and Activating P38 MAPK are Critical for Promoting B10 Cell Generation and Function. *Cell Death Dis* (2021) 12(6):582. doi: 10.1038/s41419-021-03880-9
103. Iperi C, Bordron A, Duceyemes M, Pera JO, Jamin C. Metabolic Program of Regulatory B Lymphocytes and Influence in the Control of Malignant and Autoimmune Situations. *Front Immunol* (2021) 12:735463. doi: 10.3389/fimmu.2021.735463
104. Rosser EC, Mauri C. The Emerging Field of Regulatory B Cell Immunometabolism. *Cell Metab* (2021) 33(6):1088–97. doi: 10.1016/j.cmet.2021.05.008
105. Jamieson RV, Perveen R, Kerr B, Carette M, Yardley J, Heon E, et al. Domain Disruption and Mutation of the bZIP Transcription Factor, MAF, Associated With Cataract, Ocular Anterior Segment Dysgenesis and Coloboma. *Hum Mol Genet* (2002) 11(1):33–42. doi: 10.1093/hmg/11.1.33
106. Reza HM, Yasuda K. Roles of Maf Family Proteins in Lens Development. *Dev Dyn* (2004) 229(3):440–8. doi: 10.1002/dvdy.10467
107. Lai CY, Lin SY, Wu CK, Yeh LT, Sytwu HK, Miaw SC. Tyrosine Phosphorylation of C-Maf Enhances the Expression of IL-4 Gene. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2012) 189(4):1545–50. doi: 10.4049/jimmunol.1200405
108. Blonska M, Joo D, Nurieva RI, Zhao X, Chiao P, Sun SC, et al. Activation of the Transcription Factor C-Maf in T Cells is Dependent on the CARMA1-Ikk β Signaling Cascade. *Sci Signal* (2013) 6(306):ra110. doi: 10.1126/scisignal.2004273
109. Liu CC, Lai CY, Yen WF, Lin YH, Chang HH, Tai TS, et al. Reciprocal Regulation of C-Maf Tyrosine Phosphorylation by Tec and Ptpn22. *PLoS One* (2015) 10(5):e0127617. doi: 10.1371/journal.pone.0127617
110. Herath NI, Rocques N, Garancher A, Eychène A, Pouponnot C. GSK3-Mediated MAF Phosphorylation in Multiple Myeloma as a Potential Therapeutic Target. *Blood Cancer J* (2014) 4(1):e175. doi: 10.1038/bcj.2013.67
111. Qiang YW, Ye S, Chen Y, Buros AF, Edmonson B, van Rhee F, et al. MAF Protein Mediates Innate Resistance to Proteasome Inhibition Therapy in Multiple Myeloma. *Blood* (2016) 128(25):2919–30. doi: 10.1182/blood-2016-03-706077
112. Leavenworth JW, Ma X, Mo YY, Pauza ME. SUMO Conjugation Contributes to Immune Deviation in Nonobese Diabetic Mice by Suppressing C-Maf Transactivation of IL-4. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2009) 183(2):1110–9. doi: 10.4049/jimmunol.0803671
113. Hsu CY, Yeh LT, Fu SH, Chien MW, Liu YW, Miaw SC, et al. SUMO-Defective C-Maf Preferentially Transactivates IL21 to Exacerbate Autoimmune Diabetes. *J Clin Invest* (2018) 128(9):3779–93. doi: 10.1172/JCI98786
114. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The Protooncogene C-Maf Is an Essential Transcription Factor for IL-10 Gene Expression in Macrophages. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2005) 174(6):3484–92. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3484
115. Liu M, Zhao X, Ma Y, Zhou Y, Deng M, Ma Y. Transcription Factor C-Maf is Essential for IL-10 Gene Expression in B Cells. *Scand J Immunol* (2018) 88(3):e12701. doi: 10.1111/sji.12701
116. Aschenbrenner D, Foglierini M, Jarrossay D, Hu D, Weiner HL, Kuchroo VK, et al. An Immunoregulatory and Tissue-Residency Program Modulated by C-MAF in Human T(H)17 Cells. *Nat Immunol* (2018) 19(10):1126–36. doi: 10.1038/s41590-018-0200-5
117. Karwacz K, Miraldi ER, Pokrovskii M, Madi A, Yosef N, Wortman I, et al. Critical Role of IRF1 and BATF in Forming Chromatin Landscape During Type 1 Regulatory Cell Differentiation. *Nat Immunol* (2017) 18(4):412–21. doi: 10.1038/ni.3683
118. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* (2012) 151(2):289–303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016
119. Liu M, Tong Z, Ding C, Luo F, Wu S, Wu C, et al. Transcription Factor C-Maf is a Checkpoint That Programs Macrophages in Lung Cancer. *J Clin Invest* (2020) 130(4):2081–96. doi: 10.1172/JCI131335
120. Parker ME, Barrera A, Wheaton JD, Zuberbuehler MK, Allan DSJ, Carlyle JR, et al. C-Maf Regulates the Plasticity of Group 3 Innate Lymphoid Cells by Restraining the Type 1 Program. *J Exp Med* (2020) 217(1):e20191030. doi: 10.1084/jem.20191030
121. Song JF, Liu T, Shen X, Wu GD, Xia QC. Application of Free-Flow Electrophoresis to the Purification of Trichosanthin From a Crude Product of Acetone Fractional Precipitation. *Electrophoresis* (1998) 19(7):1097–103. doi: 10.1002/elps.1150190708
122. Imbratta C, Hussein H, Andris F, Verdel G. C-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol* (2020) 11:206. doi: 10.3389/fimmu.2020.00206
123. Gabryšová L, Alvarez-Martinez M, Luisier R, Cox LS, Sodenkamp J, Hosking C, et al. C-Maf Controls Immune Responses by Regulating Disease-Specific Gene Networks and Repressing IL-2 in CD4(+) T Cells. *Nat Immunol* (2018) 19(5):497–507. doi: 10.1038/s41590-018-0083-5
124. Kang K, Park SH, Chen J, Qiao Y, Giannopoulos E, Berg K, et al. Interferon- γ Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF. *Immunity* (2017) 47(2):235–50.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.017
125. Radomir L, Kramer MP, Perpinial M, Schottlender N, Rabani S, David K, et al. The Survival and Function of IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Negatively Controlled by SLAMF5. *Nat Commun* (2021) 12(1):1893. doi: 10.1038/s41467-021-22230-z

126. Simon Q, Grasseau A, Boudigou M, Le Pottier L, Bettachioli E, Cornec D, et al. A Cytokine Network Profile Delineates a Common Th1/Be1 Pro-Inflammatory Group of Patients in Four Systemic Autoimmune Diseases. *Arthritis Rheumatol* (2021) 73(8):1550–61. doi: 10.1002/art.41697
127. Tedder TF. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2015) 194(4):1395–401. doi: 10.4049/jimmunol.1401329
128. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dillillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a Rare IL-10-Competent B-Cell Subset in Humans That Parallels Mouse Regulatory B10 Cells. *Blood* (2011) 117(2):530–41. doi: 10.1182/blood-2010-07-294249
129. Lin BS, Tsai PY, Hsieh WY, Tsao HW, Liu MW, Grenningloh B, et al. SUMOylation Attenuates C-Maf-Dependent IL-4 Expression. *Eur J Immunol* (2010) 40(4):1174–84. doi: 10.1002/eji.200939788
130. Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, et al. Sox5 and C-Maf Cooperatively Induce Th17 Cell Differentiation via Ror γ Induction as Downstream Targets of Stat3. *J Exp Med* (2014) 211(9):1857–74. doi: 10.1084/jem.20130791
131. Yang Y, Ochando J, Yopp A, Bromberg JS, Ding Y. IL-6 Plays a Unique Role in Initiating C-Maf Expression During Early Stage of CD4 T Cell Activation. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2005) 174(5):2720–9. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2720
132. Yu L, Yang F, Zhang F, Guo D, Li L, Wang X, et al. CD69 Enhances Immunosuppressive Function of Regulatory T-Cells and Attenuates Colitis by Prompting IL-10 Production. *Cell Death Dis* (2018) 9(9):905. doi: 10.1038/s41419-018-0927-9
133. Xu J, Yang Y, Qiu G, Lal G, Wu Z, Levy DE, et al. C-Maf Regulates IL-10 Expression During Th17 Polarization. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2009) 182(10):6226–36. doi: 10.4049/jimmunol.0900123
134. Smith JC, Stephens DP, Winchester PK, Williamson JW. Facial Cooling-Induced Bradycardia: Attenuating Effect of Central Command at Exercise Onset. *Med Sci Sports Exerc* (1997) 29(3):320–5. doi: 10.1097/00005768-199703000-00006
135. Ding C, Chen X, Dascani P, Hu X, Bolli R, Zhang HG, et al. STAT3 Signaling in B Cells Is Critical for Germinal Center Maintenance and Contributes to the Pathogenesis of Murine Models of Lupus. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2016) 196(11):4477–86. doi: 10.4049/jimmunol.1502043
136. Igarashi K, Ochiai K, Itoh-Nakadai A, Muto A. Orchestration of Plasma Cell Differentiation by Bach2 and Its Gene Regulatory Network. *Immunol Rev* (2014) 261(1):116–25. doi: 10.1111/imr.12201
137. Hipp N, Symington H, Pastoret C, Caron G, Monvoisin C, Tarte K, et al. IL-2 Imprints Human Naïve B Cell Fate Towards Plasma Cell Through ERK/ELK1-Mediated BACH2 Repression. *Nat Commun* (2017) 8(1):1443. doi: 10.1038/s41467-017-01475-7
138. 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* (2008) 20(3):453–60. doi: 10.1093/intimm/dxn005
139. Zhang H, Hu Q, Zhang M, Yang F, Peng C, Zhang Z, et al. Bach2 Deficiency Leads to Spontaneous Expansion of IL-4-Producing T Follicular Helper Cells and Autoimmunity. *Front Immunol* (2019) 10:2050. doi: 10.3389/fimmu.2019.02050
140. Cook ME, Jarjour NN, Lin CC, Edelson BT. Transcription Factor Bhlhe40 in Immunity and Autoimmunity. *Trends Immunol* (2020) 41(11):1023–36. doi: 10.1016/j.it.2020.09.002
141. Yu F, Sharma S, Jankovic D, Gurram RK, Su P, Hu G, et al. The Transcription Factor Bhlhe40 is a Switch of Inflammatory Versus Antiinflammatory Th1 Cell Fate Determination. *J Exp Med* (2018) 215(7):1813–21. doi: 10.1084/jem.20170155
142. Huynh JP, Lin CC, Kimmey JM, Jarjour NN, Schwarzkopf EA, Bradstreet TR, et al. Bhlhe40 is an Essential Repressor of IL-10 During Mycobacterium Tuberculosis Infection. *J Exp Med* (2018) 215(7):1823–38. doi: 10.1084/jem.20171704
143. Seimiya M, Bahar R, Wang Y, Kawamura K, Tada Y, Okada S, et al. Clast5/Stral3 is a Negative Regulator of B Lymphocyte Activation. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 292(1):121–7. doi: 10.1006/bbrc.2002.6605
144. Kreslavsky T, Vilagos B, Tagoh H, Poliakova DK, Schwickert TA, Wöhner M, et al. Essential Role for the Transcription Factor Bhlhe41 in Regulating the Development, Self-Renewal and BCR Repertoire of B-1a Cells. *Nat Immunol* (2017) 18(4):442–55. doi: 10.1038/ni.3694
145. Cansponeschi A, Todi L, Cristofolletti C, Lazzeri C, Carbonari M, Mitrevski M, et al. DEC1/STRA13 is a Key Negative Regulator of Activation-Induced Proliferation of Human B Cells Highly Expressed in Anergic Cells. *Immunol Lett* (2018) 198:7–11. doi: 10.1016/j.imlet.2018.03.014
146. Fukuda T, Yoshida T, Okada S, Hatano M, Miki T, Ishibashi K, et al. Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *J Exp Med* (1997) 186(3):439–48. doi: 10.1084/jem.186.3.439
147. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 Proto-Oncogene Suppresses P53 Expression in Germinal-Centre B Cells. *Nature* (2004) 432(7017):635–9. doi: 10.1038/nature03147
148. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity* (2002) 17(1):51–62. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00335-7
149. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* (2009) 31(3):457–68. doi: 10.1016/j.immuni.2009.07.002
150. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Sci (New York NY)* (2009) 325(5943):1006–10. doi: 10.1126/science.1175870
151. Kroenke MA, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, Haddad EK, et al. Bcl6 and Maf Cooperate to Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2012) 188(8):3734–44. doi: 10.4049/jimmunol.1103246
152. Andris F, Denanglaire S, Anclaux M, Hercor M, Hussein H, Leo O. The Transcription Factor C-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells. *Front Immunol* (2017) 8:480. doi: 10.3389/fimmu.2017.00480
153. Vacchio MS, Ciucci T, Gao Y, Watanabe M, Balmacedo-Crisis M, McGinty MT, et al. A Thpok-Directed Transcriptional Circuitry Promotes Bcl6 and Maf Expression to Orchestrate T Follicular Helper Differentiation. *Immunity* (2019) 51(3):465–78.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.023
154. Katsarou A, Trasanikis N, Alvarez-Benayas J, Papaleonidopoulou F, Keren K, Kostopoulos IV, et al. Oncogenic MAF in Co-Operation With IRF4 Confers Extensive Chromatin Re-Arrangement in Plasma Cells and Generates 'Neo-Enhancers' That Regulate Genes Critical for Myeloma Biology. *Blood* (2019) 134(Supplement_1):3783. doi: 10.1182/blood-2019-122371
155. Sahoo A, Alekseev A, Tanaka K, Obertas L, Lerman B, Haymaker C, et al. Batf is Important for IL-4 Expression in T Follicular Helper Cells. *Nat Commun* (2015) 6:7997. doi: 10.1038/ncomms8997
156. Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts With NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *J Exp Med* (2002) 195(8):1003–12. doi: 10.1084/jem.20011128
157. Chang KK, Liu LB, Jin LP, Zhang B, Mei J, Li H, et al. IL-27 Triggers IL-10 Production in Th17 Cells via a C-Maf/Ror γ /Blimp-1 Signal to Promote the Progression of Endometriosis. *Cell Death Dis* (2017) 8(3):e2666. doi: 10.1038/cddi.2017.95
158. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLoS One* (2013) 8(11):e79467. doi: 10.1371/journal.pone.0079467
159. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the Germinal Center Response by microRNA-155. *Sci (New York NY)* (2007) 316(5824):604–8. doi: 10.1126/science.1141229
160. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 Regulates the Generation of Immunoglobulin Class-Switched Plasma Cells. *Immunity* (2007) 27(6):847–59. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.009
161. Lu D, Nakagawa R, Lazzaro S, Staudacher P, Abreu-Goodger C, Henley T, et al. The miR-155-PU.1 Axis Acts on Pax5 to Enable Efficient Terminal B Cell Differentiation. *J Exp Med* (2014) 211(11):2183–98. doi: 10.1084/jem.20140338
162. Zheng Y, Ge W, Ma Y, Xie G, Wang W, Han L, et al. miR-155 Regulates IL-10-Producing CD24(hi)CD27(+) B Cells and Impairs Their Function in

- Patients With Crohn's Disease. *Front Immunol* (2017) 8:914. doi: 10.3389/fimmu.2017.00914
163. Fairfax KA, Gantier MP, Mackay F, Williams BR, McCoy CE. IL-10 Regulates Alca Expression Through miR-155. *J Leukocyte Biol* (2015) 97(1):71–8. doi: 10.1189/jlb.2A0314-178R
164. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of Bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Sci (New York NY)* (2007) 316(5824):608–11. doi: 10.1126/science.1139253
165. Su W, Hopkins S, Nesser NK, Sopher B, Silvestroni A, Ammanuel S, et al. The P53 Transcription Factor Modulates Microglia Behavior Through microRNA-Dependent Regulation of C-Maf. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2014) 192(1):358–66. doi: 10.4049/jimmunol.1301397
166. Zhu Y, Liu Y, Zhu X, Wang Z, Wang M. Upregulation of miR-155 Regulates Group 2 Innate Lymphoid Cells by Targeting C-Maf in Allergic Rhinitis. *Eur J Pharmacol* (2020) 887:173564. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173564
167. Barnes NA, Stephenson S, Cocco M, Toozie RM, Doody GM. BLIMP-1 and STAT3 Counterregulate microRNA-21 During Plasma Cell Differentiation. *J Immunol (Baltimore Md: 1950)* (2012) 189(1):253–60. doi: 10.4049/jimmunol.1101563
168. Wang H, Xu W, Shao Q, Ding Q. miR-21 Silencing Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Promoting the Differentiation of IL-10-Producing B Cells. *Oncotarget* (2017) 8(55):94069–79. doi: 10.18632/oncotarget.21578
169. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative Regulation of TLR4 via Targeting of the Proinflammatory Tumor Suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* (2010) 11(2):141–7. doi: 10.1038/ni.1828
170. van den Bosch MWM, Palsson-McDermott E, Johnson DS, O'Neill LAJ. LPS Induces the Degradation of Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) to Release Twist2, Activating C-Maf Transcription to Promote Interleukin-10 Production. *J Biol Chem* (2014) 289(33):22980–90. doi: 10.1074/jbc.M114.573089

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

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Michée-Cospolite, Boudigou, Grasseau, Simon, Mignen, Pers, Cornec, Le Pottier and Hillion. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANNEXE 4 : MISE EN EVIDENCE DES SITE PREDICTIFS DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE MAF

Tableau A1 – Sites prédictifs de phosphorylation de MAF avec identification des kinases impliquées

<i>Position</i>	Kinase prédite	Score de confiance
S 3	Cdc2	0,527
S 8	Cdc2	0,535
S 10	Cdc2	0,547
T 14	PKC	0,575
S 15	Cdk5	0,554
	GSK3	0,519
	p38 MAPK	0,509
S 44	PKA	0,509
	DNAPK	0,584
	ATM	0,545
S 54	PKC	0,635
	Cdc2	0,528
	PKA	0,550
S 57	PKC	0,693
	Cdc2	0,528
T 58	Cdk5	0,650
	Cdc2	0,529
S 61	PKC	0,544
T 62	Cdk5	0,692
	GSK3	0,502
S 66	PKC	0,569
S 70	Cdk5	0,623
	GSK3	0,543
S 77	Cdc2	0,512
	PKC	0,510
Y 92	SRC	0,522
T 95	PKC	0,548
S 109	CKI	0,588
	GSK3	0,516
S 149	PKC	0,591

	CKI	0,571
S 153	CKII	0,501
T 196	PKC	0,525
S 209	CKI	0,562
S 262	PKA	0,526
S 282	PKA	0,565
	PKG	0,538
T 295	PKC	0,894
	PKA	0,749
	PKG	0,531
Y 301	EGFR	0,565
S 304	PKC	0,874
Y 344	EGFR	0,566
Y 348	INSR	0,517
S 354	Cdc2	0,534
S 367	CKII	0,576
S 368	Cdk5	0,533
	p38 MAPK	0,512
T 377	PKC	0,578
T 388	PKC	0,791
T 398	PKC	0,667
S 399	PKC	0,713
T 402	PKC	0,508

Tableau A2 – Sites prédictifs de phosphorylation de MAF (sans identification de kinases)

Position	Score
<i>S 8</i>	0,99
<i>S 15</i>	0,96
<i>S 44</i>	0,85
<i>S 61</i>	0,94
<i>T 62</i>	0,88
<i>S 70</i>	0,99
<i>S 77</i>	0,98
<i>S 80</i>	0,99
<i>Y 92</i>	0,95
<i>S 109</i>	0,99
<i>S 209</i>	0,70
<i>S 262</i>	0,99
<i>S 282</i>	0,99
<i>S 318</i>	0,99
<i>Y 344</i>	0,95
<i>Y 348</i>	0,96
<i>S 361</i>	0,99
<i>S 362</i>	0,83
<i>S 368</i>	0,99
<i>T 377</i>	0,80
<i>S 383</i>	0,74
<i>T 398</i>	0,94

Tableau A3– Sites prédictifs de SUMOylation de MAF

Position	Score de confiance
<i>K 29</i>	0,8
<i>K 33</i>	0,93
<i>K 331</i>	0,91

K : lysine. Les scores de confiance sont calculés par l’outil GPS-SUMO (valeurs comprises entre 0 et 1).

Tableau A4– Sites prédictifs d’ubiquitination de MAF

Position	RING	CRL	RBR	HECT
<i>K 29</i>		0,87		
<i>K 33</i>		0,77		0.81
<i>K 34</i>		0,85		0.81
<i>K 85</i>	0.84	0,83		0.82
<i>K 283</i>				0.79
<i>K 290</i>	0.84	0.85		
<i>K 292</i>	0.83	0.79		0.83
<i>K 297</i>		0.80		0.80
<i>K 308</i>		0.60		0.83
<i>K 320</i>	0.82	0.84		0.82
<i>K 331</i>	0.79	0.85		
<i>K 345</i>	0.84	0.85	0.72	
<i>K 347</i>		0.84	0.75	
<i>K 350</i>		0.83	0.64	
<i>K 403</i>		0,94	0.69	

K : lysine. Les scores de confiance sont calculés par l’outil GPS-Uber (valeurs comprises entre 0 et 1).

Tableau A5 – Sites prédictifs d’O- et N-glycosylation de MAF

Position	Score de confiance
O-glycosylation	
S 3	0,53
S 54	0,82
S 57	0,87
T 58	0,85
S 61	0,58
T 62	0,73
S 65	0,85
S 66	0,89
S 70	0,89
S 72	0,93
S 74	0,87
S 77	0,83
S 80	0,54
S 149	0,51
S 175	0,79
T 196	0,84
S 205	0,66
S 209	0,81
S 223	0,74
S 304	0,65
T 374	0,55
S 383	0,62
N-glycosylation	
N 359	0,64
N 365	0,56

S : sérine ; **T** : thréonine ; **N** : asparagine

Les scores de confiance sont calculés par l’outil NetOGlyc 4.0 pour l’O-glycosylation et par l’outil NetNglyc 1.0 pour la N-glycosylation (valeurs comprises entre 0 et 1).

ANNEXE 5 : MISE EN EVIDENCE DE LA STRUCTURE PREDICTIVE DE LA PROTEINE MAF

Tableau A6 – Scores de confiance de la prédiction de la structure de la protéine MAF courte des AA 259 à 355

AA	SCORE	AA	SCORE	AA	SCORE
259	74,46	292	95.80	325	98.67
260	83,03	293	96.93	326	98.44
261	88,23	294	97.81	327	98.72
262	93,93	295	98.13	328	98.63
263	95,59	296	97.82	329	98.64
264	96,32	297	98.37	330	98.64
265	97,02	298	98.40	331	98.50
266	96.44	299	98.29	332	98.58
267	97.20	300	97.97	333	98.31
268	97.27	301	98.60	334	98.44
269	95.87	302	98.48	335	98.59
270	97.60	303	98.52	336	98.61
271	97.65	304	98.47	337	98.31
272	97.74	305	98.69	338	98.60
273	97.08	306	98.56	339	98.24
274	96.39	307	98.62	340	98.32
275	95.76	308	98.67	341	98.33
276	95.58	309	98.64	342	98.19
277	92.76	310	98.64	343	98.04
278	93.50	311	98.62	344	97.76
279	93.78	312	98.50	345	97.47
280	92.06	313	98.57	346	96.56
281	91.21	314	98.74	347	95.29
282	94.24	315	98.54	348	95.49
283	94.89	316	98.54	349	94.68
284	94.13	317	98.62	350	93.16
285	92.20	318	98.43	351	93.29
286	94.35	319	98.57	352	92.70
287	94.55	320	98.55	353	89.82
288	93.69	321	98.64	354	84.92
289	94.23	322	98.71	355	71.49
290	95.09	323	98.63		
291	96.36	324	98.53		

Les AA non présents dans le tableau présentent des scores de confiance < 50. Les AA en bleu clair présentent un score de confiance compris entre 70 et 90. Les AA en bleu foncé présentent un score de confiance supérieur à 90.

BIBLIOGRAPHIE

A

Ahlers, J., A. Mantei, L. Lozza, M. Stäber, F. Heinrich, P. Bacher, T. Hohnstein, L. Menzel, S. G. Yüz, D. Alvarez-Simon, A. R. Bickenbach, C. Weidinger, N. Mockel-Tenbrinck, A. A. Köhl, B. Siegmund, J. Maul, C. Neumann and A. Scheffold (2022). "A Notch/STAT3-driven Blimp-1/c-Maf-dependent molecular switch induces IL-10 expression in human CD4(+) T cells and is defective in Crohn's disease patients." *Mucosal Immunol* 15(3): 480-490.

Akatsuka, T., T. Miyagaki, R. Nakajima, H. Kamijo, T. Oka, N. Takahashi, H. Suga, A. Yoshizaki, Y. Asano, M. Sugaya and S. Sato (2018). "Decreased IL-10-producing regulatory B cells in patients with advanced mycosis fungoides." *Eur J Dermatol* 28(3): 314-319.

Amu, S., S. P. Saunders, M. Kronenberg, N. E. Mangan, A. Atzberger and P. G. Fallon (2010). "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(5): 1114-1124.e1118.

Andris, F., S. Denanglaire, M. Anciaux, M. Hercor, H. Hussein and O. Leo (2017). "The Transcription Factor c-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells." *Front Immunol* 8: 480.

Apetoh, L., F. J. Quintana, C. Pot, N. Joller, S. Xiao, D. Kumar, E. J. Burns, D. H. Sherr, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2010). "The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27." *Nat Immunol* 11(9): 854-861.

Artis, D. and H. Spits (2015). "The biology of innate lymphoid cells." *Nature* 517(7534): 293-301.

Aschenbrenner, D., M. Foglierini, D. Jarrossay, D. Hu, H. L. Weiner, V. K. Kuchroo, A. Lanzavecchia, S. Notarbartolo and F. Sallusto (2018). "An immunoregulatory and tissue-residency program modulated by c-MAF in human T(H)17 cells." *Nat Immunol* 19(10): 1126-1136.

B

Bandrowski, A., M. Brush, J. S. Grethe, M. A. Haendel, D. N. Kennedy, S. Hill, P. R. Hof, M. E. Martone, M. Pols, S. Tan, N. Washington, E. Zudilova-Seinstra and N. Vasilevsky (2015). "The Resource Identification Initiative: A cultural shift in publishing." *F1000Res* 4: 134.

Bandrowski, A. E. and M. E. Martone (2016). "RRIDs: A Simple Step toward Improving Reproducibility through Rigor and Transparency of Experimental Methods." *Neuron* 90(3): 434-436.

Bankó, Z., J. Pozsgay, D. Szili, M. Tóth, T. Gáti, G. Nagy, B. Rojkovich and G. Sármay (2017). "Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients." *J Immunol* 198(4): 1512-1520.

Bauquet, A. T., H. Jin, A. M. Paterson, M. Mitsdoerffer, I. C. Ho, A. H. Sharpe and V. K. Kuchroo (2009). "The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells." *Nat Immunol* 10(2): 167-175.

Bemark, M., L. Friskopp, S. Saghafian-Hedengren, S. Koethe, A. Fasth, J. Abrahamsson, E. Sverremark-Ekström, B. A. Andersson and K. Mellgren (2013). "A glycosylation-dependent LT CD45RB epitope defines previously unacknowledged CD27-IgM(high) B cell subpopulations enriched in young children and after hematopoietic stem cell transplantation." *Clin Immunol* 149(3): 421-431.

Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." *Nature Immunology* 11(10): 889-896.

Blair, P. A., L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." *Immunity* 32(1): 129-140.

Blank, V. and N. C. Andrews (1997). "The Maf transcription factors: regulators of differentiation." *Trends Biochem Sci* 22(11): 437-441.

Blom, N., S. Gammeltoft and S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." *J Mol Biol* 294(5): 1351-1362.

Blom, N., T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft and S. Brunak (2004). "Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence." *Proteomics* 4(6): 1633-1649.

Blumenfeld-Kan, S., E. Staun-Ram and A. Miller (2019). "Fingolimod reduces CXCR4-mediated B cell migration and induces regulatory B cells-mediated anti-inflammatory immune repertoire." *Mult Scler Relat Disord* 34: 29-37.

Bordeaux, J., A. W. Welsh, S. Agarwal, E. Killiam, M. T. Baquero, J. A. Hanna, V. K. Anagnostou and D. L. Rimm (2010). "Antibody validation." *BioTechniques* 48(3): 197-209.

Bosma, A., A. Abdel-Gadir, D. A. Isenberg, E. C. Jury and C. Mauri (2012). "Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells." *Immunity* 36(3): 477-490.

Bouaziz, J. D., A. de Masson, H. Le Buanec, M. Bagot and A. Bensussan (2014). "[Update on regulatory B cells]." *Med Sci (Paris)* 30(8-9): 721-724.

Boudigou, M., M. Michée-Cospolite, P. Hémon, A. Grasseau, C. L. Dantec, E. Porchet, C. Jamin, V. Devauchelle, O. Mignen, D. Cornec, J.-O. Pers, L. L. Pottier and S. Hillion (2021). "IL-21 and IFN-alpha have both opposite and redundant role on human innate precursors and memory B-cell differentiation." *bioRxiv*: 2021.2003.2031.437810.

Brosseau, C., M. Durand, L. Colas, E. Durand, A. Foureau, M. A. Cheminant, G. Bouchaud, L. Castan, M. Klein, A. Magnan and S. Brouard (2018). "CD9(+) Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients." *Front Immunol* 9: 3034.

Busse, M., S. Plenagl, N. K. J. Campe, A. J. Müller, K. Tedford, A. Schumacher and A. C. Zenclussen (2021). "Maternal B Cell-Intrinsic MyD88 Signaling Mediates LPS-Driven Intrauterine Fetal Death." *Cells* 10(10).

C

Cao, S., J. Liu, M. Chesi, P. L. Bergsagel, I. C. Ho, R. P. Donnelly and X. Ma (2002). "Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma." *J Immunol* 169(10): 5715-5725.

Cao, S., J. Liu, L. Song and X. Ma (2005). "The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages." *J Immunol* 174(6): 3484-3492.

Carrasco, D. R., K. Sukhdeo, M. Protopopova, R. Sinha, M. Enos, D. E. Carrasco, M. Zheng, M. Mani, J. Henderson, G. S. Pinkus, N. Munshi, J. Horner, E. V. Ivanova, A. Protopopov, K. C. Anderson, G. Tonon and R. A. DePinho (2007). "The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis." *Cancer Cell* 11(4): 349-360.

Cariappa, A., M. Tang, C. Parng, E. Nebelitskiy, M. Carroll, K. Georgopoulos and S. Pillai (2001). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21." *Immunity* 14(5): 603-615.

Carter, N. A., E. C. Rosser and C. Mauri (2012). "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of LTh17/LTh1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." *Arthritis Res Ther* 14(1): R32.

- Celen, A. B. and U. Sahin (2020). "Sumoylation on its 25th anniversary: mechanisms, pathology, and emerging concepts." *The FEBS Journal* 287(15): 3110-3140.
- Cernecka, H., P. Ochodnický, W. H. Lamers and M. C. Michel (2012). "Specificity evaluation of antibodies against human β 3-adrenoceptors." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 385(9): 875-882.
- Cerutti, A. and M. Rescigno (2008). "The biology of intestinal immunoglobulin A responses." *Immunity* 28(6): 740-750.
- Cervantes, C., M. T. A. Khan, Z. Liu, S. Viswanadhapalli, H. Gupta, T. Curiel, H. Yan, R. Vadlamudi and Z. Xu (2021). "PD-L1-expressing B cells promote murine breast cancer development and mediate response to anti-PD-L1 immune checkpoint inhibitor." *The Journal of Immunology* 206(1 Supplement): 56.13-56.13.
- Chang, K.-K., L.-B. Liu, L.-P. Jin, B. Zhang, J. Mei, H. Li, C.-Y. Wei, W.-J. Zhou, X.-Y. Zhu, J. Shao, D.-J. Li and M.-Q. Li (2017). "IL-27 triggers IL-10 production in LTh17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis." *Cell Death & Disease* 8(3): e2666-e2666.
- Chaudhry, M. S. and A. Karadimitris (2014). "Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells." *J Immunol* 193(10): 4761-4768.
- Chen, X. H., Y. J. Xu, X. G. Wang, P. Lin, B. Y. Cao, Y. Y. Zeng, Q. Wang, Z. B. Zhang, X. L. Mao and T. Zhang (2019). "Mebendazole elicits potent antimyeloma activity by inhibiting the USP5/c-Maf axis." *Acta Pharmacol Sin* 40(12): 1568-1577.
- Cherukuri, A., K. Mohib and D. M. Rothstein (2021). "Regulatory B cells: TIM-1, transplant tolerance, and rejection." *Immunol Rev* 299(1): 31-44.
- Chesi, M. and P. L. Bergsagel (2011). "Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 344-353.
- Chesi, M., P. L. Bergsagel, O. O. Shonukan, M. L. Martelli, L. A. Brents, T. Chen, E. Schröck, T. Ried and W. M. Kuehl (1998). "Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma." *Blood* 91(12): 4457-4463.
- Chesneau, M., H. L. Mai, R. Danger, S. Le Bot, T. V. Nguyen, J. Bernard, C. Poullaouec, P. Guerrif, S. Conchon, M. Giral, B. Charreau, N. Degauque and S. Brouard (2020). "Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties." *J Immunol* 205(9): 2391-2401.
- Chesneau, M., L. Michel, E. Dugast, A. Chenouard, D. Baron, A. Pallier, J. Durand, F. Braza, P. Guerif, D. A. Laplaud, J. P. Soulillou, M. Giral, N. Degauque, E. Chiffolleau and S. Brouard (2015). "Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties." *J Am Soc Nephrol* 26(10): 2588-2598.

Chihara, N., A. Madi, T. Kondo, H. Zhang, N. Acharya, M. Singer, J. Nyman, N. D. Marjanovic, M. S. Kowalczyk, C. Wang, S. Kurtulus, T. Law, Y. Etminan, J. Nevin, C. D. Buckley, P. R. Burkett, J. D. Buenrostro, O. Rozenblatt-Rosen, A. C. Anderson, A. Regev and V. K. Kuchroo (2018). "Induction and transcriptional regulation of the co-inhibitory gene module in T cells." *Nature* 558(7710): 454-459.

Chng, W. J., O. Glebov, P. L. Bergsagel and W. M. Kuehl (2007). "Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma." *Best Pract Res Clin Haematol* 20(4): 571-596.

Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkhurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau and D. R. Littman (2012). "A validated regulatory network for LTh17 cell specification." *Cell* 151(2): 289-303.

Corrado, A., R. P. Ramonell, M. C. Woodruff, C. Tipton, S. Wise, J. Levy, J. DelGaudio, M. E. Kuruvilla, K. R. Magliocca, D. Tomar, S. Garimalla, C. D. Scharer, J. M. Boss, H. Wu, S. Gumber, C. Fucile, G. Gibson, A. Rosenberg, I. Sanz and F. E. Lee (2021). "Extrafollicular IgD+ B cells generate IgE antibody secreting cells in the nasal mucosa." *Mucosal Immunol* 14(5): 1144-1159.

Cunningham, A. F., F. Gaspal, K. Serre, E. Mohr, I. R. Henderson, A. Scott-Tucker, S. M. Kenny, M. Khan, K. M. Toellner, P. J. Lane and I. C. MacLennan (2007). "Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection." *J Immunol* 178(10): 6200-6207.

D

Damle, N. K. and S. Gupta (1982). "Heterogeneity of concanavalin A-induced suppressor T cells in man defined with monoclonal antibodies." *Clin Exp Immunol* 48(3): 581-588.

Das, A., G. Ellis, C. Pallant, A. R. Lopes, P. Khanna, D. Peppia, A. Chen, P. Blair, G. Dusheiko, U. Gill, P. T. Kennedy, M. Brunetto, P. Lampertico, C. Mauri and M. K. Maini (2012). "IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection." *J Immunol* 189(8): 3925-3935.

de Masson, A., J.-D. Bouaziz, H. Le Buanec, M. Robin, A. O'Meara, N. Parquet, M. Rybojad, E. Hau, J.-B. Monfort, M. Branchtein, D. Michonneau, V. Dessirier, F. Sicre de Fontbrune, A. Bergeron, R. Itzykson, N. Dhédin, D. Bengoufa, R. Peffault de Latour, A. Xhaard, M. Bagot, A. Bensussan and G. Socié (2015). "CD24hiCD27+ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease." *Blood* 125(11): 1830-1839.

de Souza, H. S. and C. Fiocchi (2016). "Immunopathogenesis of IBD: current state of the art." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(1): 13-27.

Descatoire, M., S. Weller, S. Irtan, S. Sarnacki, J. Feuillard, S. Storck, A. Guiochon-Mantel, J. Bouligand, A. Morali, J. Cohen, E. Jacquemin, M. Iascone, C. Bole-Feysot, N. Cagnard, J. C. Weill and C. A. Reynaud (2014). "Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties." *J Exp Med* 211(5): 987-1000.

Di Caro, V., B. Phillips, C. Engman, J. Harnaha, M. Trucco and N. Giannoukakis (2014). "Involvement of suppressive B-lymphocytes in the mechanism of tolerogenic dendritic cell reversal of type 1 diabetes in NOD mice." *PLoS One* 9(1): e83575.

Di Niro, R., S. J. Lee, J. A. Vander Heiden, R. A. Elsner, N. Trivedi, J. M. Bannock, N. T. Gupta, S. H. Kleinstein, F. Vigneault, T. J. Gilbert, E. Meffre, S. J. McSorley and M. J. Shlomchik (2015). "Salmonella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed by Extrafollicular Affinity Maturation." *Immunity* 43(1): 120-131.

Dogan, I., B. Bertocci, V. Vilmont, F. Delbos, J. Mégret, S. Storck, C. A. Reynaud and J. C. Weill (2009). "Multiple layers of B cell memory with different effector functions." *Nat Immunol* 10(12): 1292-1299.

E

Edfors, F., A. Hober, K. Linderbäck, G. Maddalo, A. Azimi, Å. Sivertsson, H. Tegel, S. Hober, C. A. Szogyarto, L. Fagerberg, K. von Feilitzen, P. Oksvold, C. Lindskog, B. Forsström and M. Uhlen (2018). "Enhanced validation of antibodies for research applications." *Nat Commun* 9(1): 4130.

Ellenberger, T. E., C. J. Brandl, K. Struhl and S. C. Harrison (1992). "The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex." *Cell* 71(7): 1223-1237.

Elsner, R. A. and M. J. Shlomchik (2020). "Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity." *Immunity* 53(6): 1136-1150.

F

Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* 3(10): 944-950.

Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting LTH1 and LTH17 differentiation." *Sci Transl Med* 5(173): 173ra123.

Fonseca-Camarillo, G., J. Furuzawa-Carballeda and J. K. Yamamoto-Furusho (2015). "Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease." *Cytokine* 75(2): 389-402.

G

Gabryšová, L., M. Alvarez-Martinez, R. Luisier, L. S. Cox, J. Sodenkamp, C. Hosking, D. Pérez-Mazliah, C. Whicher, Y. Kannan, K. Potempa, X. Wu, L. Bhaw, H. Wende, M. H. Sieweke, G. Elgar, M. Wilson, J. Briscoe, V. Metzis, J. Langhorne, N. M. Luscombe and A. O'Garra (2018). "c-Maf controls immune responses by regulating disease-specific gene networks and repressing IL-2 in CD4(+) T cells." *Nat Immunol* 19(5): 497-507.

Gilda, J. E., R. Ghosh, J. X. Cheah, T. M. West, S. C. Bodine and A. V. Gomes (2015). "Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS)." *PLoS One* 10(8): e0135392.

Glass, M. C., D. R. Glass, J. P. Oliveria, B. Mbiribindi, C. O. Esquivel, S. M. Krams, S. C. Bendall and O. M. Martinez (2022). "Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets." *Cell Rep* 39(3): 110728.

Glover, J. N. and S. C. Harrison (1995). "Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA." *Nature* 373(6511): 257-261.

Granai, M., L. Mundo, A. U. Akarca, M. C. Siciliano, H. Rizvi, V. Mancini, N. Onyango, J. Nyagol, N. O. Abinya, I. Maha, S. Margielewska, W. Wi, M. Bibas, P. P. Piccaluga, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend, S. Lazzi, L. Leoncini and T. Marafioti (2020). "Immune landscape in Burkitt lymphoma reveals M2-macrophage polarization and correlation between PD-L1 expression and non-canonical EBV latency program." *Infect Agent Cancer* 15: 28.

Grasseau, A. (2020). A molecular signature of human regulatory B cells in health and disease

Signature moléculaire des lymphocytes B régulateurs en physiologie et en pathologie, Université de Bretagne occidentale - Brest.

Grasseau, A., M. Boudigou, L. Le Pottier, N. Chriti, D. Cornec, J. O. Pers, Y. Renaudineau and S. Hillion (2020). "Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells." *Clin Rev Allergy Immunol* 58(1): 92-106.

Grasseau, A., M. Boudigou, M. Michée-Cospolite, C. Delaloy, O. Mignen, C. Jamin, D. Cornec, J. O. Pers, L. Le Pottier and S. Hillion (2021). "The diversity of the plasmablast signature across species and experimental conditions: A meta-analysis." *Immunology* 164(1): 120-134.

Guan, H., Y. Wan, J. Lan, Q. Wang, Z. Wang, Y. Li, J. Zheng, X. Zhang, Z. Wang, Y. Shen and F. Xie (2016). "PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer." *Sci Rep* 6: 35651.

Gupta, R. and S. Brunak (2002). "Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function." *Pac Symp Biocomput*: 310-322.

Gutiérrez, C., J. Lopez-Abente, V. Pérez-Fernández, A. Prieto-Sánchez, R. Correa-Rocha, S. Moreno-Guillen, M. Muñoz-Fernández and M. Pion (2019). "Analysis of the dysregulation between regulatory B and T cells (LBreg and LTreg) in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients." *PLoS One* 14(3): e0213744.

H

Haeberlein, S., K. Obieglo, A. Ozir-Fazalalikhani, M. A. M. Chayé, H. Veninga, L. E. P. M. van der Vlugt, A. Voskamp, L. Boon, J. M. M. den Haan, L. B. Westerhof, R. H. P. Wilbers, A. Schots, G. Schramm, C. H. Hokke and H. H. Smits (2017). "Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells." *PLOS Pathogens* 13(7): e1006539.

Hagn, M., V. Ebel, K. Sontheimer, E. Schwesinger, O. Lunov, T. Beyer, D. Fabricius, T. F. Barth, A. Viardot, S. Stilgenbauer, J. Hepp, K. Scharffetter-Kochanek, T. Simmet and B. Jahrsdörfer (2010). "CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B." *Eur J Immunol* 40(7): 2060-2069.

Hahne, M., T. Renno, M. Schroeter, M. Irmeler, L. French, T. Bornand, H. R. MacDonald and J. Tschopp (1996). "Activated B cells express functional Fas ligand." *European Journal of Immunology* 26(3): 721-724.

Halliley, J. L., C. M. Tipton, J. Liesveld, A. F. Rosenberg, J. Darce, I. V. Gregoretti, L. Popova, D. Kaminiski, C. F. Fucile, I. Albizua, S. Kyu, K. Y. Chiang, K. T. Bradley, R. Burack, M. Slifka, E. Hammarlund, H. Wu, L. Zhao, E. E. Walsh, A. R. Falsey, T. D. Randall, W. C. Cheung, I. Sanz and F. E. Lee (2015). "Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow." *Immunity* 43(1): 132-145.

Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain and F. E. Lund (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." *Nat Immunol* 1(6): 475-482.

Hasan, M. M., L. Thompson-Snipes, G. Klintmalm, A. J. Demetris, J. O'Leary, S. Oh and H. Joo (2019). "CD24(hi)CD38(hi) and CD24(hi)CD27(+) Human Regulatory B

Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics." *J Immunol* 203(8): 2110-2120.

Hayashi, M., K. Yanaba, Y. Umezawa, Y. Yoshihara, S. Kikuchi, Y. Ishiuchi, H. Saeki and H. Nakagawa (2016). "IL-10-producing regulatory B cells are decreased in patients with psoriasis." *J Dermatol Sci* 81(2): 93-100.

He, Y., S. Wang, J. Tong, S. Jiang, Y. Yang, Z. Zhang, Y. Xu, Y. Zeng, B. Cao, M. F. Moran and X. Mao (2020). "The deubiquitinase USP7 stabilizes Maf proteins to promote myeloma cell survival." *J Biol Chem* 295(7): 2084-2096.

Herath, N. I., N. Rocques, A. Garancher, A. Eychène and C. Pouponnot (2014). "GSK3-mediated MAF phosphorylation in multiple myeloma as a potential therapeutic target." *Blood Cancer J* 4(1): e175.

Herrera, M., M. A. Sparks, A. R. Alfonso-Pecchio, L. M. Harrison-Bernard and T. M. Coffman (2013). "Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type 1 receptor protein." *Hypertension* 61(1): 253-258.

Hewitson, J. P., K. A. West, K. R. James, G. F. Rani, N. Dey, A. Romano, N. Brown, S. A. Teichmann, P. M. Kaye and D. Lagos (2020). "Malat1 Suppresses Immunity to Infection through Promoting Expression of Maf and IL-10 in Th Cells." *J Immunol* 204(11): 2949-2960.

Hines, M. J., M. Coffre, T. Mudianto, M. Panduro, E. J. Wigton, C. Tegla, V. Osorio-Vasquez, R. Kageyama, D. Benhamou, O. Perez, S. Bajwa, M. T. McManus, K. M. Ansel, D. Melamed and S. B. Koralov (2020). "miR-29 Sustains B Cell Survival and Controls Terminal Differentiation via Regulation of PI3K Signaling." *Cell Reports* 33(9): 108436.

Hiramatsu, Y., A. Suto, D. Kashiwakuma, H. Kanari, S. Kagami, K. Ikeda, K. Hirose, N. Watanabe, M. J. Grusby, I. Iwamoto and H. Nakajima (2010). "c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells." *J Leukoc Biol* 87(4): 703-712.

Ho, I. C., M. R. Hodge, J. W. Rooney and L. H. Glimcher (1996). "The Proto-Oncogene *c-maf* Is Responsible for Tissue-Specific Expression of Interleukin-4." *Cell* 85(7): 973-983.

Ho, I. C., D. Lo and L. H. Glimcher (1998). "c-maf promotes T helper cell type 2 (LTh2) and attenuates LTh1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms." *J Exp Med* 188(10): 1859-1866.

Hong, J., J. Fang, R. Lan, Q. Tan, Y. Tian, M. Zhang, P. Okunieff, L. Zhang, J. Lin and D. Han (2017). "TLR9 mediated regulatory B10 cell amplification following sub-total body irradiation: Implications in attenuating EAE." *Mol Immunol* 83: 52-61.

Honke, N., T. Lowin, B. Opgenoorth, N. Shaabani, A. Lautwein, J. R. Teijaro, M. Schneider and G. Pongratz (2022). "Endogenously produced catecholamines improve the regulatory function of TLR9-activated B cells." *PLoS Biol* 20(1): e3001513.

Hsu, C. Y., L. T. Yeh, S. H. Fu, M. W. Chien, Y. W. Liu, S. C. Miaw, D. M. Chang and H. K. Sytwu (2018). "SUMO-defective c-Maf preferentially transactivates I121 to exacerbate autoimmune diabetes." *J Clin Invest* 128(9): 3779-3793.

Huang, W., N. Lu, H. Eberspaecher and B. De Crombrughe (2002). "A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene." *J Biol Chem* 277(52): 50668-50675.

Hurt, E. M., A. Wiestner, A. Rosenwald, A. L. Shaffer, E. Campo, T. Grogan, P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl and L. M. Staudt (2004). "Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma." *Cancer Cell* 5(2): 191-199.

Hurt, E. M., A. Wiestner, A. Rosenwald, A. L. Shaffer, E. Campo, T. Grogan, P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl and L. M. Staudt (2004). "Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma." *Cancer Cell* 5(2): 191-199.

Hussein, H., S. Denanglaire, F. Van Gool, A. Azouz, Y. Ajouaou, H. El-Khatib, G. Oldenhove, O. Leo and F. Andris (2020). "Multiple Environmental Signaling Pathways Control the Differentiation of ROR γ t-Expressing Regulatory T Cells." *Frontiers in Immunology* 10.

I

Ichii, M., K. Oritani and Y. Kanakura (2014). "Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse." *World J Stem Cells* 6(4): 421-431.

Imbratta, C., H. Hussein, F. Andris and G. Verdeil (2020). "c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes." *Front Immunol* 11: 206.

Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." *Blood* 117(2): 530-541.

J

Jahrsdörfer, B., S. E. Blackwell, J. E. Wooldridge, J. Huang, M. W. Andreski, L. S. Jacobus, C. M. Taylor and G. J. Weiner (2006). "B-chronic lymphocytic leukemia

cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation." *Blood* 108(8): 2712-2719.

Jiang, J., T. Qin, L. Zhang, Q. Liu, J. Wu, R. Dai, L. Zhou, Q. Zhao, X. Luo, H. Wang and X. Zhao (2021). "IL-21 Rescues the Defect of IL-10-Producing Regulatory B Cells and Improves Allergic Asthma in DOCK8 Deficient Mice." *Front Immunol* 12: 695596.

Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli and D. Hassabis (2021). "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature* 596(7873): 583-589.

K

Kaltenmeier, C., A. Gawanbacht, T. Beyer, S. Lindner, T. Trzaska, J. A. van der Merwe, G. Härter, B. Grüner, D. Fabricius, R. Lotfi, K. Schwarz, C. Schütz, M. Hönig, A. Schulz, P. Kern, M. Bommer, H. Schrezenmeier, F. Kirchhoff and B. Jahrsdörfer (2015). "CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients." *J Immunol* 194(8): 3768-3777.

Kamekura, R., K. Shigehara, S. Miyajima, S. Jitsukawa, K. Kawata, K. Yamashita, T. Nagaya, A. Kumagai, A. Sato, H. Matsumiya, N. Ogasawara, N. Seki, K. Takano, Y. Kokai, H. Takahashi, T. Himi and S. Ichimiya (2015). "Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma." *Clin Immunol* 158(2): 204-211.

Kang, K., S. H. Park, J. Chen, Y. Qiao, E. Giannopoulou, K. Berg, A. Hanidu, J. Li, G. Nabozny, K. Kang, K. H. Park-Min and L. B. Ivashkiv (2017). "Interferon- γ Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF." *Immunity* 47(2): 235-250.e234.

Kassambara, A., L. Herviou, S. Ovejero, M. Jourdan, C. Thibaut, V. Vikova, P. Pasero, O. Elemento and J. Moreaux (2021). "RNA-sequencing data-driven dissection of human plasma cell differentiation reveals new potential transcription regulators." *Leukemia* 35(5): 1451-1462.

Kataoka, K., M. Noda and M. Nishizawa (1994). "Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun." *Mol Cell Biol* 14(1): 700-712.

Katsarou, A., N. Trasanidis, J. Alvarez-Benayas, F. Papaleonidopoulou, K. Keren, I. V. Kostopoulos, K. Ponnusamy, X. Xiao, N. Feldhahn, I. Roberts, E. Hatjiharissi, M. Papaioannou, I. Sudbery, A. Chaidos, V. S. Caputo and A. Karadimitris (2019). "Oncogenic MAF in Co-Operation with IRF4 Confers Extensive Chromatin Re-Arrangement in Plasma Cells and Generates 'Neo-Enhancers' That Regulate Genes Critical for Myeloma Biology." *Blood* 134(Supplement_1): 3783-3783.

Kerppola, T. K. and T. Curran (1994). "Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun." *Oncogene* 9(3): 675-684.

Khoder, A., A. Sarvaria, A. Alsuliman, C. Chew, T. Sekine, N. Cooper, S. Mielke, H. de Lavallade, M. Muftuoglu, I. Fernandez Curbelo, E. Liu, P. A. Muraro, A. Alousi, K. Stringaris, S. Parmar, N. Shah, H. Shaim, E. Yvon, J. Molldrem, R. Rouce, R. Champlin, I. McNiece, C. Mauri, E. J. Shpall and K. Rezvani (2014). "Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD." *Blood* 124(13): 2034-2045.

Kikuchi, K., M. Iida, N. Ikeda, S. Moriyama, M. Hamada, S. Takahashi, H. Kitamura, T. Watanabe, Y. Hasegawa, K. Hase, T. Fukuhara, H. Sato, E. H. Kobayashi, T. Suzuki, M. Yamamoto, M. Tanaka and K. Asano (2018). "Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation." *J Immunol* 201(2): 635-651.

Kim, H. S., M. B. Lee, D. Lee, K. Y. Min, J. Koo, H. W. Kim, Y. H. Park, S. J. Kim, M. Ikutani, S. Takaki, Y. M. Kim and W. S. Choi (2019). "The regulatory B cell-mediated peripheral tolerance maintained by mast cell IL-5 suppresses oxazolone-induced contact hypersensitivity." *Sci Adv* 5(7): eaav8152.

Kim, J. I., I. C. Ho, M. J. Grusby and L. H. Glimcher (1999). "The Transcription Factor c-Maf Controls the Production of Interleukin-4 but Not Other LTh2 Cytokines." *Immunity* 10(6): 745-751.

Kroenke, M. A., D. Eto, M. Locci, M. Cho, T. Davidson, E. K. Haddad and S. Crotty (2012). "Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation." *J Immunol* 188(8): 3734-3744.

Kurokawa, H., H. Motohashi, S. Sueno, M. Kimura, H. Takagawa, Y. Kanno, M. Yamamoto and T. Tanaka (2009). "Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors." *Mol Cell Biol* 29(23): 6232-6244.

Kurschner, C. and J. I. Morgan (1995). "The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression." *Mol Cell Biol* 15(1): 246-254.

Kusunoki, H., H. Motohashi, F. Katsuoka, A. Morohashi, M. Yamamoto and T. Tanaka (2002). "Solution structure of the DNA-binding domain of MafG." *Nat Struct Biol* 9(4): 252-256.

L

Lai, C. Y., S. Y. Lin, C. K. Wu, L. T. Yeh, H. K. Sytwu and S. C. Miaw (2012). "Tyrosine phosphorylation of c-Maf enhances the expression of IL-4 gene." *J Immunol* 189(4): 1545-1550.

Lai, X.-Y., M.-C. Gui, J. Lin, Y. Li, X. Luo, L.-X. Li and B.-T. Bu (2017). "Peripheral NK and B regulatory cell frequencies are altered with symptomatic exacerbation in generalized myasthenia gravis patients." *Neuroimmunology and Neuroinflammation* 4: 179-187.

Lee, J. H., J. Noh, G. Noh, W. S. Choi, S. Cho and S. S. Lee (2011). "Allergen-specific transforming growth factor- β -producing CD19⁺CD5⁺ regulatory B-cell (Br3) responses in human late eczematous allergic reactions to cow's milk." *J Interferon Cytokine Res* 31(5): 441-449.

Lemoine, S., A. Morva, P. Youinou and C. Jamin (2011). "Human T cells induce their own regulation through activation of B cells." *J Autoimmun* 36(3-4): 228-238.

Levy, Y. and J. C. Brouet (1994). "Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein." *J Clin Invest* 93(1): 424-428.

Li Xiao-li, C. H.-l., Wang Xiao-chun, Han Ti-yun, Zhang De-kui (2022). "Effect of dihydromyricetin on regulatory B cells in experimental colitis mice." *Basic & Clinical Medicine* 42(2): 274-281.

Lighaam, L. C., P. A. Unger, D. W. Vredevoogd, D. Verhoeven, E. Vermeulen, A. W. Turksma, A. Ten Brinke, T. Rispens and S. M. van Ham (2018). "In vitro-Induced Human IL-10(+) B Cells Do Not Show a Subset-Defining Marker Signature and Plastically Co-express IL-10 With Pro-Inflammatory Cytokines." *Front Immunol* 9: 1913.

Lin, B. S., P. Y. Tsai, W. Y. Hsieh, H. W. Tsao, M. W. Liu, R. Grenningloh, L. F. Wang, I. C. Ho and S. C. Miaw (2010). "SUMOylation attenuates c-Maf-dependent IL-4 expression." *Eur J Immunol* 40(4): 1174-1184.

Lin, K. I., C. Angelin-Duclos, T. C. Kuo and K. Calame (2002). "Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells." *Mol Cell Biol* 22(13): 4771-4780.

Lin, Y., K. Wong and K. Calame (1997). "Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation." *Science* 276(5312): 596-599.

Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T. F. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G. U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P. Möller, H. Schrezenmeier and B. Jahrsdörfer (2013). "Interleukin 21-

induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." *Cancer Res* 73(8): 2468-2479.

Liu, B. S., Y. Cao, T. W. Huizinga, D. A. Hafler and R. E. Toes (2014). "TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells." *Eur J Immunol* 44(7): 2121-2129.

Liu, B. S., J. N. Stoop, T. W. Huizinga and R. E. Toes (2013). "IL-21 enhances the activity of the TLR-MyD88-STAT3 pathway but not the classical TLR-MyD88-NF- κ B pathway in human B cells to boost antibody production." *J Immunol* 191(8): 4086-4094.

Liu, C. C., C. Y. Lai, W. F. Yen, Y. H. Lin, H. H. Chang, T. S. Tai, Y. J. Lu, H. W. Tsao, I. C. Ho and S. C. Miaw (2015). "Reciprocal regulation of C-Maf tyrosine phosphorylation by Tec and Ptpn22." *PLoS One* 10(5): e0127617.

Liu, M., Z. Tong, C. Ding, F. Luo, S. Wu, C. Wu, S. Albeituni, L. He, X. Hu, D. Tieri, E. C. Rouchka, M. Hamada, S. Takahashi, A. A. Gibb, G. Kloecker, H. G. Zhang, M. Bousamra, 2nd, B. G. Hill, X. Zhang and J. Yan (2020). "Transcription factor c-Maf is a checkpoint that programs macrophages in lung cancer." *J Clin Invest* 130(4): 2081-2096.

Liu, M., X. Zhao, Y. Ma, Y. Zhou, M. Deng and Y. Ma (2018). "Transcription factor c-Maf is essential for IL-10 gene expression in B cells." *Scand J Immunol* 88(3): e12701.

Liu, Y., A. Beyer and R. Aebersold (2016). "On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance." *Cell* 165(3): 535-550.

Lorenzetti, R., I. Janowska, C. R. Smulski, N. Frede, N. Henneberger, L. Walter, M. T. Schleyer, J. M. Hüppe, J. Staniek, U. Salzer, A. Venhoff, A. Troilo, R. E. Voll, N. Venhoff, J. Thiel and M. Rizzi (2019). "Abatacept modulates CD80 and CD86 expression and memory formation in human B-cells." *J Autoimmun* 101: 145-152.

Lotz, M., E. Ranheim and T. J. Kipps (1994). "Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells." *J Exp Med* 179(3): 999-1004.

Lundy, S. K. and D. A. Fox (2009). "Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis." *Arthritis Research & Therapy* 11(4): R128.

M

Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* 25(12): 677-686.

- Marchalant, Y., P. W. Brownjohn, A. Bonnet, T. Kleffmann and J. C. Ashton (2014). "Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity." *J Histochem Cytochem* 62(6): 395-404.
- Martin, F., A. M. Oliver and J. F. Kearney (2001). "Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens." *Immunity* 14(5): 617-629.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S. L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki and Y. Baba (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." *Immunity* 41(6): 1040-1051.
- Matsushita, T., Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara and M. Fujimoto (2016). "Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity." *Rheumatology (Oxford)* 55(2): 263-267.
- Matsushita, T., M. Horikawa, Y. Iwata and T. F. Tedder (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis." *J Immunol* 185(4): 2240-2252.
- Mavropoulos, A., T. Simopoulou, A. Varna, C. Liaskos, C. G. Katsiari, D. P. Bogdanos and L. I. Sakkas (2016). "LBreg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With Systemic Sclerosis." *Arthritis Rheumatol* 68(2): 494-504.
- Mavropoulos, A., A. Varna, E. Zafiriou, C. Liaskos, I. Alexiou, A. Roussaki-Schulze, M. Vlychou, C. Katsiari, D. P. Bogdanos and L. I. Sakkas (2017). "IL-10 producing LBregs are impaired in psoriatic arthritis and psoriasis and inversely correlate with IL-17- and IFN γ -producing T cells." *Clin Immunol* 184: 33-41.
- McHeyzer-Williams, L. J. and M. G. McHeyzer-Williams (2005). "Antigen-specific memory B cell development." *Annu Rev Immunol* 23: 487-513.
- Melchers, F. (2005). "The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire." *Nat Rev Immunol* 5(7): 578-584.
- Menon, M., P. A. Blair, D. A. Isenberg and C. Mauri (2016). "A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus." *Immunity* 44(3): 683-697.
- Michée-Cospolite, M., M. Boudigou, A. Grasseau, Q. Simon, O. Mignen, J. O. Pers, D. Cornec, L. Le Pottier and S. Hillion (2022). "Molecular Mechanisms Driving IL-10-Producing B Cells Functions: STAT3 and c-MAF as Underestimated Central Key Regulators?" *Front Immunol* 13: 818814.

Mills, C. D., L. L. Lenz and R. A. Harris (2016). "A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy." *Cancer Res* 76(3): 513-516.

Mishima, Y., A. Oka, B. Liu, J. W. Herzog, C. S. Eun, T. J. Fan, E. Bulik-Sullivan, I. M. Carroll, J. J. Hansen, L. Chen, J. E. Wilson, N. C. Fisher, J. P. Ting, T. Nochi, A. Wahl, J. V. Garcia, C. L. Karp and R. B. Sartor (2019). "Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10-producing regulatory B cells." *J Clin Invest* 129(9): 3702-3716.

Mitchell, R. E., M. Hassan, B. R. Burton, G. Britton, E. V. Hill, J. Verhagen and D. C. Wraith (2017). "IL-4 enhances IL-10 production in LTh1 cells: implications for LTh1 and LTh2 regulation." *Sci Rep* 7(1): 11315.

Morito, N., K. Yoh, A. Maeda, T. Nakano, A. Fujita, M. Kusakabe, M. Hamada, T. Kudo, K. Yamagata and S. Takahashi (2011). "A Novel Transgenic Mouse Model of the Human Multiple Myeloma Chromosomal Translocation t(14;16)(q32;q23)." *Cancer Research* 71(2): 339-348.

N

Natarajan, P., A. Singh, J. T. McNamara, E. R. Secor, Jr., L. A. Guernsey, R. S. Thrall and C. M. Schramm (2012). "Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF- β , and colocalize with CD4+Foxp3+ T cells." *Mucosal Immunol* 5(6): 691-701.

Natkunam, Y., S. Tedoldi, J. C. Paterson, S. Zhao, M. Rodriguez-Justo, A. H. Beck, R. Siebert, D. Y. Mason and T. Marafioti (2009). "Characterization of c-Maf transcription factor in normal and neoplastic hematolymphoid tissue and its relevance in plasma cell neoplasia." *Am J Clin Pathol* 132(3): 361-371.

Neumann, C., J. Blume, U. Roy, P. P. Teh, A. Vasanthakumar, A. Beller, Y. Liao, F. Heinrich, T. L. Arenzana, J. A. Hackney, C. Eidenschenk, E. J. C. Gálvez, C. Stehle, G. A. Heinz, P. Maschmeyer, T. Sidwell, Y. Hu, D. Amsen, C. Romagnani, H. D. Chang, A. Kruglov, M. F. Mashreghi, W. Shi, T. Strowig, S. Rutz, A. Kallies and A. Scheffold (2019). "c-Maf-dependent T(reg) cell control of intestinal T(H)17 cells and IgA establishes host-microbiota homeostasis." *Nat Immunol* 20(4): 471-481.

Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A. A. Köhl, C. Loddenkemper, M. Haury, S. A. Nedospasov, S. H. Kaufmann, U. Steinhoff, D. P. Calado and S. Fillatreau (2010). "Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection." *Immunity* 33(5): 777-790.

Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A. A. Köhl, C. Loddenkemper, M. Haury, S. A. Nedospasov, S. H. Kaufmann, U. Steinhoff, D. P. Calado and S. Fillatreau (2010). "Signaling via the MyD88 adaptor

protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection." *Immunity* 33(5): 777-790.

Ni, M., A. W. t. MacFarlane, M. Toft, C. A. Lowell, K. S. Campbell and J. A. Hamerman (2012). "B-cell adaptor for PI3K (BCAP) negatively regulates Toll-like receptor signaling through activation of PI3K." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(1): 267-272.

Niceta, M., E. Stellacci, K. W. Gripp, G. Zampino, M. Kousi, M. Anselmi, A. Traversa, A. Ciolfi, D. Stabley, A. Bruselles, V. Caputo, S. Cecchetti, S. Prudente, M. T. Fiorenza, C. Boitani, N. Philip, D. Niyazov, C. Leoni, T. Nakane, K. Keppler-Noreuil, S. R. Braddock, G. Gillessen-Kaesbach, A. Palleschi, P. M. Campeau, B. H. Lee, C. Pouponnot, L. Stella, G. Bocchinfuso, N. Katsanis, K. Sol-Church and M. Tartaglia (2015). "Mutations Impairing GSK3-Mediated MAF Phosphorylation Cause Cataract, Deafness, Intellectual Disability, Seizures, and a Down Syndrome-like Facies." *Am J Hum Genet* 96(5): 816-825.

Nouël, A., P. Pochard, Q. Simon, I. Ségalen, Y. Le Meur, J. O. Pers and S. Hillion (2015). "B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner." *J Autoimmun* 59: 53-60.

Nova-Lamperti, E., G. Fanelli, P. D. Becker, P. Chana, R. Elgueta, P. C. Dodd, G. M. Lord, G. Lombardi and M. P. Hernandez-Fuentes (2016). "IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses." *Sci Rep* 6: 20044.

O

Oleinika, K., E. C. Rosser, D. E. Matei, K. Nistala, A. Bosma, I. Drozdov and C. Mauri (2018). "CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells." *Nature Communications* 9(1): 684.

P

Palm, A. E. and C. Henry (2019). "Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination." *Front Immunol* 10: 1787.

Pape, K. A., V. Kouskoff, D. Nemazee, H. L. Tang, J. G. Cyster, L. E. Tze, K. L. Hippen, T. W. Behrens and M. K. Jenkins (2003). "Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response." *J Exp Med* 197(12): 1677-1687.

Parker, M. E., A. Barrera, J. D. Wheaton, M. K. Zuberbuehler, D. S. J. Allan, J. R. Carlyle, T. E. Reddy and M. Ciofani (2020). "c-Maf regulates the plasticity of group 3 innate lymphoid cells by restraining the type 1 program." *J Exp Med* 217(1).

Passmore, L. A. and D. Barford (2004). "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation." *Biochem J* 379(Pt 3): 513-525.

Pennati, A., S. Ng, Y. Wu, J. R. Murphy, J. Deng, S. Rangaraju, S. Asress, J. L. Blanchfield, B. Evavold and J. Galipeau (2016). "Regulatory B Cells Induce Formation of IL-10-Expressing T Cells in Mice with Autoimmune Neuroinflammation." *The Journal of Neuroscience* 36(50): 12598-12610.

Pfänder, P., A. K. Eiers, U. Burret and S. Vettorazzi (2021). "Deletion of Cdk5 in Macrophages Ameliorates Anti-Inflammatory Response during Endotoxemia through Induction of C-Maf and Il-10." *Int J Mol Sci* 22(17).

Pillai-Kastoori, L., S. Heaton, S. D. Shiflett, A. C. Roberts, A. Solache and A. R. Schutz-Geschwender (2020). "Antibody validation for Western blot: By the user, for the user." *J Biol Chem* 295(4): 926-939.

Pokrovskii, M., J. A. Hall, D. E. Ochayon, R. Yi, N. S. Chaimowitz, H. Seelamneni, N. Carriero, A. Watters, S. N. Waggoner, D. R. Littman, R. Bonneau and E. R. Miraldi (2019). "Characterization of Transcriptional Regulatory Networks that Promote and Restrict Identities and Functions of Intestinal Innate Lymphoid Cells." *Immunity* 51(1): 185-197.e186.

Pone, E. J., Z. Lou, T. Lam, M. L. Greenberg, R. Wang, Z. Xu and P. Casali (2015). "B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses." *Autoimmunity* 48(1): 1-12.

Pot, C., H. Jin, A. Awasthi, S. M. Liu, C.-Y. Lai, R. Madan, A. H. Sharpe, C. L. Karp, S.-C. Miaw, I.-C. Ho and V. K. Kuchroo (2009). "Cutting Edge: IL-27 Induces the Transcription Factor c-Maf, Cytokine IL-21, and the Costimulatory Receptor ICOS that Coordinately Act Together to Promote Differentiation of IL-10-Producing LTr1 Cells." *The Journal of Immunology* 183(2): 797-801.

Q

Qiang, Y. W., S. Ye, Y. Chen, A. F. Buros, R. Edmonson, F. van Rhee, B. Barlogie, J. Epstein, G. J. Morgan and F. E. Davies (2016). "MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma." *Blood* 128(25): 2919-2930.

R

Radomir, L., M. P. Kramer, M. Perpinial, N. Schottlender, S. Rabani, K. David, A. Wiener, H. Lewinsky, S. Becker-Herman, R. Aharoni, R. Milo, C. Mauri and I.

Shachar (2021). "The survival and function of IL-10-producing regulatory B cells are negatively controlled by SLAMF5." *Nat Commun* 12(1): 1893.

Rauch, D. A., S. L. Olson, J. C. Harding, H. Sundaramoorthi, Y. Kim, T. Zhou, A. R. MacLeod, G. Challen and L. Ratner (2020). "Interferon regulatory factor 4 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia lymphoma." *Retrovirology* 17(1): 27.

Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh and L. H. Glimcher (2002). "Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression." *J Exp Med* 195(8): 1003-1012.

Rocques, N., N. Abou Zeid, K. Sii-Felice, L. Lecoin, M. P. Felder-Schmittbuhl, A. Eychène and C. Pouponnot (2007). "GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity." *Mol Cell* 28(4): 584-597.

Rojas, O. L., A. K. Pröbstel, E. A. Porfilio, A. A. Wang, M. Charabati, T. Sun, D. S. W. Lee, G. Galicia, V. Ramaglia, L. A. Ward, L. Y. T. Leung, G. Najafi, K. Khaleghi, B. Garcillán, A. Li, R. Besla, I. Naouar, E. Y. Cao, P. Chiaranunt, K. Burrows, H. G. Robinson, J. R. Allanach, J. Yam, H. Luck, D. J. Campbell, D. Allman, D. G. Brooks, M. Tomura, R. Baumann, S. S. Zamvil, A. Bar-Or, M. S. Horwitz, D. A. Winer, A. Mortha, F. Mackay, A. Prat, L. C. Osborne, C. Robbins, S. E. Baranzini and J. L. Gommerman (2019). "Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10." *Cell* 176(3): 610-624.e618.

Rutz, S., R. Noubade, C. Eidenschenk, N. Ota, W. Zeng, Y. Zheng, J. Hackney, J. Ding, H. Singh and W. Ouyang (2011). "Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells." *Nat Immunol* 12(12): 1238-1245.

S

Sagar, M. Pokrovskii, J. S. Herman, S. Naik, E. Sock, P. Zeis, U. Lausch, M. Wegner, Y. Tanriver, D. R. Littman and D. Grün (2020). "Deciphering the regulatory landscape of fetal and adult $\gamma\delta$ T-cell development at single-cell resolution." *Embo j* 39(13): e104159.

Sahoo, A., A. Alekseev, K. Tanaka, L. Obertas, B. Lerman, C. Haymaker, K. Clise-Dwyer, J. S. McMurray and R. Nurieva (2015). "Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells." *Nature Communications* 6(1): 7997.

Sanz, I., C. Wei, S. A. Jenks, K. S. Cashman, C. Tipton, M. C. Woodruff, J. Hom and F. E. Lee (2019). "Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations." *Front Immunol* 10: 2458.

Sato, K., F. Miyoshi, K. Yokota, Y. Araki, Y. Asanuma, Y. Akiyama, K. Yoh, S. Takahashi, H. Aburatani and T. Mimura (2011). "Marked induction of c-Maf protein

during LTh17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development." *J Biol Chem* 286(17): 14963-14971.

Saxena, A., H. Yagita, T. W. Donner and A. R. A. Hamad (2017). "Expansion of FasL-Expressing CD5+ B Cells in Type 1 Diabetes Patients." *Frontiers in Immunology* 8.

Sayi, A., E. Kohler, I. M. Toller, R. A. Flavell, W. Müller, A. Roers and A. Müller (2011). "TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells." *J Immunol* 186(2): 878-890.

Schweighoffer, E. and V. L. J. Tybulewicz (2018). "Signalling for B cell survival." *Current Opinion in Cell Biology* 51: 8-14.

Seifert, M. and R. Küppers (2009). "Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation." *Journal of Experimental Medicine* 206(12): 2659-2669.

Shaffer, A. L., K. I. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltnane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame and L. M. Staudt (2002). "Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program." *Immunity* 17(1): 51-62.

Shalpour, S., J. Font-Burgada, G. Di Caro, Z. Zhong, E. Sanchez-Lopez, D. Dhar, G. Willimsky, M. Ammirante, A. Strasner, D. E. Hansel, C. Jamieson, C. J. Kane, T. Klatter, P. Birner, L. Kenner and M. Karin (2015). "Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy." *Nature* 521(7550): 94-98.

Shalpour, S., X. J. Lin, I. N. Bastian, J. Brain, A. D. Burt, A. A. Aksenov, A. F. Vrbanac, W. Li, A. Perkins, T. Matsutani, Z. Zhong, D. Dhar, J. A. Navas-Molina, J. Xu, R. Loomba, M. Downes, R. T. Yu, R. M. Evans, P. C. Dorrestein, R. Knight, C. Benner, Q. M. Anstee and M. Karin (2017). "Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity." *Nature* 551(7680): 340-345.

Sharma, M. and A. S. Tripathy (2022). "Regulatory Role of B Cells and Its Subsets in Hepatitis E Virus Infection." *Biomed Res Int* 2022: 7932150.

Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V. D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M. D. Leech, R. C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinl, A. Grützkau, J. R. Grün, K. Horn, A. A. Köhl, T. Dörner, A. Bar-Or, S. H. E. Kaufmann, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." *Nature* 507(7492): 366-370.

Shi, W., Y. Liao, S. N. Willis, N. Taubenheim, M. Inouye, D. M. Tarlinton, G. K. Smyth, P. D. Hodgkin, S. L. Nutt and L. M. Corcoran (2015). "Transcriptional

profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells." *Nat Immunol* 16(6): 663-673.

Shinkura, R., F. Matsuda, T. Sakiyama, T. Tsubata, H. Hiai, M. Paumen, S. Miyawaki and T. Honjo (1996). "Defects of somatic hypermutation and class switching in alymphoplasia (aly) mutant mice." *Int Immunol* 8(7): 1067-1075.

Siewe, B., J. T. Stapleton, J. Martinson, A. Keshavarzian, N. Kazmi, P. M. Demarais, A. L. French and A. Landay (2013). "Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro." *J Leukoc Biol* 93(5): 811-818.

Siewe, B., J. T. Stapleton, J. Martinson, A. Keshavarzian, N. Kazmi, P. M. Demarais, A. L. French and A. Landay (2013). "Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro." *J Leukoc Biol* 93(5): 811-818.

Sii-Felice, K., C. Pouponnot, S. Gillet, L. Lecoin, J. A. Girault, A. Eychène and M. P. Felder-Schmittbuhl (2005). "MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase." *FEBS Lett* 579(17): 3547-3554.

Simon, Q., A. Grasseau, M. Boudigou, L. Le Pottier, E. Bettachioli, D. Cornec, B. Rouvière, C. Jamin, L. Le Lann, M. O. Borghi, R. Aguilar-Quesada, Y. Renaudineau, M. E. Alarcón-Riquelme, J. O. Pers and S. Hillion (2021). "A Proinflammatory Cytokine Network Profile in LTh1/Type 1 Effector B Cells Delineates a Common Group of Patients in Four Systemic Autoimmune Diseases." *Arthritis Rheumatol* 73(8): 1550-1561.

Stentoft, C., S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H. H. Wandall, S. B. Levery and H. Clausen (2013). "Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology." *Embo j* 32(10): 1478-1488.

Stożek, K., K. Grubczak, V. Marolda, A. Eljaszewicz, M. Moniuszko and A. Bossowski (2020). "Lower proportion of CD19(+)IL-10(+) and CD19(+)CD24(+)CD27(+) but not CD1d(+)CD5(+)CD19(+)CD24(+)CD27(+) IL-10(+) B cells in children with autoimmune thyroid diseases." *Autoimmunity* 53(1): 46-55.

Sun, L., F. Song, H. Liu, C. Wang, X. Tang, Z. Li, H. Ge and P. Liu (2020). "The novel mutation P36R in LRP5L contributes to congenital membranous cataract via inhibition of laminin γ 1 and c-MAF." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 258(12): 2737-2751.

Suvas, S., V. Singh, S. Sahdev, H. Vohra and J. N. Agrewala (2002). "Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma." *J Biol Chem* 277(10): 7766-7775.

Suzuki-Yamazaki, N., R. Yanobu-Takanashi, T. Okamura and S. Takaki (2017). "IL-10 production in murine IgM(+) CD138(hi) cells is driven by Blimp-1 and downregulated in class-switched cells." *Eur J Immunol* 47(3): 493-503.

T

Tanaka, S., A. Suto, T. Iwamoto, D. Kashiwakuma, S. Kagami, K. Suzuki, H. Takatori, T. Tamachi, K. Hirose, A. Onodera, J. Suzuki, O. Ohara, M. Yamashita, T. Nakayama and H. Nakajima (2014). "Sox5 and c-Maf cooperatively induce LTh17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3." *J Exp Med* 211(9): 1857-1874.

Tao, L., Y. Wang, J. Xu, J. Su, Q. Yang, W. Deng, B. Zou, Y. Tan, Z. Ding and X. Li (2019). "IL-10-producing regulatory B cells exhibit functional defects and play a protective role in severe endotoxic shock." *Pharmacological Research* 148: 104457.

Tarique, M., H. Naz, S. V. Kurra, C. Saini, R. A. Naqvi, R. Rai, M. Suhail, N. Khanna, D. N. Rao and A. Sharma (2018). "Interleukin-10 Producing Regulatory B Cells Transformed CD4(+)CD25(-) Into LTregs and Enhanced Regulatory T Cells Function in Human Leprosy." *Front Immunol* 9: 1636.

Tashiro, Y., A. Murakami, Y. Hara, T. Shimizu, M. Kubo, R. Goitsuka, H. Kishimoto and T. Azuma (2018). "High-affinity IgM(+) memory B cells are defective in differentiation into IgM antibody-secreting cells by re-stimulation with a T cell-dependent antigen." *Sci Rep* 8(1): 14559.

Taylor, J. J., M. K. Jenkins and K. A. Pape (2012). "Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells." *Trends Immunol* 33(12): 590-597.

Taylor, J. J., K. A. Pape, H. R. Steach and M. K. Jenkins (2015). "Humoral immunity. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell." *Science* 347(6223): 784-787.

Tellier, J., W. Shi, M. Minnich, Y. Liao, S. Crawford, G. K. Smyth, A. Kallies, M. Busslinger and S. L. Nutt (2016). "Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response." *Nat Immunol* 17(3): 323-330.

Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott and D. L. Kaufman (2001). "Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate LTh1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice." *The Journal of Immunology* 167(2): 1081-1089.

Tizian, C., A. Lahmann, O. Hölsken, C. Cosovanu, M. Kofoed-Branzk, F. Heinrich, M. F. Mashreghi, A. Kruglov, A. Diefenbach and C. Neumann (2020). "c-Maf restrains T-bet-driven programming of CCR6-negative group 3 innate lymphoid cells." *Elife* 9.

Todo, K., O. Koga, M. Nishikawa and M. Hikida (2015). "Erratum: Modulation of Ig β is essential for the B cell selection in germinal center." *Sci Rep* 5: 12208.

Toubi, E., S. Nussbaum, E. Staun-Ram, A. Snir, D. Melamed, L. Hayardeny and A. Miller (2012). "Laquinimod modulates B cells and their regulatory effects on T cells in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* 251(1-2): 45-54.

U

Uhlen, M., A. Bandrowski, S. Carr, A. Edwards, J. Ellenberg, E. Lundberg, D. L. Rimm, H. Rodriguez, T. Hiltke, M. Snyder and T. Yamamoto (2016). "A proposal for validation of antibodies." *Nat Methods* 13(10): 823-827.

V

Valor, L. M., B. Rodríguez-Bayona, A. B. Ramos-Amaya, J. A. Brieva and A. Campos-Caro (2017). "The transcriptional profiling of human in vivo-generated plasma cells identifies selective imbalances in monoclonal gammopathies." *PLoS One* 12(8): e0183264.

van de Veen, W., B. Stanic, O. F. Wirz, K. Jansen, A. Globinska and M. Akdis (2016). "Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond." *J Allergy Clin Immunol* 138(3): 654-665.

van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Söllner, D. G. Akdis, B. Rückert, C. A. Akdis and M. Akdis (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." *J Allergy Clin Immunol* 131(4): 1204-1212.

van den Bosch, M. W. M., E. Palsson-Mcdermott, D. S. Johnson and L. A. J. O'Neill (2014). "LPS induces the degradation of programmed cell death protein 4 (PDCD4) to release Twist2, activating c-Maf transcription to promote interleukin-10 production." *J Biol Chem* 289(33): 22980-22990.

van Rensburg, I. C., L. Kleynhans, A. Keyser, G. Walzl and A. G. Loxton (2017). "B-cells with a FasL expressing regulatory phenotype are induced following successful anti-tuberculosis treatment." *Immun Inflamm Dis* 5(1): 57-67.

Van Zelm, M. C., T. Szczepanski, M. van der Burg and J. J. van Dongen (2007). "Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion." *J Exp Med* 204(3): 645-655.

Varadi, M., S. Anyango, M. Deshpande, S. Nair, C. Natassia, G. Yordanova, D. Yuan, O. Stroe, G. Wood, A. Laydon, A. Židek, T. Green, K. Tunyasuvunakool, S. Petersen, J. Jumper, E. Clancy, R. Green, A. Vora, M. Lutfi, M. Figurnov, A. Cowie, N. Hobbs, P. Kohli, G. Kleywegt, E. Birney, D. Hassabis and S. Velankar (2022). "AlphaFold

Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models." *Nucleic Acids Res* 50(D1): D439-d444.

Vinson, C., A. Acharya and E. J. Taparowsky (2006). "Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo." *Biochim Biophys Acta* 1759(1-2): 4-12.

Vinson, C., M. Myakishev, A. Acharya, A. A. Mir, J. R. Moll and M. Bonovich (2002). "Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties." *Mol Cell Biol* 22(18): 6321-6335.

Vonarbourg, C., A. Mortha, V. L. Bui, P. P. Hernandez, E. A. Kiss, T. Hoyler, M. Flach, B. Bengsch, R. Thimme, C. Hölscher, M. Hönig, U. Pannicke, K. Schwarz, C. F. Ware, D. Finke and A. Diefenbach (2010). "Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes." *Immunity* 33(5): 736-751.

W

Wang, C., X. Tan, D. Tang, Y. Gou, C. Han, W. Ning, S. Lin, W. Zhang, M. Chen, D. Peng and Y. Xue (2022). "GPS-Uber: a hybrid-learning framework for prediction of general and E3-specific lysine ubiquitination sites." *Brief Bioinform* 23(2).

Wang, M., Z. Gu, J. Yang, H. Zhao and Z. Cao (2019). "Changes among TGF- β 1(+) LBreg cells and helper T cell subsets in a murine model of allergic rhinitis with prolonged OVA challenge." *Int Immunopharmacol* 69: 347-357.

Wang, M., D. Wu, P. Liu and J. Deng (2014). "Silence of MCL-1 upstream signaling by shRNA abrogates multiple myeloma growth." *Exp Hematol Oncol* 3(1): 27.

Wang, S., J. Juan, Z. Zhang, Y. Du, Y. Xu, J. Tong, B. Cao, M. F. Moran, Y. Zeng and X. Mao (2017). "Inhibition of the deubiquitinase USP5 leads to c-Maf protein degradation and myeloma cell apoptosis." *Cell Death Dis* 8(9): e3058.

Wang, W. W., X. L. Yuan, H. Chen, G. H. Xie, Y. H. Ma, Y. X. Zheng, Y. L. Zhou and L. S. Shen (2015). "CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}LBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer." *Oncotarget* 6(32): 33486-33499.

Wang, Y., Y. Mao, J. Zhang, G. Shi, L. Cheng, Y. Lin, Y. Li, X. Zhang, Y. Zhang, X. Chen, J. Deng, X. Su, L. Dai, Y. Yang, S. Zhang, D. Yu, Y. Wei and H. Deng (2018). "IL-35 recombinant protein reverses inflammatory bowel disease and psoriasis through regulation of inflammatory cytokines and immune cells." *J Cell Mol Med* 22(2): 1014-1025.

Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre and M. C. Nussenzweig (2003). "Predominant autoantibody production by early human B cell precursors." *Science* 301(5638): 1374-1377.

Weller, M. G. (2016). "Quality Issues of Research Antibodies." *Anal Chem Insights* 11: 21-27.

Wheaton, J. D., C. H. Yeh and M. Ciofani (2017). "Cutting Edge: c-Maf Is Required for Regulatory T Cells To Adopt ROR γ t(+) and Follicular Phenotypes." *J Immunol* 199(12): 3931-3936.

Wolf, S. D., B. N. Dittel, F. Hardardottir and C. A. Janeway, Jr. (1996). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice." *J Exp Med* 184(6): 2271-2278.

Wu, B., S. Zhang, Z. Guo, G. Wang, G. Zhang, L. Xie, J. Lou, X. Chen, D. Wu, W. Bergmeier, J. Zheng and Y. Y. Wan (2018). "RAS P21 Protein Activator 3 (RASA3) Specifically Promotes Pathogenic T Helper 17 Cell Generation by Repressing T-Helper-2-Cell-Biased Programs." *Immunity* 49(5): 886-898 e885.

Wynn, T. A. and K. M. Vannella (2016). "Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis." *Immunity* 44(3): 450-462.

X

Xu, C., M. Zhang, K. Li, M. Ni, Y. Bai, J. Zhang, X. Song and J. Wang (2019). "CD24(hi)CD38(hi) B regulatory cells from patients with end plate inflammation presented reduced functional potency." *Int Immunopharmacol* 70: 295-301.

Xu, J., Y. Yang, G. Qiu, G. Lal, Z. Wu, D. E. Levy, J. C. Ochando, J. S. Bromberg and Y. Ding (2009). "c-Maf Regulates IL-10 Expression during LTh17 Polarization." *The Journal of Immunology* 182(10): 6226-6236.

Xu, M., M. Pokrovskii, Y. Ding, R. Yi, C. Au, O. J. Harrison, C. Galan, Y. Belkaid, R. Bonneau and D. R. Littman (2018). "c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont." *Nature* 554(7692): 373-377.

Xu, Y., T. Sun, K. Zeng, M. Xu, J. Chen, X. Xu, Z. Zhang, B. Cao, X. Tang, D. Wu, Y. Kong, Y. Zeng and X. Mao (2020). "Anti-bacterial and anti-viral nanchangmycin displays anti-myeloma activity by targeting Otub1 and c-Maf." *Cell Death Dis* 11(9): 818.

Xu, Y., Z. Zhang, J. Li, J. Tong, B. Cao, P. Taylor, X. Tang, D. Wu, M. F. Moran, Y. Zeng and X. Mao (2017). "The ubiquitin-conjugating enzyme UBE2O modulates c-Maf stability and induces myeloma cell apoptosis." *J Hematol Oncol* 10(1): 132.

Xu, Z., H. Zan, E. J. Pone, T. Mai and P. Casali (2012). "Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond." *Nat Rev Immunol* 12(7): 517-531.

Y

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." *Immunity* 28(5): 639-650.

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata and T. F. Tedder (2009). "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals." *J Immunol* 182(12): 7459-7472.

Yanaba, K., M. Kamata, N. Ishiura, S. Shibata, Y. Asano, Y. Tada, M. Sugaya, T. Kadono, T. F. Tedder and S. Sato (2013). "Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 94(4): 563-573.

Yang, G., X. R. Geng, Z. Q. Liu, J. Q. Liu, X. Y. Liu, L. Z. Xu, H. P. Zhang, Y. X. Sun, Z. G. Liu and P. C. Yang (2015). "Thrombospondin-1 (TSP1)-producing B cells restore antigen (Ag)-specific immune tolerance in an allergic environment." *J Biol Chem* 290(20): 12858-12867.

Yang, X., J. Yang, Y. Chu, Y. Xue, D. Xuan, S. Zheng and H. Zou (2014). "T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus." *PLoS One* 9(2): e88441.

Ye, Z., Y. Jiang, D. Sun, W. Zhong, L. Zhao and Z. Jiang (2019). "The Plasma Interleukin (IL)-35 Level and Frequency of Circulating IL-35(+) Regulatory B Cells are Decreased in a Cohort of Chinese Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus." *Sci Rep* 9(1): 13210.

Yokoyama, T., A. Yoshizaki, K. L. Simon, M. R. Kirby, S. M. Anderson and F. Candotti (2015). "Age-Dependent Defects of Regulatory B Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome Gene Knockout Mice." *PLOS ONE* 10(10): e0139729.

Yoshihara, Y., Y. Ishiuchi, A. Yoshizaki, M. Kurita, M. Hayashi, T. Ishiji, H. Nakagawa, A. Asahina and K. Yanaba (2019). "IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Decreased in Patients with Atopic Dermatitis." *J Invest Dermatol* 139(2): 475-478.

Yoshizaki, A., T. Miyagaki, D. J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E. I. Kountikov, R. Spolski, J. C. Poe, W. J. Leonard and T. F. Tedder (2012). "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions." *Nature* 491(7423): 264-268.

Yu, C., L. Sun, C. He, R. M. Mahdi and C. E. EGWUAGU (2015). "IL-21 induces Expansion of IL-35-producing B cells (i35-LBregs)." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(7): 867-867.

Yu, L., F. Yang, F. Zhang, D. Guo, L. Li, X. Wang, T. Liang, J. Wang, Z. Cai and H. Jin (2018). "CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production." *Cell Death Dis* 9(9): 905.

Xu, Y., T. Sun, K. Zeng, M. Xu, J. Chen, X. Xu, Z. Zhang, B. Cao, X. Tang, D. Wu, Y. Kong, Y. Zeng and X. Mao (2020). "Anti-bacterial and anti-viral nanchangmycin displays anti-myeloma activity by targeting Otub1 and c-Maf." *Cell Death Dis* 11(9): 818.

Z

Zacca, E. R., L. I. Onofrio, C. D. V. Acosta, P. V. Ferrero, S. M. Alonso, M. C. Ramello, E. Mussano, L. Onetti, I. I. Cadile, M. I. Stancich, M. C. Taboada Bonfanti, C. L. Montes, E. V. Acosta Rodríguez and A. Gruppi (2018). "PD-L1+ Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment." *Frontiers in Immunology* 9.

Zhang, H. P., Y. Wu, J. Liu, J. Jiang, X. R. Geng, G. Yang, L. Mo, Z. Q. Liu, Z. G. Liu and P. C. Yang (2013). "TSP1-producing B cells show immune regulatory property and suppress allergy-related mucosal inflammation." *Sci Rep* 3: 3345.

Zhang, M., X. Zheng, J. Zhang, Y. Zhu, X. Zhu, H. Liu, M. Zeng, M. W. Graner, B. Zhou and X. Chen (2012). "CD19(+) CD1d(+) CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress LTh17 responses." *Cell Immunol* 274(1-2): 89-97.

Zhang, Z., J. Tong, X. Tang, J. Juan, B. Cao, R. Hurren, G. Chen, P. Taylor, X. Xu, C. X. Shi, J. Du, J. Hou, G. Wang, D. Wu, A. K. Stewart, A. D. Schimmer, M. F. Moran and X. Mao (2016). "The ubiquitin ligase HERC4 mediates c-Maf ubiquitination and delays the growth of multiple myeloma xenografts in nude mice." *Blood* 127(13): 1676-1686.

Zhao, M., J. Gu and Z. Wang (2020). "B cells in Crohn's patients presented reduced IL-35 expression capacity." *Mol Immunol* 118: 124-131.

Zhao, Q., Y. Xie, Y. Zheng, S. Jiang, W. Liu, W. Mu, Z. Liu, Y. Zhao, Y. Xue and J. Ren (2014). "GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs." *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue): W325-330.

Zhou, B., F. Mei, C. Wu, H. Xu, Z. Liu and Y. Cui (2021). "Protective effect of trichostatin A on CD19⁺ CD5⁺ CD1d^{high} regulatory B cells in heart transplantation." *Mol Med Rep* 23(5): 339.

Zumaquero, E., S. L. Stone, C. D. Scharer, S. A. Jenks, A. Nellore, B. Mousseau, A. Rosal-Vela, D. Botta, J. E. Bradley, W. Wojciechowski, T. Ptacek, M. I. Danila, J. C. Edberg, S. L. Bridges, Jr., R. P. Kimberly, W. W. Chatham, T. R. Schoeb, A. F. Rosenberg, J. M. Boss, I. Sanz and F. E. Lund (2019). "IFN γ induces epigenetic programming of human T-bet(hi) B cells and promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation." *Elife* 8.

Titre : Exploration du facteur de transcription MAF dans les lymphocytes B humains

Mots clés : MAF, lymphocyte B, différenciation, lymphocytes B régulateurs, interleukine-10, plasmablaste

Résumé : Les lymphocytes B aux fonctions régulatrices (LBreg) sont décrits pour leur grande hétérogénéité des phénotypes et des mécanismes immunosuppresseurs qui les rend difficiles à identifier. Dans les travaux précédents du laboratoire, le facteur de transcription (FT) MAF a été identifié pour sa surexpression dans les LBreg comparés aux LB pro-inflammatoires. MAF est un FT décrit pour son implication dans la différenciation et son induction d'IL-10 dans les T et macrophages. L'objectif de ce travail était donc de mieux définir les variants et isoformes de MAF, d'explorer son expression dans les B et de comprendre les conditions relatives à son expression. A partir des bases de données et des outils d'analyses *in silico*, nous avons proposé une meilleure description du FT MAF et des modifications post-traductionnelles impliquant son activité. Cela nous a permis de mettre en place une validation des outils pour la détection de MAF afin de procéder à son étude dans les LB primaires.

A partir de B d'amygdales et du sang périphérique, nous avons mis en évidence que MAF est faiblement exprimé à l'état basal et que son expression est associée aux stades les plus différenciés: LB mémoires non commutés, des centres germinatifs et les plasmablastes (PB) de l'amygdale. Dans le sang, son expression est restreinte aux PB. De la même façon, nous avons mis en exergue que l'expression d'IL-10 est associée au stade PB à l'état basal, et correspond au stade qui exprime le plus MAF. Par la suite, nous avons développé un modèle *in vitro* de production d'IL-10 par les LB, dans lequel MAF est induit de façon synergique à l'IL-10. Enfin, les analyses *in vitro* ont permis de montrer que les LB IL-10⁺ ont un enrichissement de l'expression de MAF comparés aux autres LB, mais que l'expression de MAF n'était pas forcément associée à une production d'IL-10. Ces résultats suggèrent que MAF pourrait être impliqué dans la différenciation terminale des LB et qu'il pourrait coopérer avec d'autres FT pour induire leur production d'IL-10.

Title : Exploration of the transcription factor MAF in human B cells

Keywords : MAF, B cells, differentiation, regulatory B cells, interleukine-10, plasmablast

Abstract : B lymphocytes with regulatory functions (LBreg) are described for their heterogeneity of phenotypes and immunosuppressive mechanisms which makes them difficult to identify. In a previous work from the lab, the transcription factor (TF) MAF was identified for its overexpression in LBregs compared to pro-inflammatory B. MAF is a TF with a basic leucine zipper domain described for its involvement in differentiation and its induction of IL-10 in T cells and macrophages. The objective of this work was to better define the variants and isoforms of MAF, to explore its expression in B cells and to understand the conditions relating to its expression. From databases and *in silico* analysis tools, we have proposed a better description of FT MAF and post-translational modifications involving its activity. This allowed us to set up a validation of tools for the detection of MAF in order to proceed with its study in primary B. From B of tonsils and peripheral blood, we

have shown that MAF is weakly expressed at steady state and that its expression in tonsils is associated with the most differentiated B cell stages including unswitched memory B cells, germinal center B cells and plasmablasts (PB). In the blood, its expression is restricted to PB. In the same way, we have highlighted that the expression of IL-10 is associated with the PB stage in the basal state, and corresponds to the stage which expresses the most MAF. Subsequently, we developed an *in vitro* model of IL-10 production by B cells, in which MAF is synergistically induced with IL-10. Finally, *in vitro* analysis showed that the B IL-10⁺ have an enrichment of MAF compared to the other B, but that the expression of MAF was not necessarily associated with a production of IL-10. These results suggest that MAF could be involved in the terminal differentiation of B and that it could cooperate with other TFs to induce their production of IL-10.