



Les plasmocytes et leur niche : Étude de la génération de plasmocytes humains in vitro

Thèse

Guillaume Bonnaure

Doctorat en biochimie

Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Guillaume Bonnaure, 2016

Les plasmocytes et leur niche : Étude de la génération de plasmocytes humains in vitro

Thèse

Guillaume Bonnaure

Sous la direction de :

André Darveau, directeur de recherche
Sonia Néron, codirectrice de recherche

Résumé

Chez l'humain, les lymphocytes B mémoires IgG⁺ et IgA⁺ sont des cellules clés de l'immunité humorale. Ces cellules mémoires sont maintenues à long-terme dans notre organisme. Elles représentent une défense rapide et efficace contre toutes les infections que nous avons déjà vaincues pendant notre vie. Ces cellules mémoires qui rencontrent à nouveau leur antigène se différencient rapidement en plasmocytes à courte vie, et permettent la sécrétion massive d'immunoglobuline (Ig). La contrepartie mémoire de ces cellules sont les plasmocytes à longue vie qui sont présents dans les niches de la moelle osseuse et y sécrètent en permanence des anticorps protecteurs qui circulent dans le sang. Ces cellules sécrétrices peuvent avoir une durée de vie allant de dizaines d'années à la vie entière de l'individu. Les patients qui reçoivent des traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie sont privés de ces cellules mémoires détruites par ces traitements au même titre que les cellules cancéreuses. Ces patients deviennent vulnérables aux infections et leur survie dépend de la régénération rapide de leur système hématopoïétique. Notre équipe a déjà mis au point une méthode pour préparer de grandes quantités des cellules mémoires capables de sécréter des IgG et des IgA. Les présents travaux visent à générer des plasmocytes fonctionnels et capables de survivre à long terme in vitro.

La stratégie expérimentale visait à établir des conditions permettant de se rapprocher de l'environnement de la moelle osseuse. Dans un premier temps, nous avons étudié les paramètres permettant la différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes. Étant donné l'importance du potentiel redox dans l'environnement de la moelle osseuse, nous avons d'abord tenté d'en contrôler l'impact avec un antioxydant, le N-acétylcystéine (NAC). Nos résultats ont démontré que le NAC avait un effet significatif et diminuait la phosphorylation de la protéine STAT3 en raison d'une inhibition des kinases JAK2 et JAK3. Étonnamment, cet antioxydant retardait la différenciation de nos lymphocytes B qui

étaient stimulés avec une forte interaction CD40-CD154. Par la suite, la comparaison des interactions CD40-CD154 et CD27-CD70 a permis de conclure qu'il était essentiel de réduire à son minimum l'interaction CD40-CD154 et qu'il fallait ajouter les cytokines IL-6 et IL-10. Les cellules CD31⁺CD38⁺CD138⁺ générées présentaient un phénotype similaire à celui des plasmocytes de la moelle osseuse. Malheureusement la fréquence de ces cellules était faible et leur viabilité insuffisante. Afin d'augmenter la survie de ces cellules le dernier volet de nos travaux visait à se rapprocher des niches de la moelle osseuse. Notre but a été atteint en ajoutant des cellules mésenchymateuses issues de la moelle osseuse en présence de 8% de dioxygène (O₂). Les cellules CD31⁺CD38⁺CD138⁺ générées ont une excellente viabilité et représentent plus de 50% des cellules totales en culture. De plus, le modèle de culture est maintenant établi dans un milieu exempt de sérum et de protéines animales. Dans l'ensemble, nos résultats permettent de proposer la production ex vivo de plasmocytes autologues avec une perspective thérapeutique pour réduire les risques d'infections des patients devenues immunodéficientes, suite à un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie.

Abstract

In Humans, IgG⁺ and IgA⁺ memory B lymphocytes are key cells for the maintenance of humoral immunity. Memory B lymphocytes are long-lived cells maintained as a memory repertoire throughout our lives. Memory B lymphocytes can establish an efficient and rapid defense against previously encountered infections. These cells rapidly differentiate into short-lived plasma cells secreting high levels of antibodies. Their counterpart, the long-lived plasma cells are the memory populations present in the bone marrow microenvironment. The long-lived plasma cells release protective antibodies into the peripheral blood, maintaining a permanent immune protection. Plasma cells can remain active for years or even for the entire life of an individual. Conversely, patients treated for cancer receive massive doses of chemotherapy or radiotherapy, which are detrimental for immune memory cells as well as cancerous cells. Those patients become highly vulnerable to infectious diseases and their survival depends on the regeneration of their hematopoietic system. Our research group has established an in vitro model enabling to prepare large quantities of IgG and IgA-secreting memory B lymphocytes. The present study aims to further investigate in vitro conditions to generate plasma cells with high survival capacity and able to secrete antibodies.

Our experimental strategy intends to establish culture conditions similar to the bone marrow environment. The first step was to study parameters involved into differentiation of memory B lymphocytes into plasma cells. The importance of the redox balance in the bone marrow environment led us to measure the impact of N-acetyl cysteine (NAC), an antioxidant. Our results showed that NAC decreased STAT3 activation by inhibiting the phosphorylation of two kinases namely JAK2 and JAK3. Surprisingly, the addition of NAC had a negative effect on the differentiation of memory B lymphocytes in our culture conditions using a high level of CD40 stimulation. By comparing the levels of CD40-CD154 and CD27-CD70 interactions, we then confirmed that a low level of CD40-CD154 interaction was

essential. We also established that addition of IL-6 and IL-10 was better to favor plasma cell generation. The cells obtained in this model were CD31⁺CD38⁺CD138⁺, showing a phenotype close to that of plasma cells found in the bone marrow. Unfortunately, those cells were produced in low frequency and were characterized by a low viability. To increase the survival of these in vitro generated plasma cells, we tried to generate culture conditions that resemble the bone marrow environment. We have achieved this by adding mesenchymal stem cells from bone marrow and maintained the cells at a low O₂ level (8%). Cells CD31⁺CD38⁺CD138⁺ obtained at the end of the culture periods showed a high viability, and corresponded to more than 50% of total cultured cells. As expected, those cells were non-proliferating and able to secrete IgG. Furthermore, this in vitro culture model was established with a serum free media. In conclusion, our findings pave the way for the ex vivo production of autologous plasma cell for therapeutic purposes in order to reduce the risks of infection of immune-deficient patients.

Table des matières

| | |
|--|--------------|
| Résumé | iii |
| Abstract..... | v |
| Table des matières | vii |
| Liste des tableaux | xi |
| Liste des figures | xii |
| Liste des abréviations..... | xiv |
| Remerciements..... | xviii |
| Avant-propos | xx |
| Introduction | 1 |
| 1. Survol de la réponse immunitaire | 1 |
| 2. La découverte des lymphocytes B | 2 |
| 3. Activation des lymphocytes B | 3 |
| 3.1 Réponse T indépendante..... | 3 |
| 3.1.1 Activation par un antigène T indépendant de type 1 | 3 |
| 3.1.2 Activation par un antigène T indépendant de type 2..... | 4 |
| 4. La réponse immunitaire adaptative..... | 4 |
| 4.1 Les organes lymphoïdes secondaires..... | 4 |
| 4.2 Interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T..... | 6 |
| 4.2.1 Interaction CD40-CD154..... | 9 |
| 4.2.2 Signalisation intracellulaire reliée à CD40..... | 9 |
| 4.2.3 Étude dans un environnement in vitro | 11 |
| 4.3 Activation de la voie JAK-STAT | 12 |
| 5. Le devenir des lymphocytes B activés | 13 |
| 5.1 La réponse extra folliculaire | 14 |
| 5.1.1 Lymphocytes B et plasmocytes dans un contexte Tindépendant | 16 |
| 5.1.2 Réponse en contexte T-dépendant | 16 |
| 5.1.2.1 Lymphocytes B mémoires | 17 |
| 5.1.2.2 Plasmocytes | 17 |
| 5.2 Centre germinatif | 18 |
| 5.2.1 Structure des centres germinatifs : Formation et composition | 18 |
| 5.2.2 Remaniement moléculaire..... | 22 |
| 5.2.3 Les étapes médiées par la fine régulation des gènes..... | 22 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.2.4 | Apparition du caractère plasmocytaire | 24 |
| 5.2.5 | Remaniement génétique touchant les chaînes d'Ig | 26 |
| 5.2.5.1 | Hypermutation somatique..... | 26 |
| 5.2.5.2 | Commutation isotypique | 26 |
| 5.3 | Devenir des lymphocytes B à la suite de la réaction du centre germinatif | 27 |
| 6. | La réponse secondaire | 28 |
| 6.1 | Génération des lymphocytes B mémoires..... | 28 |
| 6.1.1 | Ontologie | 29 |
| 6.1.2 | Caractéristique phénotypique | 31 |
| 6.1.3 | Fonction et sous-population de B mémoires | 31 |
| 6.2 | Les plasmocytes | 33 |
| 6.2.1 | Les plasmablastes..... | 34 |
| 6.2.1.1 | Caractérisation phénotypique | 34 |
| 6.2.1.2 | Capacité de migration | 36 |
| 6.2.2 | Plasmocyte à courte vie | 36 |
| 6.2.2.1 | Génération et niches des plasmocytes à courte vie | 37 |
| 6.2.2.2 | Espérance de vie et réponse aux stress | 38 |
| 6.2.3 | Les plasmocytes à longue vie..... | 38 |
| 6.2.3.1 | Mécanisme favorisant la survie des plasmocytes | 39 |
| 6.2.3.2 | Caractéristique phénotypique | 40 |
| 6.2.4 | Génération in vitro | 41 |
| 7. | Environnement de la moelle osseuse | 41 |
| 7.1 | Niche..... | 42 |
| 7.2 | Composition du microenvironnement..... | 43 |
| 7.2.1 | Les cellules stromales..... | 43 |
| 7.2.2 | Les éosinophiles..... | 44 |
| 7.3 | L'oxygène in vivo et in vitro | 45 |
| 8. | Stress oxydatif et physiologie cellulaire | 46 |
| 8.1 | Accommodation métabolique..... | 47 |
| 8.2 | Répercussions métaboliques | 48 |
| 8.2.1 | Origine des espèces réactives à l'oxygène (ROS) | 49 |
| 8.2.2 | Rôle des ROS..... | 52 |
| 8.2.3 | Régulation des ROS..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 8.3 Relation ROS et lymphocytes B..... | 55 |
| 9. Culture in vitro des lymphocytes B..... | 56 |
| 10. Utilisation des lymphocytes B en thérapie | 57 |
| 10.1 Les lymphocytes B régulateurs..... | 57 |
| 10.2 Les lymphocytes B comme cellules présentatrices d'antigènes | 58 |
| 10.3 Génération d'Ig monoclonal humanisé..... | 58 |
| Problématique et hypothèse | 59 |
| Objectifs | 61 |
| Chapitre I – Le N-acétyl cystéine régule la phosphorylation des protéines JAK à la suite d'une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires humains..... | 64 |
| Résumé | 65 |
| Abstract..... | 67 |
| Introduction | 68 |
| Materials and methods..... | 71 |
| Results..... | 76 |
| Discussion | 81 |
| Acknowledgment | 85 |
| Figures legends | 86 |
| Figures..... | 90 |
| Chapitre II – Les plasmocytes CD38^{Haut}CD138⁺ humains peuvent être générés in vitro à la suite d'une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires activés | 96 |
| Résumé | 97 |
| Abstract..... | 99 |
| Introduction | 100 |
| Materials and methods..... | 103 |
| Results..... | 107 |
| Discussion | 114 |
| Acknowledgment | 117 |
| Figures legends | 118 |
| Table..... | 123 |
| Figures..... | 124 |
| Supplemental Figures | 130 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre III – Les cellules souches mésenchymateuses favorisent la différenciation des lymphocytes B mémoires humains en plasmocytes dans un milieu sans sérum..... | 132 |
| Résumé | 133 |
| Abstract..... | 135 |
| Introduction | 136 |
| Materials and methods..... | 139 |
| Results..... | 145 |
| Discussion | 155 |
| Conflict of interest | 160 |
| Acknowledgements..... | 160 |
| Figures legends | 161 |
| Table..... | 166 |
| Figures..... | 167 |
| Supplemental Figures | 174 |
| Discussion | 180 |
| 1. Effets du NAC sur la culture de lymphocytes B mémoires activés..... | 181 |
| 1.1 Le potentiel redox et son implication sur la voie JAK-STAT..... | 181 |
| 1.2 Maintien d'un environnement proche des centres germinatifs par le NAC | 182 |
| 2. Génération de plasmocytes in vitro à partir de lymphocytes B mémoires | 184 |
| 2.1 Différence associée à l'interaction CD27 et CD40 | 184 |
| 2.2 Hétérogénéité générée à la suite de la phase de différenciation | 185 |
| 2.3 Caractéristique et identification des populations générées | 186 |
| 2.4 Comparaison de notre modèle avec un environnement de moelle osseuse | 187 |
| 3. Ouverture vers la thérapie cellulaire | 190 |
| 3.1 Impact du milieu de culture sur le devenir des lymphocytes B..... | 190 |
| 3.2 Prédiction et rendement du système de culture | 191 |
| 3.3 Migration et résidence vers la moelle osseuse | 193 |
| Conclusion..... | 195 |
| Perspectives | 197 |
| Annexe | 199 |
| Bibliographie | 200 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Les classes de lymphocytes B mémoires chez l'homme, organisées selon leurs isotypes | 29 |
| Tableau 2 : Les principaux marqueurs phénotypiques connus pour les lymphocytes B mémoires, les plasmablastes et les plasmocytes..... | 35 |
| Table 2.1 : CD31 ⁺ and CD39 ⁺ cells frequencies within plasma cells in vitro and in vivo | 123 |
| Table 3.1 : Expression of CD31, CD38, CD39 and CD138 among plasma cells population on day 20 | 166 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Représentation schématique d'un ganglion lymphatique (A) et de la rate (B). | 6 |
| Figure 2 : Les lymphocytes T_H2 et les lymphocytes B lors de la présentation de l'Ag dans le complexe CMHII-peptide. | 8 |
| Figure 3 : Interaction entre un lymphocyte T folliculaire et un lymphocyte B au niveau d'un centre germinatif. | 10 |
| Figure 4 : Représentation schématique de la voie JAK-STAT, à la suite d'une activation d'un récepteur de cytokine. | 13 |
| Figure 5 : Étapes de différenciation des lymphocytes B naïfs du stade folliculaire au stade plasmocyte. | 15 |
| Figure 6 : Génération de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes à la suite d'une stimulation T dépendante. | 21 |
| Figure 7 : Remaniement moléculaire favorisant la formation de plasmocytes à partir de lymphocytes B issus des centres germinatifs. | 24 |
| Figure 8 : Représentation schématique de la niche de survie des plasmocytes dans la moelle osseuse. | 43 |
| Figure 9 : Niveaux d'oxygène dans l'organisme et leurs répercussions sur les éléments régulateurs du stress oxydatif encouru par la cellule. | 47 |
| Figure 10 : Structure électronique des espèces réactive à l'oxygène les plus couramment observées dans l'organisme. | 49 |
| Figure 11 : Site de formation des ROS à travers la chaîne respiratoire. | 51 |
| Figure 12 : Oxydation d'un résidu cystéine situé à l'intérieur du site actif d'une phosphatase en présence de ROS. | 53 |
| Figure 1.1 : N-acetyl cysteine inhibits differentiation of switched-memory B cells | 90 |
| Figure 1.2 : Effect of N-Acetyl cysteine on STAT3 in human activated B cells | 91 |
| Figure 1.3 : N-acetyl cysteine as a potential inhibitor of members of the JAK-STAT pathway | 92 |
| Figure 1.4 : Quick response of JAK2 after N-acetyl cysteine treatment | 93 |
| Figure 1.5 : Delayed effect of N-acetyl cysteine on SOCS1 and SOCS3 | 94 |
| Figure 1.6 : Total S-glutathionylated protein levels after N-acetyl cysteine treatment | 95 |
| Figure 2.1 : In vitro plasma cell generation and cytokine microenvironment | 124 |
| Figure 2.2 : Proliferation and viability following low CD70 and CD154 interaction. | 125 |
| Figure 2.3 : Generation of plasma cells from switched-memory B lymphocytes. | 126 |
| Figure 2.4 : In vitro generated plasma cells secrete high level of IgA and IgG ... | 127 |

| | |
|---|-----|
| Figure 2.5 : High frequency of CD39 ⁺ cells among the expanded B lymphocyte population..... | 128 |
| Figure 2.6 : CD31 as a in vivo and in vitro generated plasma cell marker..... | 129 |
| Figure 2.S1 : Experimental model | 130 |
| Figure 2.S2 : Secreting patterns of bone marrow PC compared to in vitro generated PC | 131 |
| Figure 3.1 : In vitro expansion of switched B lymphocytes in medium containing FBS or in serum free medium..... | 167 |
| Figure 3.2 : Differentiation profile of switched memory B cells under atmospheric and physiologic O ₂ in BPFM medium. | 168 |
| Figure 3.3 : Effects of eosinophil and mesenchymal stem cells on the differentiation of switched memory B lymphocytes..... | 169 |
| Figure 3.4 : Mesenchymal stem cells influence plasma cells formation with or without cellular contact. | 170 |
| Figure 3.5 : Two subsets of differentiated B lymphocytes can be distinguished according to their size and granularity..... | 171 |
| Figure 3.6 : Two-dimensional analysis of differentiated A and B populations..... | 172 |
| Figure 3.7 : Cytokines and immunoglobulins secretions | 173 |
| Figure 3.S1 : Dividing profile measured by CellVue analysis | 174 |
| Figure 3.S2 : Summary of SPADE analyses for 5 independent experiments following the differentiation phase | 175 |
| Figure 13 : Modèle proposé de l'effet du NAC sur les voies de signalisation activées par les récepteurs à l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et le CD40, ainsi que leurs répercussions sur le devenir de la cellule..... | 183 |
| Figure 14 : Les principaux acteurs menant à la génération de plasmocytes in vivo : des centres germinatifs vers une niche de la moelle osseuse..... | 189 |
| Figure 15 : Modèle thérapeutique proposée pour la greffe de plasmocytes autologues générés ex vivo pour des patients recevant une greffe de cellules souches à la suite d'un traitement de chimiothérapie..... | 192 |
| Figure S1 : Effet du NAC sur l'expression des récepteurs CD25, CD124 et CD210 exprimés à la surface des lymphocytes B mémoires activés..... | 199 |

Liste des abréviations

| | |
|---------|--|
| Ac | Anticorps |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| Ag | Antigène |
| AID | Activation induced cytidine deaminase |
| AMP | Adénosine monophosphate |
| AP1 | Protéine activée 1 |
| APC | Cellules présentatrices d'antigène |
| APRIL | A proliferation inducing ligand |
| Arg | Arginine |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BAFF | B cell activating factor |
| Bcl-6 | B-cell lymphoma 6 protein |
| BCR | B cell receptor |
| BLIMP-1 | Protéine 1 inductrice de la maturation des lymphocytes B |
| Breg | Lymphocyte B régulateur |
| Btk | Bruton's tyrosine kinase |
| CCL | Ligand des chimiokines au profil C-C |
| CD | Cluster de différenciation |
| CDK | Cycline dépendant de kinase |
| CDR | Région déterminante de la complémentarité |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CpG | Motif cytosine-phosphate-guanine |
| CXCL | Chimiokine de motif C-X-C |
| CXCR | Récepteur des motifs C-X-C |
| Cys | Cystéine |
| Cyt c | Cytochrome C oxydase |
| dbcAMP | Dibutyryl cyclique AMP |
| EBI2 | Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2 |
| EpCAM | Epithelial cell adhesion molecule |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinases |
| EPO | Érythropoïétine |
| Fab | Fragment de liaison à l'antigène |
| FAD | Flavine adénine dinucléotide |
| Fc | Fragment constant |
| FDC | Cellules folliculaires dendritiques |
| FMN | Flavine mononucléotide |
| FNDC3B | Fibronectin type III domain containing 3B |
| GAS | Gamma associated sequences |
| GC | Germinal center |
| H1N1 | Hémagglutinine 1 Neuraminidase 1 |
| HEV | Veinule à endothélium épais |

| | |
|-----------------|---|
| HIF | Hypoxia inducible factor |
| HRE | Élément de réponse au HIF |
| HSM | Hypermutation somatique |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule 1 |
| ICOS | Inducible T-cell costimulator |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL | Interleukine |
| IRF-4 | Interferon regulatory factor 4 |
| JAK | Janus kinases |
| JNK | c-Jun N-terminal kinases |
| LFA-1 | Leukocyte function associated antigen 1 |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MALT | Tissu lymphoïde associé aux muqueuses |
| MBP | Major basic protein |
| mmHg | Millimètre de mercure |
| MO | Moelle osseuse |
| NAC | N-acétyl cystéine |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NK | Natural killer |
| NOS | Espèces réactive à l'azote |
| NOX/DUOX | NADPH oxydase |
| NrF2 | Nuclear factor erythroïde derived factor 2 |
| OLS | Organe lymphoïde secondaire |
| PALS | Gaine lymphoïde périartériolaire |
| PD1 | Programmed death protein 1 |
| PDK1 | Pyruvate déshydrogénase kinase |
| PDL-1 | Programmed death ligand |
| PMA | Phorbol myristate |
| PAMP | Motif moléculaire associé à un pathogène |
| PAX5 | Paired box protein 5 |
| pH | Potentiel hydrogène |
| PHD | Prolyl hydroxylase |
| pO ₂ | Pression partielle de O ₂ |
| ppm | Partie par million |
| Prx : | Péroxyrédoxine |
| pVHL | Suppresseur de tumeur de Von Hippel-Lindau |
| ROS | Reactive oxygen species |
| S1P1 | Récepteur 1 des sphingosines 1 phosphate |
| SDF-1 | Stromal cell derivated factor 1 |
| SHP-1 | Phosphatase d'homologie à la surface Xrc de type 1 |
| SOCS | Suppressor of cytokine signaling |
| STAT | Signal transducteur et activateur de la transcription |
| TAC1 | Transmembrane activator and CAML interactor |
| TCR | T cell receptor |

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| TD | Dépendant des lymphocytes T |
| TGF- β | Transforming growth factor β |
| T _H | Lymphocyte T helper |
| TI | Indépendant des lymphocytes T |
| TLR | Toll like receptor |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TRAF | Facteur associé aux récepteurs du TNF |
| UNG | Uracyle adénylate glycosilase |
| UV | Ultra violet |
| UPR | Unfolded protein response |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule 1 |
| VLA-4 | Very late antigen 4 |
| XBP-1 | X-box binding protein 1 |

« L'art n'est pas de constater, mais de le mûrir et l'appliquer »
Guillaume Bonnaure

Remerciements

Ce doctorat m'a donné la chance de rencontrer des gens extraordinaires dans un environnement d'autant plus motivant. C'est pourquoi je souhaite consacrer ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours.

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Sonia Néron pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et ouvert au monde de la recherche dans un milieu industriel. Avoir eu la chance de travailler avec quelqu'un d'aussi passionné et structuré a été pour moi, une véritable chance. Ces années m'ont permis de réaliser à quel point la recherche de qualité requière rigueur et dévouement.

Je tiens également à remercier mon codirecteur le Dr André Darveau pour m'avoir permis d'entreprendre ces études doctorales et finalement pour les conseils promulgués au cours de mes différents comités.

Ensuite, je souhaite remercier le Dr Louis Thibault pour ses questions ô combien pertinentes et ses précieuses suggestions émises tout au long de ce doctorat. Je remercie de même le Dre Caroline Gilbert pour ses critiques constructives amenées lors de mes comités d'évaluation. Enfin, je remercie le Dre Sophie Hillion ainsi que le Dre Fatiha Chandad pour leurs disponibilités et leurs intérêts quant à la correction de mon document final.

Dans la continuité, je souhaite aussi adresser mes remerciements aux membres anciens et actuels, de l'équipe de Dre Néron, que j'ai eu la chance de côtoyer. Tout d'abord, je remercie Annie Roy, pour sa patience et ces nombreux conseils lors de ma formation en culture cellulaire. Carl Simard pour sa bonne humeur, son franc parlé et ses connaissances sans limite dans le domaine de la cytométrie en flux. Marc Cloutier pour sa sérénité, ses précieux conseils et son aide inestimable lors de la rédaction d'articles scientifiques. Je remercie également tous les étudiants que j'ai eu le privilège de croiser au cours de ce 3^e cycle, à savoir Rayelle Itoua-Maiga, Jennifer Lemieux, Catherine Gervais St-Amour, Christine

Jobin et Marie-Ève Couture. Je remercie également Jean-François Leblanc pour la relecture de cette thèse et tous ses précieux commentaires.

J'aimerais ajouter à cet avant-propos, mes remerciements à l'équipe des auxiliaires de laboratoire pour leur efficacité et particulièrement à Anne-Marie Lemire, qui, de par sa gentillesse et sa bonne humeur, a souvent rendu mes journées de laboratoire plus agréables.

Enfin, je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à ma famille, qui a su me soutenir et croire en moi, tout au long de ces études. Sans eux, mon parcours aux cycles supérieurs au Québec n'aurait très certainement pas été possible.

Je remercie également ma conjointe Véronique Morin, qui m'a soutenu et enduré tout au long de ce doctorat. Avoir à mes côtés une femme aussi formidable, m'a permis de surmonter les moments difficiles et donner le meilleur de moi pour la réussite de ce projet.

Finalement, je remercie Héma-Québec d'une part pour la bourse qui m'a été octroyé et d'autre part, pour m'avoir permis de poursuivre mes recherches dans un environnement stimulant avec des gens motivés.

Avant-propos

Chapitre I : Le N-acétylcystéine régule la phosphorylation des protéines JAK à la suite d'une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires humains

Auteurs : Guillaume Bonnaure et Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure a élaboré et réalisé toutes les expériences présentées dans cet article. L'intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure. Finalement, la rédaction de l'article a été effectuée par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron, qui a supervisé l'ensemble de ces travaux.

Article publié dans : Molecular Immunology 62 (2014) 209-218.

Chapitre II : Les plasmocytes CD38^{Haut}CD138⁺ humains peuvent être générés in vitro à la suite d'une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires activés

Auteurs : Guillaume Bonnaure, Rayelle Itoua-Maïga, Josiane Tremblay-Rochette et Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure et Rayelle Itoua-Maïga ont élaboré et réalisé les expériences présentées dans cet article. Josianne Tremblay-Rochette a participé à la réalisation de ces manipulations. L'intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure et Rayelle Itoua-Maïga. Finalement, la rédaction de l'article a été effectuée par Guillaume Bonnaure, Rayelle Itoua-Maïga et Sonia Néron, qui a supervisé l'ensemble de ces travaux.

Article publié dans : Journal of Immunology Research 2014: 635108.

Chapitre III : Bone marrow mesenchymal stem cells enhance the differentiation of human switched memory B lymphocytes into plasma cells in serum-free medium

Auteurs : Guillaume Bonnaure, Catherine Gervais Saint-Amour et Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure a élaboré et réalisé les expériences présentées dans cet article. Catherine Gervais Saint-Amour a participé à la réalisation de ces manipulations. L'intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron. Finalement, la rédaction de l'article a été effectuée par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron, qui a supervisé l'ensemble de ces travaux.

Article révisé soumis à Journal of Immunological Research (21-07-2016)

Introduction

1. Survol de la réponse immunitaire

Chez l'humain, la défense contre les infections est prise en charge par le système immunitaire. Cette ligne de défense que représente l'immunité est organisée en deux segments, soit l'immunité innée ou l'immunité adaptative selon la complexité de la menace à l'intégrité de l'organisme. L'épiderme, les muqueuses et même la microflore présente dans ces muqueuses sont des barrières physiques retardant ou bloquant l'entrée des pathogènes [1, 2]. De plus, les pathogènes qui réussissent à passer ces premiers obstacles seront détectés rapidement par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée en raison de sa grande polyvalence et de son mode d'action immédiat.

Les acteurs de l'immunité innée sont les cellules NK (*natural killer*) et les cellules phagocytaires qui comprennent les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Les NK sont capables de détecter qu'une cellule est anormale, et peuvent détruire les cellules infectées ou les cellules cancéreuses [3]. La réponse innée est souvent reliée à la capacité des cellules à réagir à la présence de molécules communes à plusieurs agents infectieux que sont les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) [4, 5]. Dans certains cas, des sous-populations de lymphocytes B et de lymphocytes T peuvent aussi participer au signalement d'une infection par la sécrétion de cytokines ou d'IgM polyréactifs [6-10]. Ces IgM se lient à des motifs lipidiques, glucidiques, protéiques ou des séquences d'acides nucléiques présent sur les bactéries ou les virus [8]. Le but étant de neutraliser les agents infectieux et de les éliminer de l'organisme.

Les infections qui ne sont pas contrôlées par la réponse innée peuvent activer dans l'organisme une réponse immunitaire plus spécifique et plus puissante, soit l'immunité adaptative [11, 12]. Brièvement, cette immunité est médiée par deux acteurs centraux, soient les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces lymphocytes sont caractérisés par l'expression de récepteurs de surface qui sont spécifiques

aux antigènes présents sur les agents infectieux. Dans leur rôle les lymphocytes sont aussi aidés par des cellules ayant déjà participé à la réponse innée, comme les cellules dendritiques et les macrophages. Les lymphocytes T sont activés à la suite de la liaison avec un élément peptidique provenant de l'antigène. Cette reconnaissance de l'antigène est réalisée par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) exprimé à la surface de cellules présentatrices d'antigène (Ag). Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité dite humorale, qui consiste en la production d'immunoglobulines, ou d'anticorps capables de neutraliser les Ags [13]. Les lymphocytes B et les lymphocytes T sont partenaires pour le maintien de l'intégrité de l'organisme et les mécanismes complexes qui régissent leurs actions sont encore aujourd'hui source de découvertes et de questionnements.

2. La découverte des lymphocytes B

En 1921, les travaux d'Alexander Glenny [14], portant sur les adjuvants, ont mis au jour la notion de reconnaissance spécifique d'un pathogène lors d'un deuxième contact. Il s'agit de la première description d'une réponse de type primaire et secondaire à caractère humoral. Presque 20 années plus tard, le lien entre cette réponse et une cellule a été observée par Chase et Landsteiner en 1940 par le transfert du potentiel immun à un cochon d'Inde, à partir de cellules d'un animal résistant [15]. C'était la première description de la réponse immunitaire de type humoral à médiation cellulaire. Il a fallu attendre jusqu'en 1965, pour que la synthèse d'anticorps soit attribuée aux lymphocytes B [16]. Ce fut l'observation de la diminution de la quantité d'anticorps suivant l'ablation de la bourse de Fabricius chez le poulet, qui a permis de différencier ces cellules de celles présentes dans le thymus, menant ainsi à la dénomination des lymphocytes B et T [17]. La découverte des isotopes d'immunoglobulines (Ig) [18], fut suivie par l'observation de l'évolution du profil de sécrétion des lymphocytes B, allant d'IgM à IgG, par des études sur les embryons de poulet [19, 20]. Ces observations menèrent à l'idée qu'un lymphocyte B pouvait entamer un processus de maturation des Ig en

réponse à un élément antigénique. C'est l'apparition des techniques d'analyses moléculaires qui a permis de confirmer cette hypothèse, menant à la découverte des processus de réarrangements des gènes et des mutations somatiques affectant les gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig) [21]. Par la suite, l'analyse de l'agencement chromosomique des gènes d'Ig a permis d'établir la chronologie des isotypes d'Ig synthétisés par la cellule [22, 23]. L'analogie entre la fonction des Ig sécrétées et le niveau d'activation des lymphocytes B en réponse à un antigène a été révélée plus tard [24]. Subséquemment, la détection de variants d'épissage de fragments de messagers d'acide ribonucléique (ARNm) codant pour des chaînes lourdes et légères d'Ig a permis de montrer qu'elles étaient exprimées à la surface de la cellule et formaient les récepteurs des lymphocytes B (BCR) [25]. Finalement, la découverte des protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$, sous-unités du BCR, a par la suite permis d'établir l'association entre l'activation de la cellule B et la stimulation du BCR suivant sa liaison avec un antigène [26].

3. Activation des lymphocytes B

3.1 Réponse T indépendante

L'initiation d'une réponse spécifique issue des lymphocytes B varie selon la nature de l'antigène et se distingue selon l'implication ou non des lymphocytes T. Les lymphocytes B peuvent monter une réponse de type T indépendante (TI) [27] de type 1 ou de type 2 [28] faisant partie de la réponse innée.

3.1.1 Activation par un antigène T indépendant de type 1

Les antigènes de type 1 T indépendant sont des mitogènes [29] de par leur capacité à engendrer une activation de type polyclonale au sein des lymphocytes B. Leurs structures sont généralement simples et associées à des éléments communs à plusieurs bactéries, tels les lipopolysaccharides (LPS) ou les fragments d'ADN non méthylés (CpG). Les récepteurs de ces antigènes sont entre

autres les TLR (*Toll like receptor*), qui peuvent dans certains cas être associés à une activation en parallèle des BCR (*B-cell receptor*) [30].

3.1.2 Activation par un antigène T indépendant de type 2

Les antigènes T indépendants de type 2 (TI-2) sont composés de motifs répétitifs, tels des polysaccharides, ou des fragments capsulaires bactériens. Ces structures peuvent se lier aux récepteurs membranaires BCR et CD22 et favoriser leur agrégation à la surface des cellules [31, 32]. L'activation du BCR mènera au recrutement de la protéine kinase Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), suivi de la génération d'un flux de calcium. Ces mécanismes entraînent une stimulation de la prolifération de ces cellules [33]. L'activation par un Ag TI-2, est en mesure d'initier la formation de lymphocytes B mémoire IgM⁺, capable de persister au sein de l'organisme et pouvant initier une réponse secondaire. Les IgM ciblant les Ags de groupes sanguins A et B en sont un exemple marquant, car ces structures glucidiques sont responsables de la barrière ABO infranchissable lors des transfusions de sang [34].

La réponse T indépendante est une portion de la réponse immunitaire souvent associée à des IgM, qui peut cependant mener à la production d'IgG[35]. Cependant, la majorité des anticorps IgG circulants sont des IgG de grande affinité qui ont été produits grâce à l'interaction entre les lymphocytes B et T.

4. La réponse immunitaire adaptative

4.1 Les organes lymphoïdes secondaires

La liaison d'un antigène par les lymphocytes B se produit lorsque les Ag transitent par les organes lymphoïdes secondaires. Ces structures anatomiques comprennent les ganglions lymphatiques, la rate et les MALT (*mucosal associated lymphocyte tissue*) (Figure 1) [36]. Ils représentent les sites de la reconnaissance des Ags et de l'activation d'un lymphocyte B par une cellule présentatrice

d'antigène (APC) [37]. De leur côté, les lymphocytes T ne peuvent reconnaître que des Ags de nature protéique [38] et uniquement dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces Ags protéiques sous leur forme soluble peuvent interagir directement avec le BCR du lymphocyte B, et ce, quelques minutes après l'injection de l'Ag dans l'organisme [13]. Cette activation directe se situe généralement dans la zone extrafolliculaire des organes lymphoïdes secondaires. Ces Ags peuvent aussi être complexés avec des protéines du système du complément, dont la composante C3 [39], ou bien avec des Ig circulantes. Les complexes immuns formés des Ag-C3-Ig peuvent se lier à des corécepteurs, tels CD21 et CD35 simultanément à la liaison du BCR à la surface des lymphocytes B et augmenter la force de la réponse immunitaire [40]. Les cellules dendritiques et les macrophages ayant lié les Ags sont aussi capables d'activer un lymphocyte B quelques heures après l'apparition de l'Ag [41, 42]. L'interaction d'une APC avec un lymphocyte B est caractérisée par la formation d'une synapse immunologique [43]. La synapse correspond à une agglutination des BCR dans une zone présentant plusieurs copies de l'Ag à la surface de la cellule présentatrice d'antigène. Cette interaction est produite par une organisation spatiale médiée par des protéines d'adhésion telles les intégrines [44]. La durée du contact entre une APC et un lymphocyte B varie entre 20 à 30 minutes [45].

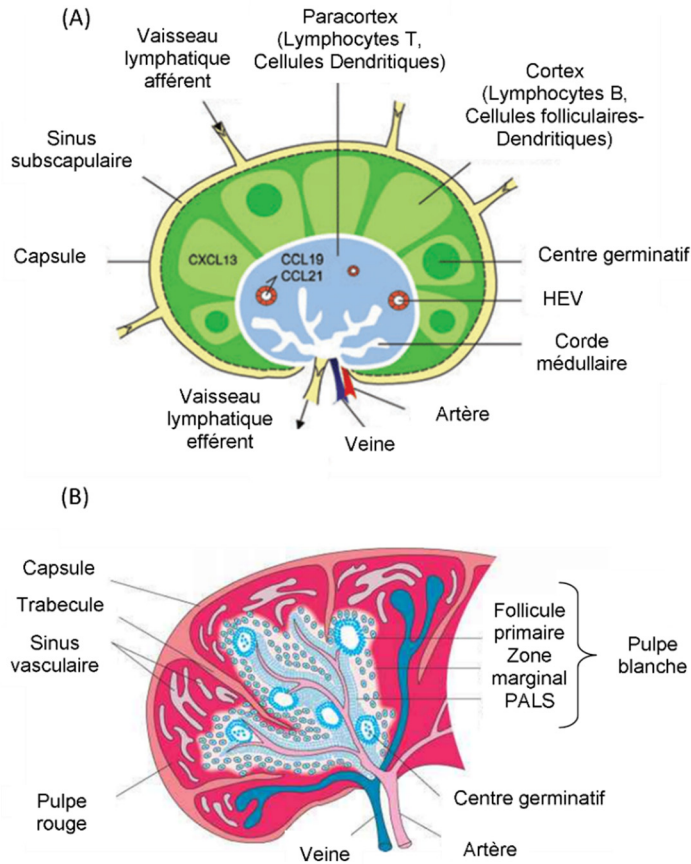


Figure 1 : Représentation schématique d'un ganglion lymphatique (A) et de la rate (B). Tiré et traduit de Drayton et coll. 2006 [36]. (A) HEV : Veinule à endothélium épais; CXCL13 : Chimiochine de motif C-X-C de type 13; CCL : chimiochine de forme CC. (B) PALS : Gaine lymphoïde périartériolaire (*Periarteriolar lymphoid shealts*)

4.2 Interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T

Les lymphocytes B agissent comme cellules présentatrices d'Ag (APC), un rôle qui est primordial pour l'activation des lymphocytes T auxiliaires CD4. Suite à la liaison de l'Ag au niveau du BCR, celui-ci est internalisé au niveau de puits de clathrines, et déclenche en parallèle l'activation de voies de signalisation de protéines kinases telles JNK, p38 et ERK [46]. La vésicule contenant le complexe Ag-BCR est fusionnée avec le lysosome. L'Ag y sera dégradé en fragments peptidiques qui seront captés par le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) [47]. Le complexe CMHII-peptide sera par la suite transféré au niveau de la membrane

plasmique et exprimé à la surface du lymphocyte B (Figure 2) [48]. Le complexe CMHII-peptide est alors reconnu par le TCR et permet l'activation des lymphocytes T [49, 50]. Selon la nature de l'Ag, l'activation des lymphocytes T mène à la génération des cellules T_H1, T_H2 ou T_H17 (T helper) [51]. Les T_H1 sont associés à une réponse de type IFN- γ et régulent principalement l'immunité face aux infections intracellulaires. Les T_H2 sont impliqués dans la stimulation de la sécrétion d'Ig, via la synthèse d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et/ou IL-13 [52]. Notamment, parmi les cytokines sécrétées par les lymphocytes T_H2, l'IL-4 est un élément fondamental lors de l'activation des lymphocytes B pour leur survie [53]. De leur côté, les T_H17 sont présentes au site d'inflammation et sont impliqués dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles d'IL-17, IL-21, IL-22. Les T_H17 sont probablement impliqués dans la synthèse d'Ig, car chez la souris, l'absence des T_H17 affecte la formation de cellules sécrétrices, par contre le lien direct entre T_H17 et la sécrétion n'est pas encore démontré [54].

Lors de l'interaction entre les lymphocytes B et T, menant à leur activation respective, plusieurs récepteurs et ligands doivent être impliqués pour la poursuite de la réponse immunitaire. La formation de ces couples récepteur-ligand se fait en parallèle à l'interaction CMHII-TCR, les plus importants sont CD40-CD154, CD80/86-CD28 et PDL-1/PD1 (*programmed death ligand 1/ programme death protein 1*) (Figure 3) [55, 56]. La protéine PDL-1 est indispensable à l'activation et à la différenciation des lymphocytes B [57]. Toutefois, l'interaction entre PD1 et PDL-1 est aussi un élément charnière de la tolérance capable de limiter la prolifération, la différenciation et le changement isotypique des Igs des lymphocytes B [58]. L'interaction PDL-1/PD1 peut aussi agir comme inhibiteur de l'activation des lymphocytes T [55, 59]. En parallèle, la liaison entre CD80 et CD86, présents sur les lymphocytes B, avec la protéine CD28 à la surface des lymphocytes T, est indispensable pour la poursuite de la différenciation des lymphocytes B. Le rôle de ces récepteurs CD80 et CD86 est appuyé par le fait que des mutations les rendant inactifs empêchent la formation des centres germinatifs et l'hypermutation somatique allant jusqu'à une incapacité à générer des lymphocytes B [60]. Cependant, une étude avec des souris incapables de

synthétiser CD80/86 a mis en évidence que ces protéines n'étaient pas indispensables quant à la génération de lymphocytes mémoires ayant déjà subi le changement de classe [61]. La liaison entre CD80/CD86 et CD28 est donc un élément initiateur essentiel lors de la rencontre entre un lymphocyte B naïf et un lymphocyte T. De plus, Lumsden et coll., ont aussi mis en évidence que les cellules n'exprimant pas le récepteur CD40 sont aussi entravées dans leur maturation. Le récepteur CD40 est effectivement un élément clé pour la formation du centre germinatif, le changement de classe et le processus d'hypermutation somatique [62, 63].

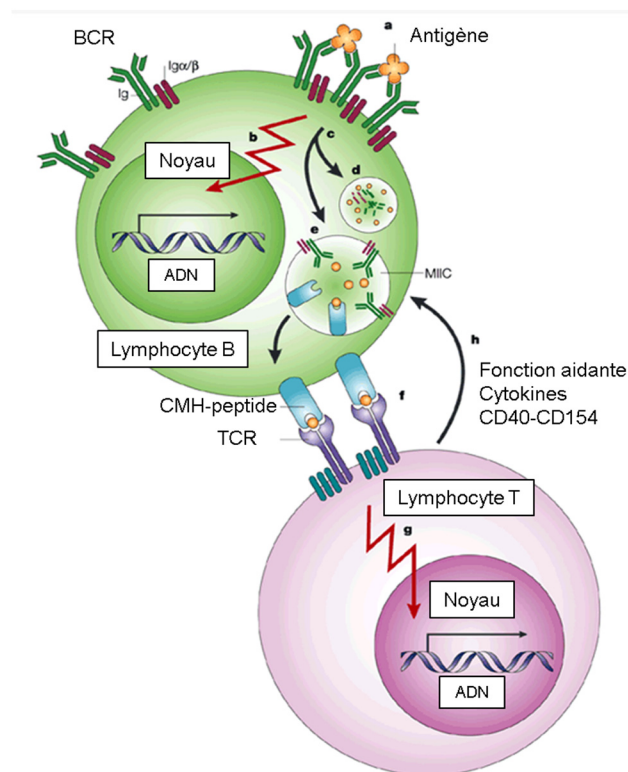


Figure 2 : Les lymphocytes T_H2 et les lymphocytes B lors de la présentation de l'Ag dans le complexe CMHII-peptide. Tiré de Pierce, 2002 [48]. (a) Liaison de l'antigène avec le BCR; (b) Activation des voies de signalisation; (c) et (d) internalisation et dégradation du BSC; (e) Liaison du peptide antigénique avec le CMH nouvellement formé; (f) Liaison CMH-peptide avec les TCR; (g) Activation des voies de signalisation sous-jacentes aux TCR; (h) Réponse des lymphocytes T.

4.2.1 Interaction CD40-CD154

L'interaction CD40-CD154 est cruciale pour l'activation des lymphocytes B par les lymphocytes T [64-66]. Cette interaction est à la base de plusieurs systèmes de culture utilisés pour la prolifération et la différenciation in vitro des lymphocytes B [63]. La protéine CD40 appartient à la famille des récepteurs des TNF (*Tumor necrosis factor-R*). Elle est activée par le ligand CD154 exprimé, entre autres, par les lymphocytes T CD4⁺ activés. Ce récepteur est impliqué lors de la formation des centres germinatifs (GC) et permet la génération de lymphocytes B mémoires. Le récepteur CD40 favorise la prolifération, la différenciation, la commutation isotypique ainsi que la sécrétion des cytokines et des Ig [63, 66]. Chez l'humain, le syndrome de l'hyper IgM lié au chromosome X est un parfait exemple de l'importance du récepteur CD40 dans le cadre de la réponse immunitaire. Cette pathologie est majoritairement caractérisée par une mutation de la protéine CD154, entraînant une déficience au niveau de la liaison entre CD40 et CD154 et menant à une synthèse exclusive d'IgM [67].

4.2.2 Signalisation intracellulaire reliée à CD40

La multitude de voies de signalisation issues de CD40 nécessite une régulation très fine de son activation [66]. In vivo, la première interaction entre CD40 et CD154 a lieu au niveau de la zone T-B dans la rate ou à l'interface du paracortex avec la zone folliculaire, au sein des ganglions lymphatiques (Figures 1 et 3). Par la suite, une seconde liaison a lieu au cours du processus de différenciation, au niveau de la zone claire du centre germinatif. Suite à première liaison de CD154, les lymphocytes T sont activés et augmentent l'expression de CD154 à leur surface [68] augmentant ainsi leur intensité d'interaction avec les lymphocytes B. Cette surexpression de CD154 est maintenue durant les 20 premières heures suivant l'activation des lymphocytes T. L'augmentation de l'expression de CD154 décroît cependant rapidement à la suite de sa liaison avec CD40 [69].

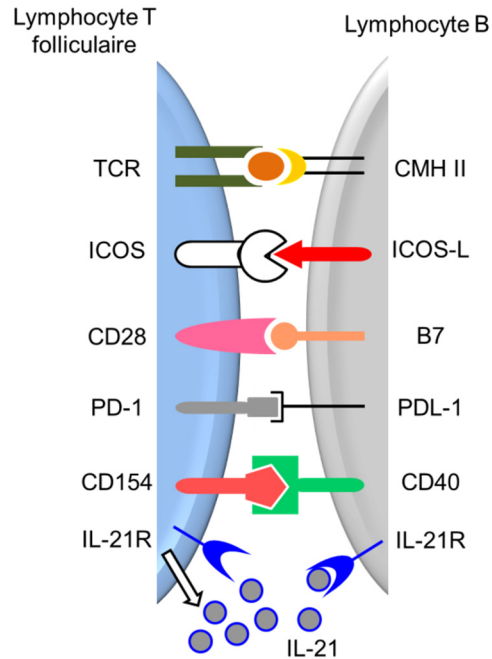


Figure 3 : Interaction entre un lymphocyte T folliculaire et un lymphocyte B au niveau d'un centre germinatif. Inspiré de Shekhar et coll. 2012 [56].

Bien que le mécanisme ne soit pas encore complètement défini, le niveau d'interaction de CD40 et CD154 semble déterminant pour le devenir de la cellule [70]. En effet, la nature du ligand CD154 utilisé dans un environnement in vitro peut faire varier le niveau de multimérisation du récepteur CD40. En fait, une activation efficace via cette interaction nécessite au moins une trimérisation menant à la cascade de signalisation [71, 72]. La liaison entre CD154 et CD40 implique les voies d'activation des récepteurs associés au TNF (TRAF). Les TRAFs influencent en parallèle le niveau de phosphorylation de la protéine JAK3 (Janus kinase 3) impliquée dans la voie JAK-STAT (Figure 4) [66]. Les TRAFs sont associés à l'activation de plusieurs voies métaboliques chargées de réguler des facteurs de transcription. Les TRAFs peuvent activer le $\text{NF-}\kappa\text{B}$, les MAPK et des kinases telles que PI3K; toutes ces voies étant elles-mêmes associées aux processus de prolifération et de différenciation [73, 74]. Selon la nature et l'intensité de la liaison de CD40, différentes molécules TRAFs seront activées pouvant ainsi engendrer une réponse distincte au sein de la cellule. Par exemple,

TRAF2 et TRAF6 sont des activateurs des voies de signalisation PI3K et JNK alors que TRAF3 joue plutôt un rôle inhibiteur de ces voies [73]. Le recrutement différentiel des TRAFs est lié à leur affinité respective pour la portion cytosolique du récepteur CD40 [75]. En parallèle aux TRAFs, la protéine JAK3 joue aussi un rôle dans les mécanismes de prolifération et de différenciation via l'activation de STAT5. Ces informations ont été obtenues avec un modèle de souris ayant une protéine JAK3 non fonctionnelle [76]. Les souris JAK3^{neg} sont caractérisées par une accumulation de lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse ainsi qu'une déficience dans la formation de lymphocytes B matures capable d'effectuer le changement de classe [76]. TRAF2 et TRAF6 tout comme JAK3 sont des facteurs importants pour l'activation des lymphocytes B lors de la réponse immunitaire.

4.2.3 Étude dans un environnement in vitro

Dans un contexte de modèle in vitro, l'interaction CD40-CD154 peut-être recréée pour favoriser la prolifération ou la différenciation des lymphocytes B (revue dans [63, 77]). La stimulation de CD40 peut se faire, via l'utilisation de protéines recombinantes de CD154 trimériques ou multimériques ou d'anticorps monoclonaux anti-CD40 utilisés sous forme solubles [78, 79]. Cependant, afin de se rapprocher des conditions observées in vivo, plusieurs scientifiques s'entendent sur la nécessité de polariser cette interaction [43]. Ainsi, l'utilisation de supports solides afin de fixer les anticorps anti-CD40, ou de lignées cellulaires modifiées afin d'exprimer à leur surface CD154, permettent d'orienter cette interaction [80, 81]. Une telle reproduction de la polarisation de la synapse favoriserait le remaniement sous-jacent du cytosquelette nécessaire à la transduction du signal intracellulaire tel que rapporté in vivo [82, 83].

En parallèle, le niveau d'expression de la protéine CD154, influençant le niveau d'occupation des récepteurs CD40, peut aussi affecter le devenir de la cellule. Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages, toutes deux exprimant CD40, répondent de manière distincte, selon la présence d'un faible ou d'un fort

niveau d'interaction entre CD40 et CD154 [84, 85]. Une étude, publiée par notre laboratoire [86] a d'ailleurs mis en évidence que ces variations de l'intensité de liaison du récepteur CD40 par l'utilisation de quantité croissante de molécules CD154 avait une influence proportionnelle sur la prolifération et inversement proportionnelle sur la différenciation de ces cellules.

4.3 Activation de la voie JAK-STAT

Lors de la réponse immunitaire, les cytokines sont des éléments essentiels à l'activation des lymphocytes B [87]. Ces facteurs solubles, tels IL-4 et IL-21, interagissent avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. De plus, le profil d'expression des récepteurs de cytokines varie selon de stade de maturation et de différenciation des lymphocytes B [88, 89]. L'une des voies d'activation principale en réponse à des cytokines ou à l'activation du récepteur CD40 est la voie des JAK-STAT [90]. Cette voie joue un rôle majeur au niveau de la régulation du système immunitaire [91, 92]. Les JAKs sont des tyrosines kinases, non associées à un récepteur capable d'activer des STATs, qui sont des transducteurs du signal et activateur de la transcription. Ces enzymes sont au nombre de quatre, soit JAK1, JAK2 et TYK2, qui sont ubiquitaires, et JAK3, qui est présent uniquement chez les lymphocytes [93]. De plus, JAK3 et TYK2 sont fondamentaux pour le maintien de la stabilité du système immunitaire [94] et l'absence de JAK1 ou JAK2 est létale chez la souris [92]. Parallèlement, l'activation incontrôlée des JAKs, est associée à des mutations qui elles sont des marqueurs utilisés pour la détection de certains cancers chez l'homme [95, 96]. Suite à leur activation, issue de la phosphorylation de la portion cytosolique des récepteurs de cytokines, ces enzymes sont phosphorylés et transfèrent le groupement phosphate à une des protéines STATs (Figure 4). Les STATs sont au nombre de sept : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a/b et STAT6. Une fois activée, les STATs se dimérisent formant des homodimères et migrent dans le noyau s'associer avec les régions GAS (*Gamma associated sequences*) chargées de réguler l'expression de gènes.

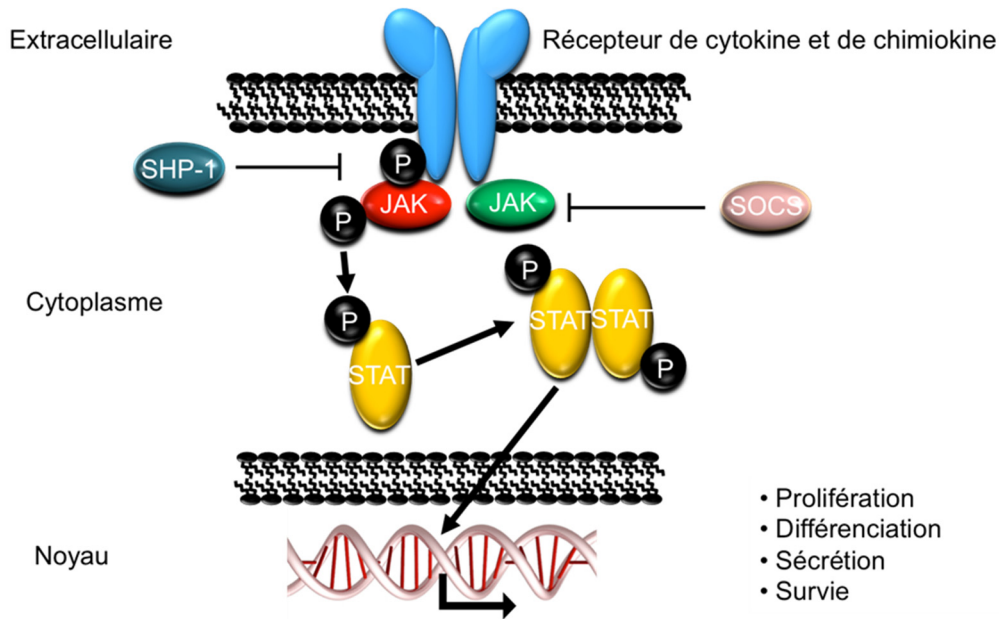


Figure 4 : Représentation schématique de la voie JAK-STAT, à la suite d'une activation d'un récepteur de cytokine.

Dans le cadre de la réponse immunitaire, STAT3 est un élément clé dans le développement, la différenciation et la sécrétion des lymphocytes B [97-101]. De plus, cette voie de signalisation est régulée à la baisse par la phosphatase SHP-1 et par les suppresseurs du signal de cytokine que sont les SOCS [101, 102]. Les SOCS sont de ce fait très importants dans la régulation de la réponse immunitaire [103].

5. Le devenir des lymphocytes B activés

La mise en place d'une réponse humorale efficace consiste en l'apparition chronologique d'acteurs cellulaires chargés de répondre à un antigène donné. Cette réponse humorale se divise en deux parties, à savoir la réponse primaire et secondaire [104]. La réponse primaire survient lors de la première rencontre des lymphocytes B avec l'Ag. Les lymphocytes B en mesure de répondre à l'Ag, sont activés et leur nombre amplifié lors de la sélection clonale. Ces lymphocytes B tendent à former rapidement des cellules capables de sécréter des Acs de faible

affinité. La maturation d'affinité de ces Acs apparait à la suite de la réaction avec l'Ag au niveau des structures spécialisées que sont les centres germinatifs. Cette étape est en mesure de générer des lymphocytes B mémoires. Dans le cas d'une réapparition du même Ag ou pathogène dans l'organisme, celui-ci entraîne la mise en place d'une réponse dite secondaire. Les lymphocytes B mémoires initialement générés sont alors amenés soit à se différencier en plasmocytes, soit à subir une nouvelle maturation d'affinité de leur récepteur. La finalité de cette réponse est la génération d'un répertoire de lymphocytes B mémoires capables de répondre efficacement et rapidement lors de la prochaine rencontre d'un Ag donné.

5.1 La réponse extra folliculaire

Le rôle de la réponse primaire est d'initier le plus rapidement possible une réponse de type humorale à la suite d'une infection. Les premières cellules présentant un changement de classe des chaînes lourdes d'Ig, par exemple d'IgM à IgG, sont issues de la réponse extrafolliculaire. Celle-ci permet la formation rapide de cellules sécrétrices d'anticorps, que sont les plasmocytes à courte vie, et la génération des lymphocytes mémoires (Figure 5) [105]. Cette première vague de plasmocytes survient à peu près 3 jours suivant l'exposition à un antigène [106]. Ces nouveaux plasmocytes à courte vie migrent au niveau du sinus subscapulaire pour rejoindre la circulation et atteindre le site d'infection où ils vont sécréter des Igs. La réponse primaire permet l'activation de lymphocytes B naïfs qui sont en mesure de générer une population de lymphocytes B mémoires majoritairement de type IgG [107, 108].

Ces premiers plasmocytes générés au cours de la réponse primaire proviennent de la zone marginal au niveau de la rate [2]. La fonction de filtration attribuée à cet organe favorise grandement la captation des antigènes. Les lymphocytes B non circulants présents dans cette zone sont alors enclins à engendrer une réponse rapide à la suite de leur activation. De plus, les lymphocytes B circulants, issue de la zone folliculaire, sont aussi en mesure d'initier une réponse extrafolliculaire. Cependant, la réponse qu'ils génèrent met plus de temps à se mettre en place, en

comparaison à celles des lymphocytes B retrouvés dans la rate. Les lymphocytes en circulation captent rapidement les antigènes. Cependant, le temps de migration vers un organe lymphoïde, nécessaire pour leur activation, ralentit la mise en place de cette réponse. Ces cellules migrent soit dans la rate au niveau des PALS (*Periarteriolar lymphoid shealts*), soit dans les ganglions lymphatiques des sinus médullaires [104].

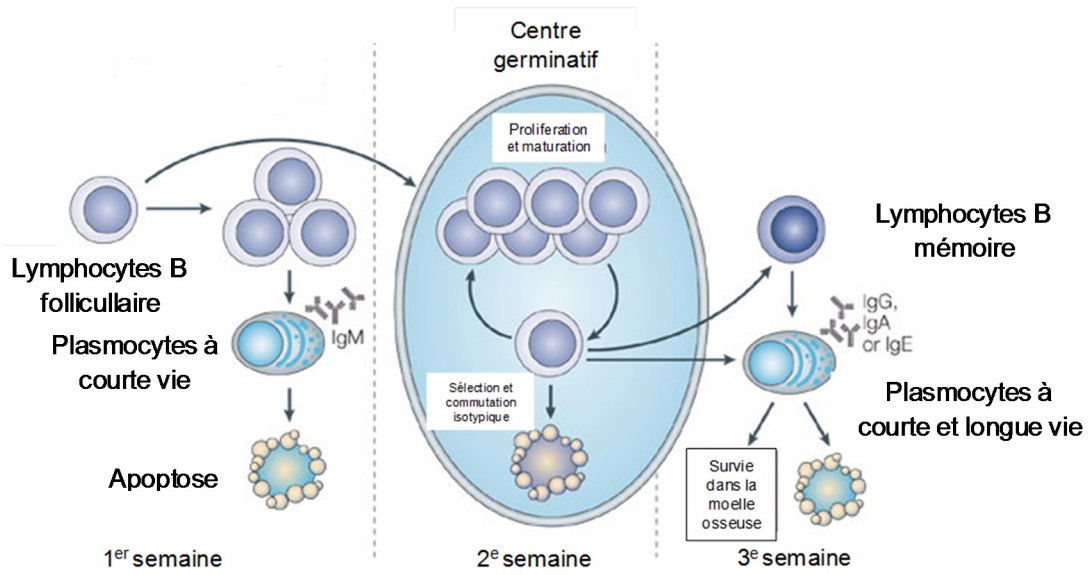


Figure 5 : Étapes de différenciation des lymphocytes B naïfs du stade folliculaire au stade plasmocyte. Certaines cellules B se différencieront en plasmocytes dit à courte vie, présentant une faible affinité pour un antigène donné. Cependant d'autres de ces cellules migreront jusqu'au centre germinatif afin de subir les étapes de commutation isotypique et de sélection clonale afin de générer des anticorps spécifiques à un antigène. Cet antigène est présenté par des cellules dendritiques ainsi que des lymphocytes T dans la zone claire de cette structure anatomique. À la sortie des centres germinatifs, se trouvent alors des plasmocytes à courte et longue vie, ainsi que des cellules B mémoires. Les plasmocytes à longue vie migreront dans la moelle osseuse pour y demeurer des années. Tirée et traduit de Shapiro-Shelef et coll. [104].

La réponse extrafolliculaire peut aussi générer l'apparition de lymphocytes B mémoires. Lors de sa découverte, la présence de cette population mémoire extrafolliculaire était contradictoire avec le courant de pensée [109]. Le caractère mémoire était alors attribué seulement aux cellules issues des centres germinatifs.

Cependant, la détection de lymphocytes B mémoire (CD27⁺) chez des souris incapables de former ces structures, a remis en question l'origine et la fonction de celles-ci au sein de l'organisme [110, 111]. Ces cellules nommées «*marginal zone B cells*» majoritairement CD27⁺IgD⁺IgM⁺ sont maintenant reconnues chez l'humain comme une population mémoire [112].

5.1.1 Lymphocytes B et plasmocytes dans un contexte T-indépendant

Chez la souris la réponse extrafolliculaire T-indépendante peut générer des lymphocytes B mémoires à partir des cellules appelées B1. Les cellules B1 sont observées chez le fœtus [113] ou chez l'adulte majoritairement dans le péritoine et la rate [114] et sont divisées en B-1a (CD5⁺) et B-1b (CD5⁻) [3, 4]. Les cellules B-1a présentent un profil similaire aux plasmocytes à courte vie IgM^{fort} IgD^{faible} et sécrètent majoritairement des IgM de faible affinité. La population B-1b génère des plasmocytes dont la sécrétion est maintenue sur un plus long terme [115, 116]. Les cellules B1 peuvent aussi générer des plasmocytes à courte vie IgG⁺ [104] au niveau du sinus marginal de la zone marginale, ainsi que dans les MALT (*mucosal associated lymphoid tissue*) [117]. La première vague de plasmocytes extrafolliculaires est détectable environ 5 jours suivant l'apparition de l'antigène [118, 119]. Cette vague représente la source majeure des Ig anti-Ag T indépendant présentes en circulation. Chez l'humain les populations de type B1 ne sont pas aussi distinctes et sont associées à la sécrétion d'anticorps naturels surtout au niveau des premières années de vie [120].

5.1.2 Réponse en contexte T-dépendant

Les mécanismes capables d'orienter un lymphocyte B vers une réponse extrafolliculaire ou une réponse dépendante des centres germinatifs sont encore mal compris. Plusieurs suggèrent l'importance de la durée d'interaction entre un lymphocyte B et un lymphocyte T_H (*T helper*) [121, 122]. Un contact transitoire au niveau de la synapse immunologique entraîne une lacune de stimulation qui oriente les lymphocytes B vers une réponse indépendante des centres germinatifs

[121]. Plusieurs études chez la souris confirment d'ailleurs, grâce à l'imagerie en temps réel, la dynamique des interactions entre les lymphocytes B et T dans les centres germinatifs (revue dans [123]).

5.1.2.1 Lymphocytes B mémoires

Dans le contexte de la réponse extrafolliculaire, plusieurs observations ont montré qu'une première vague de lymphocytes B mémoires émerge très tôt à la suite d'une activation par un Ag de nature protéique [108, 124, 125]. Ces cellules ont le phénotype CD27⁺ et présentent un faible niveau de maturation d'affinité de leur BCR [126, 127]. La génération de ces lymphocytes B lors d'une réponse extrafolliculaire a été mise en évidence, grâce à des modèles de souris génétiquement modifiés, alors incapable de former des centres germinatifs [108, 128, 129]. Ces cellules mémoires CD27⁺ apparaissent donc aussi de manière indépendante à la formation des centres germinatif [130].

5.1.2.2 Plasmocytes

Bien que l'apparition de lymphocytes B mémoires lors de la réponse extrafolliculaire ait longtemps été contestée, la génération de plasmocytes était pourtant bien admise. Ces plasmocytes sont générés à partir des populations les plus affines pour un Ag au cours de leur première rencontre [5]. Après activation et prolifération, les lymphocytes B émergent de la zone des lymphocytes T extrafolliculaires. Ces lymphocytes B présentent déjà des marqueurs spécifiques aux plasmocytes. À titre d'exemple, la surexpression de Blimp-1 est détectée environ 18 heures après leur stimulation, et l'expression de CD138 après environ 48 heures [119]. Ces cellules sont des plasmablastes qui vont migrer au niveau de la pulpe rouge ou de la corde médullaire afin de poursuivre leur maturation. A ce stade, les plasmablastes perdent leur capacité de liaison avec les cellules T, notamment via une perte de l'expression du CMHII et de CD86. En parallèle, les Ig ne sont plus présentes à leur surface et ont été soumises au changement de classe. Les plasmablastes générés à la suite de cette réponse extrafolliculaire

possèdent une durée de vie moyenne de 3 jours [131].

En résumé, le but premier de l'apparition des plasmocytes est la génération d'une première vague de lymphocytes suivant la rencontre avec un Ag. Ces cellules constituent une population de faible affinité, capable de sécréter rapidement d'importantes quantités d'anticorps. Dans cet environnement, le processus de changement de classe est plus facilement réalisable d'un point de vue mécanistique. C'est pourquoi des populations IgG⁺ à la suite d'une stimulation antigénique sont déjà observées après quelques jours.

5.2 Centre germinatif

Lors de la réponse immunitaire, des populations de plus grandes affinités sont obtenues au cours du processus plus complexe de maturation des lymphocytes B. Ces mécanismes requièrent d'importants remaniements génétiques et de contrôle de réactivité au soi, dont la mise en place prend plus de temps. L'obtention de lymphocytes B spécifiques en réponse à une stimulation antigénique est possible à travers la formation des centres germinatifs. Ces structures anatomiques sont observées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Leur principale fonction est la génération de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes, de grande affinité. Ces cellules y subissent une maturation d'affinité de leur récepteur ainsi que le changement de classe. Un grand nombre d'études portent sur les centres germinatifs; ce qui en fait un mécanisme de l'immunité richement documenté. Les éléments régulateurs ainsi que les pathologies associées aux centres germinatifs sont très bien décrits (revue dans [123, 132]).

5.2.1 Structure des centres germinatifs : Formation et composition

Les centres germinatifs sont des structures dynamiques présentes au centre de la zone folliculaire des ganglions lymphatiques. Ils sont le site de la réponse humorale spécifique à un antigène. Leur formation survient environ 4 jours à la suite de l'invasion du pathogène dans l'organisme [133]. Le destin des

lymphocytes B à générer un centre germinatif est déterminé avant même leur entrée dans la zone folliculaire [134]. En effet, les lymphocytes B présélectionnés sont ceux présentant la plus forte affinité avec l'antigène lors de l'interaction avec les cellules T CD4⁺ dans la zone extrafolliculaire. Ce contact intense favorise l'augmentation de l'expression de la protéine Bcl-6 (protéine 6 du lymphome des cellules B) indispensable à la formation des centres germinatifs [135]. Cette protéine est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans les remaniements génétiques nécessaires à la maturation d'affinité des chaînes légères d'immunoglobulines. La régulation de Bcl-6 est reliée à l'expression des gènes MYC et de l'IRF4 (*Interferon regulatory facteur 4*) [135, 136]. Bien que leurs fonctions divergent de celles exercées par Bcl-6, ces protéines jouent un rôle initiateur du comportement du lymphocyte B à l'intérieur des centres germinatifs en favorisant notamment leur prolifération. Les lymphocytes naïfs IgM⁺IgD⁺ qui ont subi ces changements migrent au centre de la zone folliculaire en réponse à un gradient de concentration de CXCL13 généré par les cellules folliculaires dendritiques (FDC) [137]. Les lymphocytes B prennent alors le nom de blastes et se divisent activement, pour former à partir du jour 7, un centre germinatif pleinement fonctionnel [123]. En microscopie optique, cette structure apparaît divisée en deux régions distinctes qui comprennent la zone sombre (*dark zone*) et la zone claire (*light zone*). Dans la zone sombre, les cellules appelées centroblastes se divisent très rapidement (temps de génération de 6 à 8 heures [138]) et peuvent entreprendre le changement de classe. En parallèle, une portion de ces lymphocytes subit le processus d'hypermutation somatique au niveau des régions variables de leur chaîne d'Ig, favorisant la maturation d'affinité des Acs générés. Le maintien de ces cellules dans la zone sombre est régulé par la sécrétion de CXCL12 par des cellules réticulaires [139]. Ces centroblastes sont caractérisés par l'expression très élevée de CXCR4, le récepteur de CXCL12. Ils sont aussi caractérisés par une faible expression à leur surface des marqueurs CD83 et CD86 [140]. La génération de souris déficiente pour CXCR4 a prouvé l'importance de CXCL12 dans cet équilibre. Les lymphocytes B CXCR4⁻ sont incapables de se maintenir au niveau de la zone sombre, et migrent directement

au niveau de la zone claire [141]. Ces cellules CXCR4⁻ ont la particularité d'exprimer peu de maturation d'affinité des chaînes d'Ig.

Dans les conditions physiologiques, les centroblastes, après plusieurs cycles cellulaires, sont amenés à ralentir leur prolifération et migrent au niveau des zones claires. Ces cellules, dès lors appelées centrocytes, expriment à leur surface une quantité importante d'Ig et présentent un phénotype de type CXCR4^{faible}CD83^{fort}CD86^{fort} [140]. Hormis ces modifications, le passage d'une zone à l'autre est encore mal compris, mais pourrait être relié au nombre de divisions encourues par la cellule dans la zone sombre [139]. Lors de leur entrée dans la zone claire, les centrocytes sont soumis à une évaluation de l'affinité de leur BCR pour leur cible antigénique. Ce processus de la sélection clonale va mener à la formation de clone de cellules ayant des Ig identiques. La zone claire est une région des centres germinatifs, qui inclut en plus des lymphocytes B en cours de maturation, des cellules folliculaires de type dendritique (FDC) et des lymphocytes T folliculaires (T_{FH}) [138, 142]. Il y a alors compétition entre les différents clones de centrocytes générés pour fixer les antigènes disponibles, présents en nombre limité sur les FDC. Plus l'affinité des récepteurs des centrocytes est forte pour cet antigène, plus ceux-ci ont de chance d'interagir avec les FDC et d'être sélectionnés [143]. A la suite de la formation d'une interaction similaire aux synapses immunologiques, tel que rapportés lors de l'activation des lymphocytes B, les cellules T_{FH} sont en mesure d'induire un signal de survie. Il consiste en l'activation des voies de signalisation de NF-κB, par l'intermédiaire d'une stimulation des récepteurs CD40, PD1, BAFF et TLR [123, 144]. En parallèle, les cellules T_{FH} sécrètent de manière abondante, de l'IL-4 ainsi que de l'IL-21 [145, 146], impliqués dans l'activation de la voie JAK-STAT. Ces interactions semblent grandement favorisées par l'expression à la surface des cellules B de ligands capables d'induire la costimulation des cellules T, les ICOSL [147], ainsi que PD1. Les lymphocytes B incapables de former de telles interactions sont alors amenés à entrer en apoptose par manque de costimulation nécessaire à leur survie.

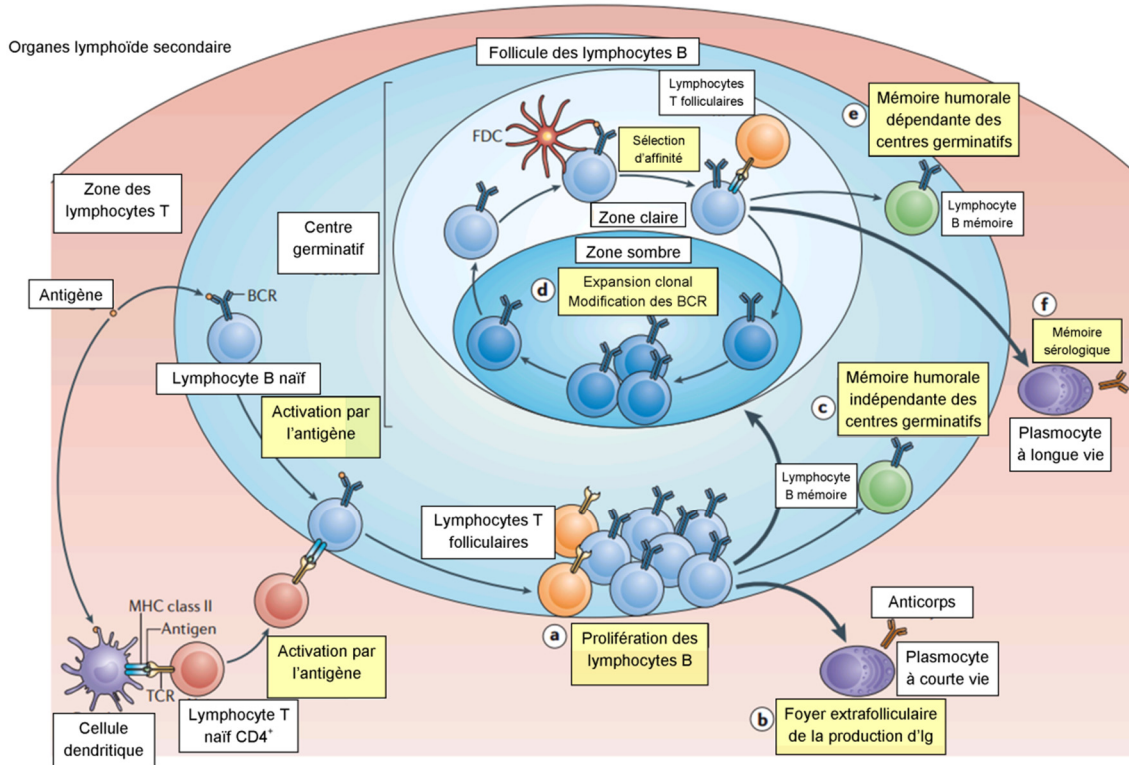


Figure 6 : Génération de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes à la suite d'une stimulation T dépendante. Tirée et traduit de Kurosaki [122]. (a) Prolifération des lymphocytes B activés. (b) Émergence des plasmocytes issus de la réponse extra folliculaire. (c) Apparition des lymphocytes B mémoires indépendant de la formation de centres germinatifs. (d) Expansion clonale et maturation d'affinité dans la zone sombre. (e) et (f) émergence des populations de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes à la suite de la réaction des centres germinatifs.

À ce stade les centrocytes alors « sélectionnés » pour leur affinité pour un antigène-cible, possèdent plusieurs choix quant à leur devenir (Figure 6). Certaines de ces cellules peuvent retourner dans la zone sombre afin de poursuivre leur maturation d'affinité. C'est le niveau d'interaction entre les lymphocytes B et les T_{FH}, qui pourrait régler ce choix via l'activation du gène *MYC*, impliqué dans la reprise de la capacité de prolifération jusqu'alors perdue par les centrocytes [136]. Une inhibition de l'expression de ce proto-oncogène a pour effet la désolidarisation des cellules formant le centre germinatif, menant à une réponse humorale de plus faible affinité. Le niveau d'expression de *MYC* est directement relié à l'intensité d'interaction B-T_{FH}/FDC, ce qui va alors avoir comme effet

d'influencer le nombre de divisions prédéfini à l'intérieur de la zone claire [136, 148].

5.2.2 Remaniement moléculaire

L'autre choix des centrocytes présents dans la zone claire est d'augmenter leur niveau d'expression d'*IRF-4* (*Interferon regulatory factor 4*), entraînant une inhibition de *BCL6*. Ce remaniement a pour effet d'empêcher le retour de ces cellules vers la zone sombre [149]. Ainsi, une surexpression de *IRF-4* au sein des centrocytes signe la fin du processus d'hypermutation somatique, et le début de leur différenciation en précurseur de cellule mémoire ou en plasmablaste [150].

5.2.3 Les étapes médiées par la fine régulation des gènes

La progression des cellules au sein des centres germinatifs est principalement régulée par les gènes *BCL6*, *PAX5*, *Bach2*, *PU.1* et *IRF-8* [104, 151, 152] (Figure 4). Le gène *BCL6* est activé en présence de l'IL-21 et permet la formation de centre germinatif [153]. La protéine BCL6 favorise le maintien de la capacité de prolifération des lymphocytes B, via notamment la régulation négative des gènes *MYC* et *p53* [154]. *MYC* et *p53* sont respectivement impliqués au niveau du contrôle du cycle cellulaire ou comme proto-oncogène, et leur dérèglement est relié à la formation de lymphomes [155]. BCL6 favorise aussi l'apparition de mutation au niveau des gènes des régions variables des chaînes d'Ig lors de l'hypermutation somatique. Sa fonction est d'inhiber les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN. Finalement, alors que BCL6 apparaît de manière précoce, son maintien n'est pas indispensable pour la suite de la réaction au niveau des centres germinatifs [151].

En contrepartie, deux gènes, soit *BACH2* et *PAX5*, apparaissent comme déterminants pour la formation des plasmocytes. *BACH2* est un gène dont la principale fonction est l'inhibition de BLIMP-1. Ce facteur, BLIMP-1, est reconnu comme étant un élément majeur dans le processus de différenciation en cellule

sécrétrice d'Acs [156]. Ainsi, une diminution de l'expression de la protéine BACH2 favorise l'expression de BLIMP-1 qui mène à l'apparition de plasmocytes. Ce phénomène est aussi observé lors de la réponse secondaire de lymphocytes B mémoires IgG⁺ [157]. Une l'inhibition de *BACH2* entraîne une expression précoce de *BLIMP-1* et le développement des cellules B en plasmocytes IgM⁺ [158]. Une fine régulation entre les protéines BACH2 et BLIMP-1, règle le potentiel de changement de classe d'Ig.

De son côté, l'expression du gène *PAX5* est primordiale pour le développement des lymphocytes B. Celui-ci apparaît très tôt au sein des progéniteurs lymphoïdes [159] et se maintient jusqu'aux dernières étapes de différenciation des lymphocytes B [160]. Ce gène appartient à la famille des protéines spécifiques et activatrices de la lignée des lymphocytes B. Des essais d'inhibition de *PAX5* ont montré une inversion du profil de différenciation des cellules B matures chez la souris [161]. *PAX5* est impliqué dans la régulation de nombreux gènes spécifiques aux lymphocytes B, soit l'expression de CD19, CD21 ou du BCR. Les facteurs de transcription IRF-4 ou BACH2 sont aussi influencés par *PAX5* [161]. La génération de souris incapable d'exprimer *PAX5* a permis de démontrer une inhibition du processus de différenciation des lymphocytes B vers le stade plasmocyte [162]. Les lymphocytes B de ces souris sont caractérisés par la diminution de l'expression d'IgM membranaire, le ralentissement de la prolifération et l'absence de l'expression de BCR. *PAX5* est impliqué dans l'inhibition du facteur XBP-1, dont l'expression est indispensable au maintien des plasmocytes [163]. Finalement, la régulation des gènes *PAX5* et *BCL-6*, tous deux inhibiteurs de la différenciation, est réalisée par l'intermédiaire des facteurs de transcription PU.1 et IRF-8 [164]. En ce sens, la diminution de ces deux derniers facteurs de transcription est proportionnelle à la diminution de *PAX-5* et *BCL6* et à l'augmentation de la différenciation.

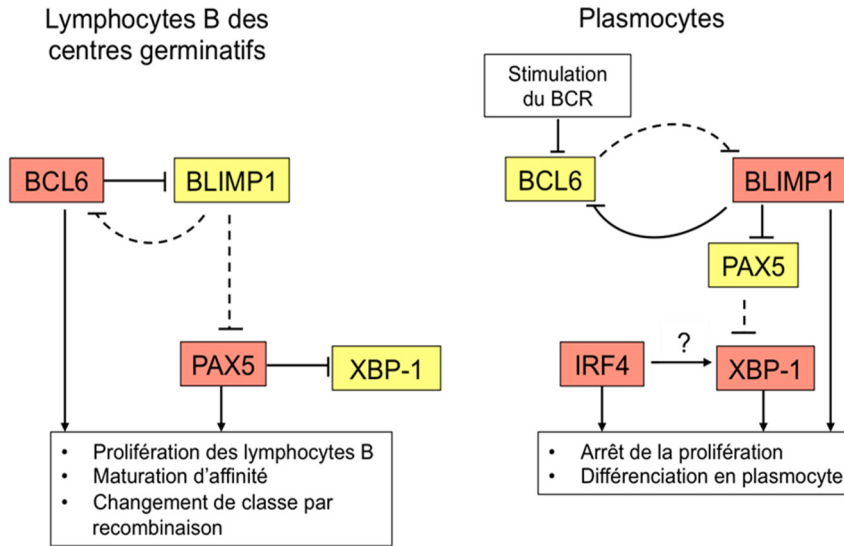


Figure 7 : Remaniement moléculaire favorisant la formation de plasmocytes à partir de lymphocytes B issus des centres germinatifs. Tiré et traduit de Todd et coll. [165].

5.2.4 Apparition du caractère plasmocytaire

La génération de cellules sécrétrices d'immunoglobulines est donc rendue possible par l'activation de gènes antagonistes à ceux impliqués dans le maintien du caractère lymphocytaire (Figure 7). Ces gènes sont associés à des processus chargés de promouvoir la survie de la cellule et d'augmenter la capacité de synthèse des Igs. Ces gènes règlent le stress métabolique issu de la synthèse massive d'Igs, ou le contrôle du cycle cellulaire. Les acteurs principaux sont donc IRF-4, XBP-1 (*X box binding protein 1*) et BLIMP-1 (*B lymphocytes induce maturation protein 1*) (Figure 7) [165, 166]. IRF-4 apparaît très tôt au cours de leur formation dans la moelle osseuse [167] et se maintient jusqu'à l'entrée dans les centres germinatifs, pour revenir à la fin de cette réaction [168]. Un faible niveau d'expression de la protéine IRF-4 favorise le changement de classe et l'activation du gène *BCL-6*. Par contre, une forte concentration de IRF-4 inhibe le gène *BCL-6* et active la synthèse de la protéine BLIMP-1 [169]. Des souris KO pour IRF-4 ont permis d'établir que IRF-4 est essentiel à la formation des plasmocytes et à la formation du centre germinatif [170]. De plus, il a été démontré que la survie des

plasmocytes au niveau de la moelle osseuse était dépendante de l'expression d'IRF-4 elle-même associée à la régulation du gène *Mcl1* [171].

De son côté, le gène *XBP-1* protège la cellule des dommages oxydatifs issus de l'importante sécrétion d'Igs [172]. Ce mécanisme régule aussi le mauvais repliement de protéines (UPR), permet d'inhiber l'accumulation de protéines non fonctionnelles et de favoriser leur recyclage comme source d'acides aminés. Cependant, bien que l'augmentation de l'expression de *XBP-1* soit détectable chez les plasmocytes [173], son activation n'est pas indispensable pour leur apparition [174]. Dans le cas d'une délétion du gène codant pour *XBP-1*, il y a tout de même formation de cellules sécrétrices d'anticorps qui présentent de larges vésicules observables au microscope électronique. Ces structures sont caractéristiques d'une accumulation de protéines mal repliées non dégradées [174].

L'apparition de *BLIMP-1* à la suite de la réaction des centres germinatifs, est décelable dès le stade plasmablaste. Sa transcription est maintenue en quantité croissante jusqu'à la formation des plasmocytes [175, 176]. Activée par IRF-4, la fonction précise de *BLIMP-1* est encore mal comprise de nos jours. Cette protéine jouerait un rôle dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la sécrétion d'Igs. La protéine *BLIMP-1* inhibe l'expression des gènes *BCL6* et *PAX5* ce qui a un impact sur la dissociation des cellules des centres germinatifs [177]. Des essais réalisés chez la souris ont montré que l'absence de *BLIMP-1* fonctionnel, avait pour effet d'inhiber l'apparition de plasmocytes à la suite d'une activation antigénique [178]. Très récemment une étude, réalisée avec un modèle de souris dont l'activation du gène *prdm1* était modulable, a démontré que l'expression de *BLIMP-1* n'était pas impliquée dans les mécanismes favorisant la survie des plasmocytes [179]. Cependant, ces auteurs ont rapporté que *Blimp-1* jouait un rôle autant dans la régulation des mécanismes de sécrétion des Igs que dans la médiation de la réponse UPR. De plus, ce groupe de recherche a aussi mis en évidence l'implication de *BLIMP-1* dans la régulation de l'expression de gènes impliqués lors de la migration et l'adhésion des plasmocytes dans la moelle osseuse [180].

5.2.5 Remaniement génétique touchant les chaînes d'Ig

5.2.5.1 Hypermutation somatique

L'augmentation de l'affinité des Igs pour un antigène est un processus qui insère des mutations rendues possibles par l'activation d'une enzyme chargée de désaminer des cytidines en uraciles (AID) [181]. L'uracile est alors reconnu par l'uracile-ADN glycosylase (UNG), chargée de l'exciser et de favoriser son remplacement par un acide désoxyribonucléique aléatoire lors de la réplication de l'ADN. Ces mécanismes favorisent alors l'apparition de mutation par ces bases substituées, dont la fréquence de remplacement est de l'ordre d'une substitution à toutes les 10^3 paires de bases, ce qui est très élevé. Par comparaison, les fréquences des mutations spontanées sont de une toutes les 10^{10} paires de base pour les cellules somatiques [181]. Ces substitutions apparaissent au niveau des régions déterminant la complémentarité (CDR), présentes au sein des séquences variables des chaînes lourdes et légères [182]. Les CDR, au nombre de 3 par chaînes, correspondent aux régions susceptibles d'entrer en contact avec l'Ag au niveau du paratope. Ces locus au sein des régions variables présentent des structures en forme de boucle composées de brin β , permettant un appariement spécifique avec une région précise de l'Ag [183]. Ainsi lors de la division cellulaire des centrocytes, la cellule mère et les cellules filles diffèrent au niveau de la séquence primaire en acides aminés des régions variables des Ig synthétisés. Le processus de mutation est aléatoire et peut avoir un effet négatif sur le niveau d'affinité des récepteurs des lymphocytes B. Ces dernières ayant diminué leur niveau d'affinité pour l'antigène seront alors amenées à entrer en apoptose par manque de compétitivité pour le substrat au sein de la zone claire.

5.2.5.2 Commutation isotypique

La commutation isotypique, est le mécanisme permettant le passage d'une classe d'Ig à une autre, sans possibilité de retour en arrière. Cette réaction permet aux lymphocytes B de synthétiser différents isotypes d'anticorps de même spécificité

qui reflète son niveau de maturité et sa localisation dont résultent les différents stimuli [184]. Cette modification n'a pas d'effet sur l'affinité des anticorps pour un antigène. Le changement de classe permet des fonctionnalités différentes pour l'activation du complément, le passage de la barrière placentaire ou la liaison aux récepteurs Fc. L'enzyme responsable de cette réaction est une fois de plus la protéine AID, qui permet la recombinaison spécifique de segments de gènes codant pour la chaîne lourde [185]. Les locus de ces gènes portés par le chromosome 14 chez l'humain, sont orientés selon la séquence codant pour les régions constantes des chaînes lourdes (IgH_c), à savoir dans l'ordre μ , δ , γ_1 , γ_3 , α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ et α_2 [184]. Lors de la commutation isotypique, il y a recombinaison non homologue entre la région variable des chaînes lourdes et leur région constante, par excision des séquences intermédiaires sous la forme d'une structure en tige boucle. Cette organisation génique permet de mettre en évidence, l'apparition de cellules B immature IgM⁺, à la sortie de la moelle osseuse, suivit des IgM⁺IgD⁺ et finalement des cellules IgG⁺, IgA⁺ ou IgE⁺ caractérisant leur ontologie respective en réponse à un stimulus donné. Généralement, ce processus de changement isotypique des chaînes lourdes d'Ig apparaît subséquemment, à la suite des réactions responsables de la maturation d'affinité [186], au niveau de la zone claire des centres germinatifs. Cependant, des études rapportent aussi un changement de classe, à la suite de la réponse extrafolliculaire, ayant lieu lors de l'activation des lymphocytes B, qui deviennent IgG⁺ [108, 187].

5.3 Devenir des lymphocytes B à la suite de la réaction du centre germinatif

Le but des centres germinatifs est la génération d'une réponse humorale efficace, spécifique à un antigène et capable de perdurer dans le temps. C'est à travers la génération de lymphocytes B mémoires et la formation de plasmablastes capables de se différencier en plasmocytes que l'organisme se protège contre les infections. Bien que les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes aient une origine similaire, leur fonction au sein de l'individu diffèrent largement tant d'un point de vue d'affinité pour l'antigène [188], que d'efficacité de sécrétion. Malgré cette

hétérogénéité fonctionnelle, les mécanismes menant à la formation des plasmablastes puis aux plasmocytes sont encore peu connus [189, 190]. L'hétérogénéité de la zone claire, ainsi que son perpétuel remaniement, rend difficile l'étude de ces cellules sans altérer directement leur environnement. Cependant, des études ont montré qu'une forte affinité des lymphocytes B pour un antigène, généré à la fin de la réaction des centres germinatifs, pouvait dicter leur progression en plasmocytes [191, 192]. Des essais ont montré que les différents niveaux d'affinité des BCR des lymphocytes B mémoires versus les plasmocytes pouvaient dépendre de leurs temps de résidence à l'intérieur des centres germinatifs [193, 194]. Finalement, plusieurs observations ont montré l'importance de l'environnement direct des lymphocytes B, telles des cytokines ou des interactions intercellulaires, à la fin de la réaction des centres germinatifs, concernant la destinée de celles-ci [189].

6. La réponse secondaire

La réponse secondaire correspond aux mécanismes mis en place lors d'une réexposition à un antigène préalablement rencontré. Induite par une faible quantité d'antigène, cette réaction permet l'établissement d'une réponse humorale rapide, efficace, avec des anticorps de grande affinité. Les acteurs impliqués dans l'initiation de la réponse secondaire sont les lymphocytes B mémoires générés lors de la réponse primaire. Les cellules mémoires à la source de cette réponse sont de type IgG⁺ ou IgA⁺ et les anticorps synthétisés ont déjà subi le processus d'hypermutation somatique [195].

6.1 Génération des lymphocytes B mémoires

Les lymphocytes B mémoires représentent 40% des cellules B totales circulant dans le sang [196]. Leur fonction de mémoire au sein de l'immunité humorale, en font les principaux acteurs générés lors du processus de vaccination. Lors d'une première rencontre avec un antigène deux grands mécanismes se mettent en place. Le premier vise à générer une réponse rapide pour neutraliser l'infection

(section 1.5). Le second est la création d'une réserve de cellules mémoires spécifiques à ce pathogène. Hormis les antigènes T indépendants de type 1, tous les antigènes sont susceptibles d'entraîner la formation d'une population de lymphocytes B mémoires [197]. Il existe plusieurs sous populations de lymphocytes B mémoires [198], qu'il est possible de distinguer selon le niveau d'hypermutation somatique (Tableau 1), l'isotype du BCR ou les marqueurs de surface comme CD27.

Classes de lymphocytes B mémoires retrouvées lors d'une activation TD

| | IgM | IgA | IgG | Longue vie |
|------------------------|-------------------|----------------|----------|---------------|
| Centre germinatif (GC) | GC/GCi | GC/GCi | GC/GCi | GC |
| Tropisme | Circulation | Circulation | Muqueuse | MO/muqueuse |
| HSM | Nul/faible | Nul/élevé | Élevé | Faible/ élevé |
| Durée de vie | Infinie | Année(s) | Inconnue | Infinie |
| Réactivation | GC à faible [IgG] | PB >> GC + CCR | PB >> GC | Aucune |
| Répertoire | Archive | Large | Inconnue | Étroit |

Tableau 1 : Les classes de lymphocytes B mémoires chez l'homme, organisées selon leurs isotypes. Tiré et traduit de Tarlinton et coll. [199]. HSM : hypermutation somatique, CCR : changement de classe par recombinaison, GCi : indépendant des centres germinatifs, PB : sang périphérique

6.1.1 Ontologie

L'étude des lymphocytes B mémoires suscite beaucoup d'intérêt et encore de nos jours plusieurs questions demeurent sans réponse (revue dans [192]). Certaines études suggèrent qu'une accumulation d'évènements stochastiques impliquant un signal de survie associé à un certain seuil d'affinité de leur BCR suffirait à leur formation (revue dans [200]). À ce jour, aucune analyse génomique n'a permis de

révéler l'existence d'un facteur de transcription unique à ces lymphocytes B mémoires [122]. Une première vague de ces cellules, apparaît quelques jours à la suite d'une première rencontre avec un Ag (Section 1.5.1). Dans ce cas, l'émergence de cette population mémoire provient d'une faible activation par les cellules T_{FH} [121], ainsi qu'un niveau initial d'affinité de leur BCR déjà élevé pour l'antigène ciblé. Heureusement, les mécanismes impliqués pour la génération de lymphocytes B mémoires au cours de la réponse secondaire sont mieux compris. Tel que décrit précédemment, à la fin de la réaction au niveau des centres germinatifs, il y a une diminution de l'expression de BCL6. Dans le cas des lymphocytes B mémoires, cette inhibition ne proviendrait pas de IRF4, mais de la présence d'IL-21 sécrétée par les cellules T_{FH} [201]. Le contact transitoire entre ces deux populations cellulaires, entraîne une activation partielle des lymphocytes B qui est responsable de l'apparition du caractère mémoire [202]. L'origine de ces lymphocytes mémoires est plus facile à scruter dans les modèles de souris. Chez la souris, l'expression forcée du gène *BCL-2*, un facteur de survie, ou de la protéine p53, un régulateur du cycle cellulaire et un facteur pro-apoptotique, entraîne une augmentation de la portion de lymphocytes B mémoires IgG₁⁺ [203, 204].

Les études sur l'ontologie des lymphocytes B mémoires ont porté essentiellement sur l'aspect métagénomique et sur les composantes du microenvironnement de ces dernières. Cependant, le type de métabolisme employé par ces cellules est révélateur de leur tropisme vers un rôle d'effecteur mémoire (revue dans [122]). Les cellules naïves présentent un métabolisme de type anabolique. Le glucose est alors la source première d'énergie au travers la glycolyse. Lors de la différenciation vers un effecteur mémoire, celles-ci entreprennent un changement métabolique de type catabolique. La dégradation des acides gras devient alors la source majeure d'énergie.

Ce passage est permis par l'activation de protéines kinases capable d'activer l'AMP (AMPK). Cette enzyme impliquée dans le processus d'autophagie est indispensable au maintien du caractère mémoire de ces lymphocytes [205].

6.1.2 Caractéristique phénotypique

Les études phénotypiques portées sur la caractérisation des lymphocytes B mémoires générés avant et après la formation de centres germinatifs ont révélé peu de variations. Ces cellules sont majoritairement positives pour les marqueurs CD11a, CD27, CD73, CD80, CD180 [128, 206-208]. Klein et coll. [196], proposent l'utilisation d'une sous unité du récepteur à l'IL-2, soit l'IL2R β , comme marqueur de la fin de réaction des centres germinatifs. Cette protéine est exprimée chez plusieurs populations cellulaires de la zone claire [209]. Le profil de prolifération ainsi que le niveau de maturation d'affinité des récepteurs sont aussi des indicateurs spécifiques à chaque population mémoire. La détection de l'expression de protéines impliquées dans les mécanismes d'hypermutation somatique confirme que ces lymphocytes sont bien issus des centres germinatifs [210]. Un article de Berkowska et coll. [198] a permis de mettre *en évidence* l'effet du nombre de divisions encourues par la cellule mémoire avec le niveau d'affinité de leur portion variable recombinée. Les lymphocytes exprimant les récepteurs CD27⁺ et ayant subi le changement de classe, présentent un nombre de cycles de réplication plus élevé que leur homologue CD27⁻ ou IgM⁺. Finalement, le niveau d'affinité des BCR augmente proportionnellement avec le nombre de cycles cellulaires effectués.

6.1.3 Fonction et sous-population de B mémoires

Tout comme leurs origines, le choix d'un lymphocyte B mémoire à synthétiser spécifiquement l'isotype d'un anticorps particulier est encore mal compris. Plusieurs facteurs, tels des interleukines, ou l'antigène lui-même sont amenés à jouer un rôle sur le devenir du lymphocyte mémoire. Une fois de plus, la majorité des études ont été réalisées chez la souris. À titre d'exemple, il a été montré que l'activation en présence l'IFN- γ était capable de former des lymphocytes B de type IgG_{2a}. La présence d'IL-4 tend à favoriser les isotypes IgG₁ et IgE. Enfin, le TGF- β est impliqué dans la sécrétion d'anticorps de type IgG_{2b} et IgA [22]. Chacune de ces cytokines, sécrétées par des T_{FH}, est donc impliquée dans la régulation et

l'expression du BCR [211, 212]. En parallèle aux cytokines, le type d'antigène rencontré par le lymphocyte est aussi déterminant pour leur changement isotypique. Les antigènes d'origines virales favorisent l'apparition d'IgG_{2a}, alors qu'une immunisation avec des protéines solubles entraîne une réponse de type IgG₁ [213].

Dans les centres germinatifs selon que les lymphocytes B mémoires ont subi ou pas le changement de classe, il est possible de prévoir leur fonction (Tableau 1). Les populations IgG⁺ sont impliquées majoritairement dans la génération de plasmocytes [210]. Réciproquement, leur homologue IgM⁺ généré lors de la réponse secondaire contribue essentiellement à la formation de nouveaux centres germinatifs [214]. Ces différences entre les cellules IgG⁺ et IgM⁺ proviennent des variations de la portion cytosolique de leur BCR respectif, qui est impliquée dans les voies de signalisation [215, 216]. En parallèle, des molécules de surface sont en mesure d'influencer la fonction de ces lymphocytes B. Par exemple, l'expression en surface des marqueurs CD80 et CD273 sur les cellules IgM⁺, favorise la génération de cellules aux caractères plasmocytes. Ces cellules IgM⁺CD80⁺CD273⁺ possèdent les mêmes caractéristiques que les populations activées de cellules IgG⁺ [217]. Paradoxalement, l'injection à une souris de lymphocytes B IgG⁺ générés *in vitro* et n'ayant pas été activés, entraîne la formation de novo de centre germinatif à l'intérieur des organes lymphoïdes secondaires, plutôt que de former une population de plasmocytes non spécifiques [157].

Le maintien des populations de lymphocytes B mémoires au cours du temps est encore sujet à plusieurs hypothèses. En effet, il est indispensable d'engendrer une réponse secondaire effective lors d'une nouvelle rencontre avec un Ag tout en conservant une population mémoire issue soit de la première, soit de la seconde réponse. Il a été montré que le maintien des lymphocytes B mémoires dans l'organisme était indépendant de la présence des antigènes [218], de la proximité de cellules T_H [219] ou finalement de l'existence de précurseur mémoire environnant [220]. Il est cependant rapporté que les niches de la région

périphérique aux centres germinatifs apparaissent les plus propices à la survie de ces cellules [221] qui peuvent se maintenir jusqu'à 5 mois à la suite de l'infection chez la souris [222]. Les cellules mémoires sont aussi présentes dans le sang, au niveau de la zone marginale de la rate [223] et finalement associées au MALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses) [224].

6.2 Les plasmocytes

La très grande majorité des immunoglobulines observées dans l'organisme sont synthétisées par des plasmocytes. Il s'agit du dernier stade de différenciation atteignable pour un lymphocyte B. Ces cellules ont perdu leur capacité de division et possèdent comme seule et unique fonction la génération d'Ig lors des réponses primaires et secondaires. Ces cellules sécrétrices d'anticorps trouvent leurs origines, à travers plusieurs régions de l'organisme : la zone marginale, la zone folliculaire et finalement le péritoine [225]. La nature de l'Ag et l'environnement cellulaire présents dans ces régions favorisent l'apparition de cellules sécrétrices d'anticorps dont la destination de migration déterminera leur devenir. Parmi les plasmocytes, il existe deux grands groupes de cellules sécrétrices d'anticorps que sont les plasmocytes à courte vie et ceux à longue vie. Cette première catégorie de cellules persiste quelques jours dans l'organisme [131]. Elles sont souvent appelées plasmablastes. Leur très grande capacité de sécrétion est de l'ordre de 10 000 molécules d'Ig sécrétées par seconde par cellule [226]. Il en résulte un important stress métabolique ce qui les pousse à rapidement entrer en apoptose [227]. Les plasmocytes à longue vie sont des acteurs fondamentaux de la mémoire immunitaire d'un individu. Formés à partir de la différenciation des plasmablastes, les plasmocytes à longue vie vont migrer au niveau de niches situées dans la moelle osseuse (MO). Le taux de sécrétion des plasmocytes à longue vie est plus faible que celui de leurs homologues à courte vie. Leur sécrétion se poursuit aussi longtemps que leur maintien au sein d'une niche de la moelle osseuse. Leur survie au sein de l'organisme peut durer des mois, des années voire toute une vie [220, 228]. Le cas des personnes qui ont survécu à l'épidémie de la grippe espagnole en 1918 est un excellent exemple. Des anticorps détectés chez ces individus âgés de

plus de 90 ans étaient capables reconnaître des épitopes présentés lors de l'épidémie de H1N1 en 1918 et en 2009 [229].

6.2.1 Les plasmablastes

6.2.1.1 Caractérisation phénotypique

L'intermédiaire cellulaire menant d'un lymphocyte B activé à un plasmocyte est le plasmablaste. Ces cellules sont observées dans le sang, et circulent pendant une courte période de temps [157]. Suite à des stimuli, elles vont être amenées à se différencier en cellules sécrétrices d'Ig et leurs survies va dépendre de leur capacité à trouver une niche de résidence [230]. La détection de ces cellules dans le sang et la lymphe est possible grâce à la détection de marqueurs par la technologie de la cytométrie en flux. Le consensus est l'expression à leur surface des marqueurs CD19⁺, CD27⁺⁺, CD38⁺⁺, CD45⁺ CD138^{+/-} et l'absence de CD20 [231-233]. Les molécules CD19, CD27 et CD45 sont des marqueurs déjà associés aux lymphocytes B [234-236]. Parmi ces protéines, CD38 est un marqueur révélant l'état d'activation des cellules. Il s'agit d'une ecto-enzyme capable d'hydrolyser l'ADP-ribose cyclique en ADP-ribose. Cette molécule intervient dans la régulation du calcium intracellulaire [237]. CD38 est aussi associée à des processus de régulation de transduction de signal et joue un rôle de molécule d'adhésion avec CD31 [238]. Le protéoglycan CD138, ou syndecan-1 est considéré comme le marqueur le plus important des plasmocytes [239]. Cependant, son expression n'est pas systématique chez cette population cellulaire, car l'absence de CD138 a été démontrée chez des petites populations de plasmablastes et de plasmocytes [240]. Le rôle de CD138 est relié aux mécanismes d'adhésion, de prolifération et d'interaction avec la matrice extracellulaire [241].

| Marqueur | Fonctions | Sous population cellulaire | | | Référence |
|----------|--|----------------------------|---------------|-------------|------------|
| | | Mémoires | Plasmablastes | Plasmocytes | |
| CD19 | Régulation de la stimulation du BCR | + | Faible | Faible | [233] |
| CD20 | Stabilisation du BCR | + | - | - | [242, 243] |
| CD27 | Récepteur de la famille des TNF | + | ++ | +++ | [234, 244] |
| CD31 | Adhésion, Migration et angiogenèse | - | -/+ | -/+ | [245] |
| CD38 | Transduction du signal et catalyse de cADP-ribose | -/+ | ++ | +++ | [238, 244] |
| CD39 | Régulateur du niveau d'AMP | +/- | +/- | - | [245, 246] |
| CD43 | Marqueur de résidence Migration | -/+ | S.O | +/- | [247] |
| CD45 | Marqueur des leucocytes. Prolifération Différenciation | + | + | -/+ | [245] |
| CD126 | Récepteur de l'IL-6 | -/+ | -/+ | + | [245] |
| CD138 | Adhésion, Migration, Différenciation | - | +/- | -/+ | [235] |
| Ki67 | Marqueur de la division cellulaire | + | + | -/+ | [235, 248] |

Tableau 2 : Les principaux marqueurs phénotypiques connus pour les lymphocytes B mémoires, les plasmablastes et les plasmocytes. Inspiré de Fink et coll. [231].

La détection d'une ectonucléotidase à savoir CD39 à la surface de plasmablaste est aussi un élément à considérer pour leur identification [245] (Tableau 2). En parallèle à ces marqueurs extracellulaires, il est possible de caractériser les plasmablastes en circulation de par leur capacité de prolifération par opposition à son absence chez les plasmocytes. Celle-ci est détectable soit par la mesure de l'expression de Ki67 un marqueur de cycle cellulaire actif, soit par la réalisation de culture in vitro [235]. Finalement, d'un point de vue moléculaire, le niveau d'expression de la protéine BLIMP-1 est intermédiaire à ce stade de la différenciation, pour devenir fortement exprimé chez les plasmocyte [175].

6.2.1.2 Capacité de migration

Les aptitudes de migration de plasmablastes en réponse à un stimulus sont déterminantes pour la poursuite de leur maturation. Dans un premier temps, leur sortie des centres germinatifs est possible grâce à l'augmentation du nombre de récepteurs CXCR4 à leur surface [249] et EB12 [250]. Ces protéines sont exprimées en réponse à un gradient de migration de CXCL12 et d'oxystérole respectivement, en présence d'IFN- γ [251]. Chez la souris l'importance de l'expression du récepteur 1 des sphingosines 1 phosphate (S1P1) et des intégrines β 2 a été démontré pour la sortie des plasmablastes vers les vaisseaux lymphatiques efférents [252]. La concentration plus importante de S1P dans la lymphe aurait un rôle chimiottractant. D'autres observations suggèrent que les molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1, déjà impliquées dans l'entrée au niveau des ganglions lymphatiques, pourraient aussi jouer un rôle dans les mécanismes de sortie [253].

6.2.2 Plasmocyte à courte vie

Pendant très longtemps les cellules capables de sécréter des Igs en réponse à une stimulation antigénique ont été considérées à courte vie [254]. Le maintien de la capacité de réplication des cellules alors étudiées dans un modèle murin favorisait l'hypothèse d'un renouvellement permanent de ces acteurs de l'immunité

humorale. Ainsi, la croyance était que l'entrée rapide de ces cellules sécrétrices en apoptose était palliée par la réplication et la différenciation de cellules aux caractéristiques similaires. Ce n'est que peu avant les années 2000 qu'une ségrégation entre les différentes sous populations de cellules sécrétrices d'Ig a pu être mis en évidence.

6.2.2.1 Génération et niches des plasmocytes à courte vie

Les plasmocytes à courte vie sont donc les premières cellules sécrétrices d'Ig générées à la suite d'une stimulation antigénique. Indépendantes de la nature de l'antigène, ces cellules sont formées au cours des réponses primaires et secondaires. Nous avons vu leur origine et leur rôle à la suite de la réponse extrafolliculaire. Cependant, l'optimisation de leur spécificité est obtenue plus tard à la suite du processus de maturation d'affinité. La maturation d'affinité des plasmocytes à courte vie survient à la suite de la réaction des centres germinatifs ou lors d'une exposition secondaire à un antigène et à partir de la différenciation de lymphocytes B mémoires en plasmocytes [157].

L'environnement des plasmablastes ou des plasmocytes nouvellement formés dépend de plusieurs facteurs dont l'isotype de l'Ig sécrété. Les plasmocytes de type IgA sont associés à une réponse située au niveau des muqueuses où ils représentent plus de 95% des cellules sécrétrices [255]. Les IgG sont observés préférentiellement en circulation ou au niveau des sites d'inflammation [256]. La migration de ces cellules est médiée par l'expression à leur surface, de molécule d'adhésion, ainsi que de récepteurs de chimiokines. À titre d'exemple, le chimiotactisme issu de CCL28 est essentiellement associé aux muqueuses [256]. En parallèle, les gradients de CXCL9/10 sont reliés à une réponse inflammatoire [256]. Malgré, l'existence de marqueurs spécifiques à la surface de ces plasmocytes, il est difficile de leur attribuer la caractéristique courte vie en se basant seulement sur le phénotypique. D'autres marqueurs moléculaires sont donc utilisés afin d'identifier cette sous-population cellulaire, notamment ceux impliqués dans la régulation du stress induit lors de la synthèse protéique.

6.2.2.2 Espérance de vie et réponse aux stress

L'espérance de vie des plasmocytes à courte vie est directement reliée à leur très forte sécrétion d'Igs. Celles-ci représentent 10 à 20% des protéines totales générées par la cellule et dont la régulation est médiée par la réponse UPR (*Unfolded protein response*) [257, 258]. La synthèse protéique intensive, associée à un déséquilibre du potentiel redox, favorise l'entrée de la cellule en apoptose [259]. La création d'un environnement oxydant est nécessaire à la génération des 10^5 ponts disulfures par seconde indispensable à l'assemblage des sous unités de l'Igs. Cette perturbation du potentiel redox est souvent lourde de conséquences pour la cellule [227]. L'une des hypothèses concernant leur entrée en apoptose est l'existence d'une compétition au niveau des protéasomes [260]. Le ratio de protéines poly-ubiquitinylées à dégrader versus la synthèse de facteur favorisant l'apoptose serait l'élément déterminant pour la survie de la cellule. Finalement, la régulation fine de protéinases à cystéine, telle la caspase 12, est associée aux mécanismes capables d'influencer l'entrée des plasmocytes à courte vie en apoptose [261].

6.2.3 Les plasmocytes à longue vie

Les plasmocytes à longue vie sont, avec les lymphocytes B mémoires, les acteurs majeurs de la mémoire humorale de l'organisme [262]. Leur existence est connue depuis la fin des années 1990 [228]. Les plasmocytes à longue vie représentent chez l'homme 0,25% à 1% des cellules totales de la moelle osseuse [263]. Ces plasmocytes sont responsables du maintien du niveau basal d'Igs détecté en circulation, et ce, en l'absence d'une stimulation antigénique. Comme les plasmocytes à courte vie, ces cellules sont issues de la différenciation des plasmablastes. Suite à un stimulus, elles vont migrer à travers l'organisme pendant au maximum une semaine, pour trouver une niche propice à leur différenciation en cellules à longue vie [157]. Deux niches sont connues pour leur potentiel à accueillir ces cellules : la rate et la moelle osseuse [264, 265]. Les plasmocytes à longue vie ont cependant un tropisme pour la moelle osseuse. La génération des

plasmocytes à longue vie est indépendante du type de stimulation antigénique encourue au cours de leur maturation [266]. Ainsi, tous les sentiers d'activation menant à la formation de plasmocytes sont en mesure de voir apparaître des cellules au caractère à longue vie.

La complexité de leur niche de résidence ainsi que la rareté de ces cellules les rendent difficiles à analyser *in vitro*. Pour ces raisons, les connaissances sur les plasmocytes de la moelle osseuse sont souvent issues de l'utilisation de plasmocytes au profil cancéreux généralement plus stable [267].

6.2.3.1 Mécanisme favorisant la survie des plasmocytes

Il existe plusieurs hypothèses quant aux éléments susceptibles d'influencer l'émergence de population de plasmocytes à longue vie. L'expression des récepteurs de l'IL-6 (IL-6R ou CD126), de APRIL (TACI) et finalement de CXCL12 (SDF-1R, CXCR-4 ou CD184) [268] sont des éléments clés à la pérennité de ces cellules dans l'organisme. L'expression de chacune de ces protéines est régulée par BLIMP-1 déjà impliqué lors de la différenciation en plasmocytes [175]. L'IL-6 et APRIL (ligand activateur de la prolifération) sont considérés comme des acteurs indispensables à la survie de ces cellules [269]. Il a été montré que la fonction pyrogénique de l'IL-6 joue un rôle sur le chimiotactisme de ces plasmocytes lors de la fièvre [270]. La génération de souris qui n'expriment pas APRIL, a révélé leur incapacité à former des plasmocytes à longue vie [271]. Des effets similaires ont été observés *in vitro* avec l'utilisation d'inhibiteur de APRIL, dans le cas de culture de plasmocytes [272]. De plus, ces observations ont été confirmées dans un modèle animal par l'utilisation d'anticorps anti-TACI, afin de neutraliser ce récepteur de APRIL [273]. Les résultats de cette étude ont montré une diminution de 60% du nombre de plasmocytes au niveau de la moelle osseuse. Dans ce cas, les cellules s'accumulaient plutôt au niveau de la zone germinative de la rate, ainsi que dans le sang [273]. Enfin, la molécule CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) possède une fonction chimiotractante, et son gradient de concentration attire les plasmocytes vers la moelle osseuse, mais aussi vers la rate [274]. Très peu

d'études ont permis de mettre en évidence le remaniement transcriptionnel que subissent les plasmocytes au cours de leur migration vers la moelle osseuse [275, 276]. Cependant, une récente étude avance que l'expression du facteur de transcription c-myb est nécessaire pour permettre le déplacement de ces cellules vers la moelle osseuse [277].

De plus, CXCL-12 est sécrétée par des cellules présentes au niveau de niches spécifiques. Leur potentiel attractif sera donc perçu seulement par les plasmocytes en mesure de capter efficacement ce signal par l'expression du récepteur CXCR4 [278]. Ce mécanisme a pour effet de sélectionner un nombre restreint de plasmocytes, car ces cellules vont entrer en compétition pour les niches dont le nombre est limité dans la moelle osseuse [279]. Ces nouveaux plasmocytes générés sont amenés à remplacer les précédents occupants de ces niches [280].

6.2.3.2 Caractéristique phénotypique

D'un point de vue phénotypique, aucun marqueur de surface à ce jour n'a permis de différencier clairement les plasmocytes à longue vie de ceux à courte vie. Les marqueurs présents à la surface de ces cellules sont CD19⁺, CD31⁺, CD38⁺⁺, CD45^{-/+}, CD126⁺, CD138^{-/+} [245]. La molécule CD31, exprimée chez les plasmocytes matures, est impliquée dans les processus de migration, d'adhésion et d'angiogenèse [281, 282]. La protéine CD126 (ou IL-6R) et gp130, sont toutes deux des sous-unités du récepteur de l'IL-6. Leur expression est augmentée au stade des plasmocytes [245]. Les marqueurs CD38 et CD138 sont des marqueurs majeurs pour la caractérisation des plasmocytes (Tableau 2). Parallèlement aux études phénotypiques, des analyses du profil transcriptionnel permettent aussi de comparer différentes populations de lymphocytes B incluant les plasmocytes [283, 284]. Étonnamment, en plus des récepteurs décrits plus haut, les cellules sécrétrices d'Ig_s présentent systématiquement une augmentation de l'expression de gènes codant pour des molécules d'adhésion, dont CD137, CD317, EpCAM, CD166 et FNDC3B [284]. Ces molécules sont impliquées dans des processus

d'adhésion et aussi de différenciation et pourraient aider à mieux identifier les plasmocytes à longue vie.

6.2.4 Génération in vitro

Il est possible de nos jours de générer in vitro des cellules sécrétrices d'anticorps à partir de la différenciation de cellules B naïves [86, 285-287] ou mémoires [127, 288]. Seulement, deux études ont rapporté l'apparition et/ou le maintien d'une population de plasmocytes à longue vie aux caractéristiques similaires aux plasmocytes de la moelle osseuse [269, 289]. De manière générale ces études visent à se rapprocher des conditions observées in vivo, en suivant des séquences de stimulation et d'interactions spécifiques chargées de recréer lors de la phase finale l'environnement de la moelle osseuse dans une niche spécifique. Plus spécifiquement, dans leur étude Cocco et coll. [289] ont par l'intermédiaire d'une lignée de cellule stromale mésenchymateuse de souris, M2-10B4, permis le maintien en culture jusqu'à 60 jours de plasmocytes CD38⁺CD138⁺ à partir d'une population de lymphocytes B CD27⁺. L'étude réalisée par Jourdan et coll. [269], utilise des cellules mésenchymateuses humaines purifiées à partir d'amygdales, elle aussi sur une période de 60 jours. Au-delà de la caractérisation phénotypique basée sur les marqueurs CD38⁺CD138⁺, les plasmocytes obtenus lors de ces deux études présentent une expression constitutive des gènes *Blimp1* et *IRF4* (Fig. 7), caractéristiques des cellules de la moelle osseuse.

7. Environnement de la moelle osseuse

La moelle osseuse est la source principale de cellules souches hématopoïétiques de l'organisme [290]. Il s'agit d'un environnement complexe, innervé et vascularisé, situé généralement dans la région trabéculaire de l'os. L'agencement structural et dynamique de ce tissu mène à la formation de microenvironnement propice au développement de populations cellulaires essentielles dont les cellules souches et les plasmocytes [36, 151, 291]. Le stroma de la moelle osseuse est majoritairement constitué de cellules mésenchymateuses, d'adipocytes et

d'ostéoblastes [255, 292-294]. Cet environnement est aussi le centre de résidence des cellules responsables de la mémoire immunologique [295], tels les plasmocytes et les lymphocytes T CD4⁺ mémoires [228, 296]. La moelle osseuse abrite donc les niches de survie pour la mémoire immunologique et ses fonctions sont directement liées à la combinaison de facteurs solubles ou cellulaires. La complexité des acteurs formant ces niches impliquant plusieurs types de cellules est illustrée à la figure 8 pour les plasmocytes [297].

7.1 Niche

Les plasmocytes de la moelle osseuse sont en contact direct avec le stroma de la moelle osseuse. Les cellules mésenchymateuses, aussi appelées cellules stromales du mésenchyme, tapissent la niche et jouent un rôle structural pour l'ancrage des plasmocytes (Figure 8) [151]. Elles sont présentes à un ratio d'environ deux cellules par plasmocyte [298]. Ces cellules réticulaires expriment à la surface de leurs dendrites, des molécules d'adhésion telles le CD106 (VCAM-1), la lamine, la fibronectine et le collagène de type I et III [297]. Du côté des plasmocytes les principales protéines impliquées dans l'adhésion sont le VLA-4 (*very late antigen 4*), le CD44 et le LFA-1 (*leukocyte function associated antigen 1*) [299]. VLA-4 reconnaît la protéine V-CAM1, exprimé à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse [300]. Le marqueur CD44 est impliqué dans le rôle d'adhésion avec la matrice extracellulaire au niveau de la moelle osseuse. Initialement présent à la surface des cellules souches hématopoïétique, CD44 est défini comme le récepteur de résidence de la moelle osseuse [301]. Les cellules stromales génèrent aussi une matrice extracellulaire de glycoprotéines liant entre autres la molécule CD138 (syndecan-1) présente sur les plasmocytes [302]. L'importance des molécules d'adhésion dans cette niche a été démontrée chez la souris, par le blocage de la liaison de LFA-1 et VLA-4 qui entraînaient une dissociation des plasmocytes [303]. Toutes ces interactions cellules-cellules constituent la base de la niche telle qu'observée dans la moelle osseuse.

7.2 Composition du microenvironnement

7.2.1 Les cellules stromales

En parallèle à l'implication de leurs molécules d'adhésion, les cellules stromales sécrètent des cytokines impliquées dans le chimiotactisme et la survie des plasmocytes, tel le CXCL12 (section 1.6.1.2). [304, 305] (Figure 8). Les plasmocytes de la moelle osseuse expriment le récepteur de CXCL12 soit, CXCR4 [249]. Cette interaction est cruciale pour leur maintien au niveau de cet environnement, et a été démontrée dans un modèle de souris déficiente pour CXCR4 [306].

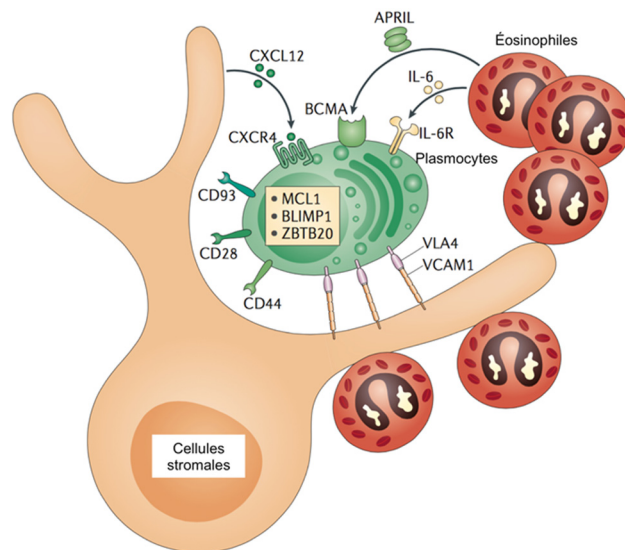


Figure 8 : Représentation schématique de la niche de survie des plasmocytes dans la moelle osseuse. Tiré et traduit de Nutt et coll. [151]. La survie des plasmocytes à longue vie dépend de l'expression de signaux spécifiques émanant des cellules stromales et des éosinophiles.

Les cellules stromales constituant ces niches sécrètent aussi des facteurs favorisant la survie et le maintien des cellules sécrétrices d'immunoglobulines. Parmi ces molécules APRIL, IL-6, mais aussi le TNF et de l'IL-10 jouent un rôle

crucial [305]. Finalement, ces cellules stromales sont essentielles autant pour la structure de la niche que pour la migration des plasmocytes qui vont s'y installer.

7.2.2 Les éosinophiles

Outre les cellules stromales, d'autres types cellulaires sont aussi observées au sein de ces niches spécifiques. Bien que leurs fonctions divergent d'un rôle structural, ces cellules participent activement au maintien des plasmocytes au niveau de la moelle osseuse. L'un de ces acteurs sont les éosinophiles, qui font partie intégrante de la niche [307]. Les éosinophiles sont des cellules du système immunitaire inné. Ils sécrètent de l'histamine, luttent contre les infections parasitaires et jouent un rôle dans les allergies et l'inflammation [308, 309]. Leur présence au sein de la moelle osseuse s'explique par la différenciation des myéloblastes en granulocytes avant leur migration dans les tissus [310]. La génération en grand nombre de ces cellules dans la moelle osseuse permet de maintenir leur niveau constant dans l'environnement des plasmocytes. Les éosinophiles sécrètent l'IL-4, l'IL-6 et APRIL, toutes impliquées dans la survie à long terme des plasmocytes [280, 311] (Figure 8). Ces cellules sécrètent aussi des protéines basiques majeures (MBP ou PRG2) qui influencent le maintien des plasmocytes dans la moelle osseuse [307]. Ce sont des observations réalisées sur des coupes transversales de fémur murin, qui ont mis en évidence la présence d'éosinophiles MBP⁺ à proximité des plasmocytes [312]. De plus, des études chez la souris, ont démontré que l'absence d'éosinophiles activés au sein de la moelle osseuse entraînait l'apoptose des plasmocytes.

Actuellement, des études indiquent que plusieurs autres types de cellules constituent l'environnement des niches des plasmocytes. Ce sont des mégacaryocytes, des basophiles, des monocytes ainsi que des cellules dendritiques [71, 271, 313, 314]. Ces études montrent aussi que ces cellules sont toutes reliées à la survie des plasmocytes au niveau de la moelle osseuse. Ces derniers éléments contribuent à la complexité et la diversité des interactions cellulaires et solubles pouvant régler la survie des plasmocytes.

7.3 L'oxygène in vivo et in vitro

Outre la contribution cellulaire des niches, la moelle osseuse présente une caractéristique différente des autres tissus et du sang quant à la disponibilité en oxygène (Figure 9). Les connaissances actuelles sur les niches de la moelle osseuse et l'implication des niveaux d'oxygène sont majoritairement reliées à la compréhension de la physiologie des cellules souches (revu dans [315, 316]). En fait, les cellules souches hématopoïétiques et le système immunitaire partagent les niches de la moelle osseuse [280, 317]. L'environnement de la moelle osseuse résulte d'une faible capacité de l'oxygène à diffuser, et ce, malgré sa vascularisation. Il s'en suit alors une diminution de la concentration de O₂ au fur et à mesure de l'éloignement des vaisseaux sanguins [318]. Au niveau de la moelle osseuse, la pression en oxygène varie de 1% à 7% [319]. Dans l'organisme, la concentration en oxygène normale varie entre 3% et 13% de O₂ et correspond aux conditions normales d'un point de vue physiologique [320]. Par opposition l'atmosphère, formée à 21% de O₂ est considérée comme un environnement hyperoxidant pour les cellules [321, 322].

La nomenclature relative à la concentration en O₂ peut être donnée selon son pourcentage de saturation (ex. 20,9%), ou selon la pression partielle en O₂, qui est de 160 mmHg dans l'air. Dans un liquide, le pourcentage reflète le rapport sur la quantité maximale de ce gaz dissout. Il est possible d'exprimer cette valeur en ppm (partie par million) ou en mg/ml (quantité de O₂ dissout par volume) [323].

De nombreuses études sur les cellules souches hématopoïétiques ont permis de mettre en évidence l'importance du contrôle du niveau d'oxygène dans un environnement in vitro [324-326]. Dans l'organisme, ces cellules sont présentes au niveau des niches de la moelle osseuse [291] dont le niveau d'oxygène observé est un peu plus faible que l'ensemble des régions de la moelle osseuse (Figure 9). Au cœur de ces sites spécifique, le taux d'oxygène varie entre 1,5% et 4,2% [327]. La culture in vitro des cellules souches en présence d'une faible concentration en O₂ (3%), permet de conserver leur capacité à régénérer toutes les composantes du

système hématopoïétique [292, 326]. Cependant lorsque ces cellules sont soumises à des concentrations de 21% d'O₂, dans des conditions de culture identiques, elles perdent cette capacité [326, 328]. Toujours dans un environnement in vitro, les cellules souches soumises à des variations du niveau d'oxygène sont influencées au niveau des processus de réplication et de régulation du cycle cellulaire [329, 330]. Ces différences de comportement observées par la simple variation du niveau de O₂, sont imputables à son rôle régulateur dans de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la progression en différenciation ou en renouvellement des cellules souches [320].

8. Stress oxydatif et physiologie cellulaire

Un environnement hypoxique, tel que normalement présent dans l'organisme, est habituellement associé à un niveau plus faible de molécules aux propriétés oxydantes, responsable d'un stress oxydatif, ce qui est néfaste pour la cellule [325, 331]. Cependant, de récentes études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un rapport plus complexe entre ces espèces réactives à l'oxygène (ROS) et les éléments médiateurs de l'équilibre physiologique [332, 333]. À l'échelle cellulaire, l'hypoxie se traduit généralement par un ralentissement de la prolifération, pouvant conduire à l'apoptose [334]. Cette modification physiologique est due à la mise en place d'une réponse de la cellule face à ce déficit en oxygène qui se traduit par l'activation de la protéine HIF (*hypoxia induced factor*) [335, 336]. Ce facteur de transcription est un régulateur majeur des voies de signalisation activé dans ces conditions [337].

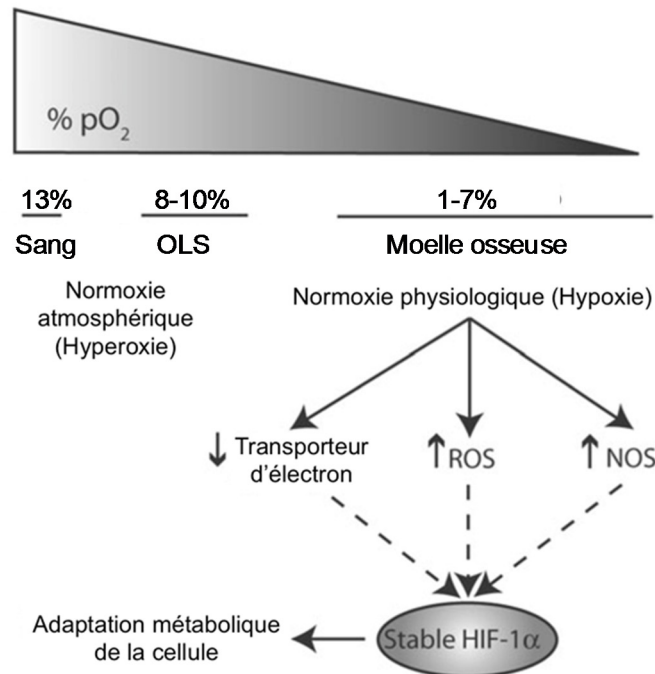


Figure 9 : Niveaux d'oxygène dans l'organisme et leurs répercussions sur les éléments régulateurs du stress oxydatif encouru par la cellule. Inspiré et traduit de Bertolotti et coll. [333] et Gnaiger, 2003 [319]. OLS : organes lymphoïdes secondaires, ROS : espèces réactives à l'oxygène, NOS : espèces réactives à l'azote.

8.1 Accommodation métabolique

La protéine HIF est un hétérodimère présent en 3 isoformes, HIF-1, HIF-2 et HIF-3, chacun formé de deux sous unités, HIF- α et HIF- β [338]. La susceptibilité de cette protéine à l'oxygène provient de la sous-unité alpha qui est rapidement dégradée à la suite de son apparition dans le cytoplasme dans des conditions d'oxygène supérieures à 3% [339, 340]. Cette dégradation est initiée par la reconnaissance avec la protéine PHD (prolyl-hydroxylase), qui va engendrer une hydroxylation de résidu spécifique, permettant alors la reconnaissance sous-jacente de la protéine pVHL (*Von Hippel-Lindau tumor suppressor*). Cette dernière possède une fonction ubiquitine ligase, chargée de polyubiquitiner la sous unité α , menant alors à sa dégradation au niveau des protéasomes. En condition d'hypoxie, l'activité hydroxylase de la protéine PHD est inhibée, ce qui entraîne une accumulation de HIF dans le cytoplasme. Celle-ci va alors subir une translocation dans le noyau,

afin de lier sa sous-unité β . La protéine ainsi fonctionnelle est dès lors capable de reconnaître de manière spécifique des promoteurs HREs (*HIF responsive element*) impliqués dans la réponse aux conditions d'hypoxie. Parmi la multitude de gènes régulés par HIF, l'on notera PDK1 (pyruvate déshydrogénase kinase) [341]. Cette enzyme permet de diminuer la consommation d'oxygène de la mitochondrie, notamment au niveau du cycle de Krebs, lors de la réduction des facteurs tels que FAD^+ ou NAD^+ . D'un point de vue métabolique, la glycolyse en anaérobie ainsi que la β -oxydation des acides gras verront leur activité augmenter dans ces conditions en raison de leur faible consommation en O_2 [342].

Une autre série de gènes qui peuvent être activés par HIF sont des kinases dépendantes de cycline, tel CDKN1A. Ces enzymes sont responsables du ralentissement de la prolifération, via leur implication pendant la phase G1 du cycle cellulaire [343]. La principale utilisation de l'oxygène au sein de la cellule est son implication dans la génération d'ATP, dont la synthèse est rapidement diminuée en hypoxie. Une hiérarchie de consommation d'énergie se met alors en place, dont les premières touchées sont la transcription d'ARN ainsi que la synthèse protéique [344], ayant pour conséquence directe un ralentissement de la prolifération.

Le rôle de HIF a été démontré lors de nombreux processus physiologiques. Ce facteur de transcription est impliqué dans la sécrétion d'EPO (érythropoïétine), qui favorise la synthèse de novo d'érythrocytes afin de faciliter l'apport d'oxygène aux organes cibles [345]. L'expression de HIF est détectée lors du développement placentaire, afin de réguler l'expression des gènes impliqués lors de l'angiogenèse. [346]. Finalement, la susceptibilité de cette protéine à l' O_2 lui confère les atouts nécessaires à l'activation de mécanisme favorisant l'oxygénation d'un tissu d'intérêt.

8.2 Répercussions métaboliques

Nous avons vu que les variations de conditions de niveau d'oxygène physiologiques avaient un effet majeur sur la physiologie de la cellule, cependant,

il n'en demeure pas moins vrai pour les conditions atmosphériques. Dans les conditions in vitro ou ex vivo, l'air présente une concentration en O₂ de 20,9%. Cette molécule au caractère électronégatif est responsable du maintien de la balance redox à l'intérieur de la cellule, notamment par une régulation très fine de la synthèse d'espèce réactive à l'oxygène (ROS) [347]. Il est possible d'estimer que 0,1% à 2% de l'oxygène consommé par la cellule est à l'origine de la formation de ces composés [348]. Ces molécules aux propriétés hyperoxydantes possèdent dans leur structure un atome d'oxygène qui présente dans sa couche externe des électrons de valence non appariés [349] (Figure 10). Il en résulte des éléments instables susceptibles de transférer leur électron surnuméraire à des atomes ou groupements pouvant alors affecter leur agencement ou fonction.

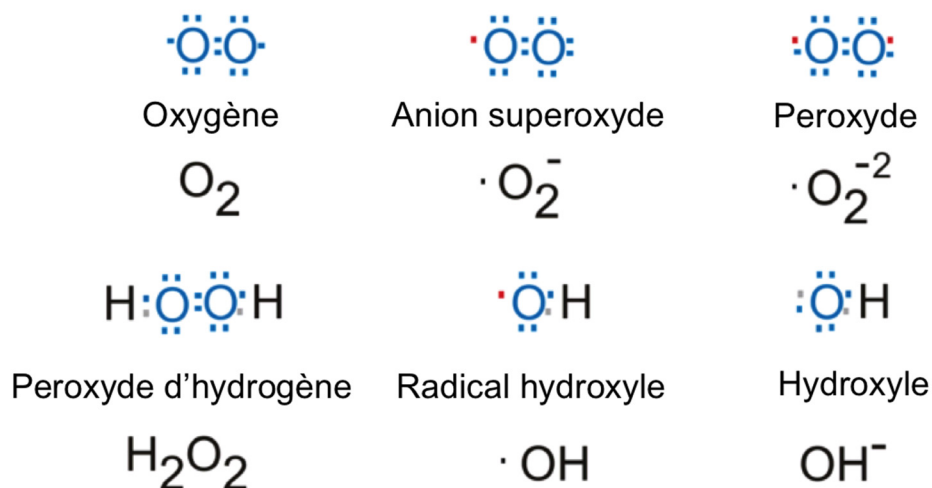


Figure 10 : Structure électronique des espèces réactive à l'oxygène les plus couramment observées dans l'organisme. Tiré et traduit de Held [349].

8.2.1 Origine des espèces réactives à l'oxygène (ROS)

Les ROS présents au sein de la cellule proviennent en grande majorité de la chaîne de transport d'électron située au niveau de la membrane interne des mitochondries (Figure 11). La fonction première de cette chaîne respiratoire est la

synthèse d'ATP, par un procédé appelé la phosphorylation oxydative. Concrètement, il s'agit d'une chaîne de transporteur de proton, chargé de créer un différentiel de pH au travers de la membrane pour permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP. Bien que la chaîne respiratoire présente quatre complexes distincts, deux de ces complexes sont majoritairement responsables de la synthèse de ROS. Il s'agit des complexes I et III. Le complexe I est une NADH réductase qui permet la réduction d'une flavine mononucléotide (FMN) à partir d'une NADH. Lors de cette réaction, l'oxygène apparaît comme le meilleur accepteur final d'électron menant à la formation d'un anion superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$. Au niveau du complexe III, il s'agit de la catalyse de la réduction d'un cytochrome c, via l'oxydation du coenzyme Q qui mène à la formation de ROS. Les électrons transférés au complexe IV au cours de cette réaction peuvent dans certains cas être captés par une molécule de O_2 [350]. Cette étape de la chaîne respiratoire est la principale source d'espèce réactive à l'oxygène (ROS) dans la cellule [351]. Il est à noter que le complexe II de la chaîne respiratoire possède aussi la capacité de générer des ROS dans certains cas [352].

À la sortie de la chaîne respiratoire, le radical libre trouvé est essentiellement l'anion superoxyde (O_2^-). Cependant, de par son instabilité thermodynamique, celui-ci subit rapidement une réaction de dismutation, catalysé par un superoxydismutase. Cette enzyme va alors permettre la synthèse d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en parallèle avec une molécule de dioxygène (O_2) à partir de deux molécules d'anion superoxyde (O_2^-) et de deux protons [353] (Figure 11). Bien qu'un fort potentiel oxydatif soit toujours généré par le H_2O_2 , celui-ci s'avère plus stable et moins invasif que son prédécesseur.

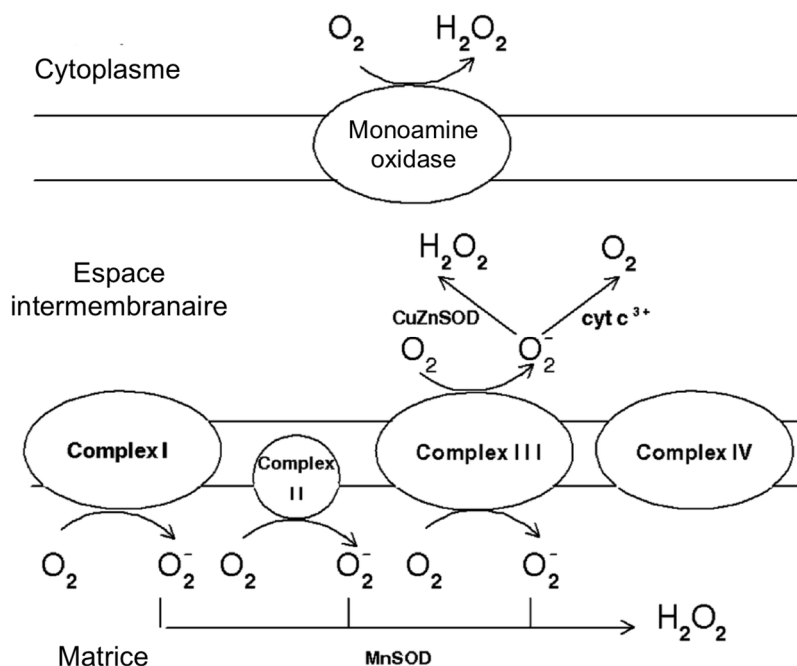


Figure 11 : Site de formation des ROS à travers la chaîne respiratoire. Tirée et traduit de Turrens et coll. [353].

Il existe d'autres sources non négligeables de ROS au sein de la cellule. Le peroxysome, un organe chargé de la détoxification cellulaire, est impliqué dans les mécanismes d'oxydation des acides gras et la synthèse d'acides aminés. Ce mécanisme, régulé par des oxydases, entraîne la synthèse de peroxyde d'hydrogène et d'ions superoxydes [354]. D'autres groupes d'enzymes appelés NOX et DUOX, qui possèdent une activité NADPH oxydase, sont aussi reconnus pour leur contribution dans la synthèse de radicaux libres au sein de la cellule. La particularité ici, est la présence de ces protéines au niveau de la membrane plasmique, dont la seule fonction apparente est la génération de ROS à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule [355].

Les mécanismes de repliement oxydatif des protéines en cours de synthèse à l'intérieur de l'appareil de Golgi sont aussi une source majeure de ROS. L'oxydation de groupement thiol, menant à la formation de pont disulfure, est une

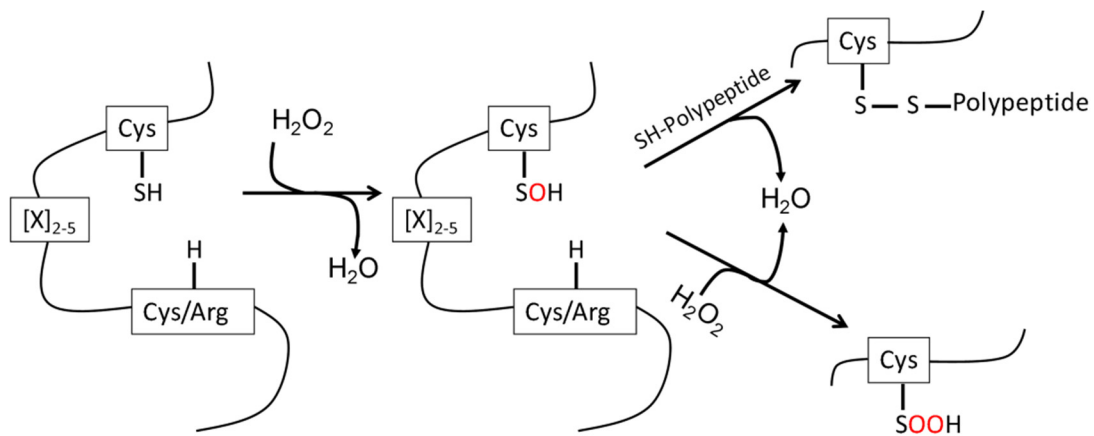
source non négligeable de radicaux libres. Lors de la synthèse d'IgM, la concentration des ROS à l'intérieur de la cellule est en proportion équimolaire à la quantité de ponts disulfures formés [356]. Il a été mesuré que des plasmocytes capables de sécréter des anticorps formaient 10^5 ponts disulfures par seconde par cellule, ce qui implique l'apparition de 10^5 molécules de H_2O_2 comme produit dérivé [357]. Finalement, certains facteurs exogènes tels les rayons UV ou l'irradiation peuvent promouvoir la génération de ROS à l'intérieur de la cellule [358], notamment via la perturbation des mécanismes mise en place pour réguler la balance redox.

8.2.2 Rôle des ROS

Les ROS sont associés dans l'organisme à plusieurs pathologies, tels le cancer [359], le diabète [360] et certaines maladies neurodégénératives [361]. Les ROS interviennent notamment dans le processus du vieillissement [362]. Cependant, ces radicaux libres s'avèrent aussi physiologiquement indispensables lors de la régulation des voies métaboliques associées aux mécanismes de différenciation, de réponse immunitaire et d'autophagie [363]. Il a été montré que les ROS jouaient un rôle majeur lors de la mise en place des mécanismes de différenciation et de sécrétion des lymphocytes B mémoires en plasmocytes [364]. Afin de bien comprendre le rôle de ces molécules pro-oxydantes, il est important de décrire leurs mécanismes d'action. Les premiers éléments sensibles à l'oxydation au sein de la cellule sont les résidus cystéines. Cet acide aminé possède à l'extrémité de sa chaîne latérale un groupement thiol (-SH) le rendant extrêmement sensible à l'oxydation [365]. Cette particularité rend cette molécule très intéressante d'un point de vue réactionnel. La cystéine est impliquée au niveau de nombreux sites actifs enzymatiques, telles des phosphatases (Figure 12) [366]. En parallèle, son extrême sensibilité à l'oxygène en fait l'un des éléments clés dans la génération de molécules aux caractéristiques antioxydantes synthétisées par la cellule. Concrètement, l'oxydation d'une cystéine se traduit soit par la génération d'un pont disulfure, si une seconde cystéine se trouve à proximité, soit par la formation d'un groupement sulfénique (-SOH). En l'absence d'un groupement thiolate à proximité

et de par son instabilité, ce dernier poursuit alors son oxydation pour générer un groupement sulfinique (-SO₂H) puis sulfonique (-SO₃H), dont la réduction est alors impossible dans les conditions physiologiques [367].

En parallèle à la sensibilité des groupements cystéines des protéines, les ROS sont aussi susceptibles d'engendrer des perturbations au niveau de l'ADN [368]. Brièvement, ces radicaux libres sont capables de reconnaître et oxyder les liaisons C-H, des portions 2'-désoxyribose des acides nucléiques [369]. À noter que d'autres altérations plus spécifiques affectant chaque base azotée peuvent aussi être observées. Finalement, de par leur polyinsaturation, les acides gras membranaires apparaissent sensibles à ces molécules hyperoxydantes. Les radicaux hydroxydes reconnaissent certaines doubles liaisons pour générer au final une molécule d'eau et un groupement peroxyde (R-OOH). On parle alors de la peroxydation des lipides, qui peut entraîner une instabilité de la membrane plasmique [370].



Site actif d'une phosphatase

Figure 12 : Oxydation d'un résidu cystéine situé à l'intérieur du site actif d'une phosphatase en présence de ROS. Tiré et traduit de Groeger et coll. [366].

D'un point de vue physiologique, les ROS sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation [371]. Chez les lymphocytes B, ces molécules sont fondamentales notamment lors de l'activation des TLRs (récepteur de type Toll) et des BCR. Les TLRs, à la suite de leur activation (telle la fixation de LPS), vont venir s'associer

avec une NADH oxydase et engendrer une production de ROS [372]. Ces derniers sont impliqués dans la levée de l'inhibition de la voie AP1 (protéine activée 1) et l'activation de la voie Nf-kB, chargée de réguler des mécanismes de prolifération et de différenciation de la cellule [373, 374]. Dans un même ordre d'idée, les BCR possèdent dans leur environnement une NADH oxydase, chargée de générer des ROS qui inhibent l'action phosphatasique de certaines enzymes situées à proximité. La stimulation de ce récepteur entraîne l'activation de protéines kinases, chargées d'activer des voies de signalisation telle Nf-kB [375, 376].

8.2.3 Régulation des ROS

La capacité des ROS à diffuser au travers des membranes nécessite de nombreux mécanismes permettant le contrôle de leur formation. L'un des principaux acteurs de ces mécanismes est le facteur de transcription Nrf2. Cette protéine est capable d'activer la transcription de gènes directement impliqués dans le maintien du potentiel redox [377]. Ces réponses engendrent l'activation de mécanismes enzymatiques, ou la formation de molécules aux propriétés antioxydantes. Parmi ces acteurs enzymatiques, on distingue la peroxyredoxine (Prx4), qui joue un rôle majeur dans la réduction du peroxyde d'hydrogène en H₂O. Cette protéine est primordiale lors du processus de différenciation des plasmocytes, ainsi que lors de la production d'immunoglobulines [378]. Une autre molécule aux propriétés antioxydantes et présente abondamment au sein de la cellule est le glutathion. Il s'agit d'un tripeptide, formé d'un glutamate, d'une cystéine et d'une glycine. Le groupement thiol de la cystéine du second acide aminé possède un rôle réducteur, capable de reconnaître et réduire les ROS. Ce peptide peut jouer un rôle directement au sein du cytoplasme ou de la mitochondrie, et peut aussi être impliqué dans des modifications post-traductionnelles afin de protéger des groupements fonctionnels sensibles à l'oxydation.

Finalement, la régulation de la quantité de cystéines présente à l'intérieur de la cellule est régulée par un antiporteur glutamate-cystine [379]. Le milieu extra cellulaire est un environnement oxydatif, en raison de l'absence de mécanisme de

régulation ainsi que l'accumulation de molécules aux propriétés oxydantes tel l'oxygène [380]. Les acides aminés cystéines ont, dans ces conditions, tendance à se dimériser au niveau de leur chaîne latérale et à former des ponts disulfures. Cette réaction mène à la génération de cystine. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces molécules sont réduites sous l'action de thioredoxine qui va libérer deux cystéines. Ces acides aminés sont utilisés soit dans le processus de biosynthèse de protéines ou de polypeptide tel le glutathion.

8.3 Relation ROS et lymphocytes B

Dans l'organisme, les cellules souches, les lymphocytes T et B ainsi que les plasmocytes sont sensibles au ROS dans leur environnement [381]. Dans le cas des lymphocytes B, la présence de molécules aux propriétés pro-oxydantes est indispensable dans les processus de prolifération et de différenciation [382]. Dans un premier temps, l'activation des lymphocytes B à la suite d'une stimulation antigénique au niveau du BCR, est dépendante de la génération de ROS [375]. Des tests d'activation réalisés *in vitro* en présence d'antioxydants, tel le N-acétylcystéine, ont montré un ralentissement de la prolifération des lymphocytes B dans les conditions traitées [383, 384]. Lors du processus de différenciation, les cellules des centres germinatifs présentent un niveau important de molécules antioxydantes [385] signe de leur réponse à un important stress oxydatif [386]. En effet, les réarrangements géniques, associés à un remaniement de l'activité métabolique, entraînent une dérégulation de la balance redox dans les centres germinatifs. Pour se protéger, les lymphocytes B de cette zone, vont synthétiser des composés antioxydants, tel du glutathion, du N-acétylcystéine ou des éléments enzymatiques comme la peroxyrédoxine [387]. L'ajout de N-acétylcystéine exogène à des cultures de lymphocytes B mémoires a permis de révéler l'importance de ces molécules pour leur prolifération et leur différenciation [100]. Ces cellules, mises en présence de l'antioxydant, subissent une diminution de leur prolifération et de leur sécrétion d'Ig. En parallèle, une amélioration de la viabilité confirme un effet protecteur contre les ROS. Finalement, plusieurs études ont permis de mettre en évidence le lien entre l'importance du potentiel redox et le

processus de différenciation des lymphocytes B [333, 364, 388, 389], suggérant de ce fait que l'utilisation d'antioxydant pourrait permettre une fine régulation de l'évolution in vitro de ces cellules.

9. Culture in vitro des lymphocytes B

La capacité des lymphocytes B à sécréter des anticorps est à la base de l'intérêt que lui porte la communauté scientifique. La préparation de grandes quantités d'anticorps sur demande a été à la source des modèles développés pour leur culture in vitro et Jacques Banchereau avait proposé cette vision déjà en 1991 [390]. Plusieurs modèles de culture in vitro des lymphocytes B humains ont été mis au point et ils sont basés majoritairement sur l'interaction entre les lymphocytes T et les lymphocytes B et utilisent la liaison entre le CD154 et le CD40 [391-393]. Ces méthodes visent à générer dans un environnement contrôlé des conditions similaires à celles des centres germinatifs. La stimulation des récepteurs CD40 est apparue indispensable pour la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes B in vitro (revue dans [63]). Les travaux de notre équipe montrent que le modèle in vitro basé sur la stimulation CD40-CD154 influence l'évolution des lymphocytes B selon la fine composition de l'environnement [80, 86, 100, 127, 394-396]. Selon l'intensité de l'interaction CD40-CD154 et la présence des populations naïves et/ou mémoires présentes en culture, le niveau d'expansion et de différenciation des lymphocytes B peut varier [86]. Dans le cas de culture avec une forte interaction CD40-CD154, les cellules naïves conservent leur capacité de prolifération et de différenciation en cellules sécrétrices alors que les mémoires entrent rapidement en différenciation et disparaissent [394]. Dans ce même contexte d'étude, les cellules naïves expriment CD70 et favorisent la différenciation des lymphocytes B mémoires CD27⁺ via une interaction entre CD27 et CD70 [397]. Ces observations ont permis de mettre en évidence que les cellules naïves prenaient rapidement le dessus sur les cellules mémoires en culture pour devenir à leur tour CD27⁺ [394], rendant impossible la distinction des mémoires et naïves initiales. La purification avant la mise en culture des lymphocytes B mémoires a

donc permis de palier à ce problème. Ainsi, des études plus poussées de culture de lymphocytes B mémoire IgG⁺ ou IgA⁺ a permis de se rapprocher des conditions rencontrées au niveau des centres germinatifs lors d'une réponse secondaire [395, 398]. Dans ces conditions in vitro, il est possible de maintenir le caractère réplicatif des lymphocytes B mémoires et aussi de favoriser l'apparition de cellules sécrétrices d'Ig ayant un phénotype de plasmocytes. L'expansion des lymphocytes B d'un facteur de 10⁵ atteinte en 1 mois dans ce modèle de culture ouvre la porte à un potentiel d'application thérapeutique [395]. Finalement, la culture in vitro de lymphocytes B dans un milieu sans sérum dans ce même modèle permet un autre pas vers leur utilisation pour la thérapie cellulaire [396].

10. Utilisation des lymphocytes B en thérapie

10.1 Les lymphocytes B régulateurs

D'un point de vue thérapeutique, la capacité de sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B régulateurs (Breg) présentent un double intérêt. Dans un premier temps, ces cellules sont utilisées à titre de diagnostic notamment dans le cas de pathologies de types inflammatoires et auto-immunes. Parmi ces maladies, le niveau relatif des Breg, apparait débalancé pour les individus souffrant de maladie tels le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, comparativement aux personnes en santé [399, 400]. Dans un second temps, les Breg pourrait être complémentaire à l'utilisation de cellules mésenchymateuses pour diminuer les risques de maladie du greffon contre l'hôte [401]. Dans cette étude, Peng et coll. ont montré que les MSC étaient en mesure de stimuler la sécrétion d'IL-10 par les Breg, alors responsables de la diminution de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les lymphocytes T. Finalement, les Breg semblent impliqués dans la régulation de la fonction anti-tumorale de lymphocytes T retrouvé lors de certains cancers [402].

10.2 Les lymphocytes B comme cellules présentatrices d'antigènes

La présence de populations de lymphocytes B et de plasmocytes retrouvées à l'intérieur des tumeurs solides est considérée comme un pronostic favorable [403, 404]. Plusieurs études démontrent qu'il y a interaction au niveau des structures tumorales entre les lymphocytes B et les lymphocytes T [405, 406]. Notamment les lymphocytes B sont en mesure de présenter un antigène tumoral à leur surface, permettant ainsi l'activation des lymphocytes T anti-tumoraux [407, 408]. L'utilisation des lymphocytes B pour présenter des antigènes tumoraux s'inscrit comme une perspective thérapeutique novatrice [409].

10.3 Génération d'Ig monoclonal humanisé

La production d'anticorps monoclonaux humains, à partir de lymphocytes B retrouvés chez l'homme, a longtemps été considérée comme le but ultime dans le domaine de la production d'Ig à des fins thérapeutiques [410]. Les raisons poussant à la construction d'anticorps 100% humain, sont d'une part leur spécificité à l'antigène et d'autre part leur faible potentiel immunogénique chez l'humain [411, 412]. Ainsi, être en mesure de produire in vitro, une grande quantité d'anticorps monoclonaux représenterait une avancée majeure d'un point de vue thérapeutique. À titre d'exemple, l'Adalimumab, initialement utilisé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde, est le premier anticorps monoclonal pleinement humanisé à avoir été approuvé par la FDA en 2003. Aujourd'hui plus de 47 anticorps monoclonaux humanisés sont présents sur le marché et plus de 300 études cliniques sont en cours [413]. Au-delà de l'aspect ingénierie des anticorps humains, il a été suggéré par Caraux et coll. [240] que les plasmocytes réinjectés pourraient aussi être impliqués dans la rémission des patients greffés avec des cellules souches. Cette hypothèse ouvre la porte quant à l'utilisation des plasmocytes en thérapie cellulaire.

Problématique et hypothèse

Les lymphocytes B sont les principaux acteurs responsables du maintien de l'immunité humorale dans l'organisme. Toutes déficiences de la mise en place d'une réponse des lymphocytes B efficace entraînent une susceptibilité de l'organisme à des infections de type virales et microbiennes. Ce type d'infections est particulièrement observé chez des individus souffrant de cancer et ayant reçu comme traitement de la chimiothérapie ou de la radiothérapie. Les dommages collatéraux de ces procédés sont la perte d'un système immunitaire efficace, ainsi qu'une perte du patrimoine immun du patient. Les lymphocytes B générés à la suite de la prise de greffe de cellules souches sont détectables dans les 8 mois à 1 an suivant la greffe. Une étude multi-centre a montré que durant cette période, 77 % des patients ayant reçu une greffe de cellules souches contractent au minimum une infection grave [414]. Ces infections sont principalement des cytomégalovirus ou de types microbiennes [415]. Ces résultats démontrent qu'il est primordial d'accélérer le processus de remise en place d'un système humoral efficace afin de favoriser la survie ainsi que la qualité de vie des patients concernés.

Les travaux réalisés dans l'équipe de Dre Néron ont montré qu'il était possible d'expansionner in vitro des lymphocytes B mémoires purifiés à partir de chambres de leucoréduction de produits sanguins. La portion activée de ces lymphocytes B mémoires a déjà rencontré un antigène donné et présentent des isotypes de type IgA ou IgG. Ces cellules représentent la fraction la plus avancée en différenciation des lymphocytes B mémoires du sang et possèdent toujours une capacité de prolifération. Selon le type de stimuli reçu et le niveau d'affinité des Ig synthétisées, ces cellules mémoires seraient en mesure de générer des plasmocytes à longue vie dans l'organisme. Les mécanismes menant à la génération de ces plasmocytes sont encore mal compris de nos jours. Certaines études ont montré qu'il était possible d'obtenir des plasmocytes in vitro à partir des populations mémoires [269, 289]. Cependant, les conditions de cultures jusqu'alors utilisées ne permettent pas une ouverture vers une application médicale. Notre équipe a récemment montré

qu'il était possible d'expansionner des lymphocytes B mémoires dans des conditions exemptes de sérum propice à une ouverture thérapeutique.

L'hypothèse de ce doctorat est qu'il serait possible de moduler l'environnement des lymphocytes B mémoires activés en culture afin de contrôler la génération de plasmocytes in vitro.

Objectifs

L'objectif général de ce doctorat est de comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation des lymphocytes B mémoires humains en plasmocytes. En se basant sur une robuste phase de prolifération, l'optimisation de la phase de différenciation nous permettrait d'augmenter les rendements quant à la génération de plasmocytes dans une perspective d'application thérapeutique.

Objectif 1 : Potentiel redox dans la voie JAK-STAT chez les lymphocytes B mémoires

Au cours du processus de différenciation, les lymphocytes B sont amenés à subir d'importante variation quant à la disponibilité en oxygène dans l'environnement [333]. En parallèle, de par leur nature à sécréter des Ig, les lymphocytes B sont sujets à d'importants stress oxydatifs, tant d'un point de vue de la synthèse que du catabolisme. Ces modulations résultantes d'une production de ROS, sont des éléments clés pour le maintien de la différenciation ainsi que de la survie des lymphocytes B mémoires [364, 416].

Les évidences, entourant la sensibilité des lymphocytes B en cours de différenciation, vis-à-vis de l'oxygène, entraine une réflexion quant à l'environnement de leur système d'étude dans des conditions de normoxie atmosphérique in vitro. Ainsi, afin de limiter l'aspect oxydatif de l'air ambiant, il est possible d'ajouter des antioxydants [417], qui ajustés à la bonne concentration permettent de recréer des conditions physiologiques.

La mise en point, par l'équipe du Dre Néron, d'un système de culture capable de recréé in vitro, les conditions des centres germinatifs, permettent l'étude des mécanismes de prolifération et de différenciation des lymphocytes B [418, 419]. Dans l'organisme, ces structures sont reconnues pour leur faible concentration en oxygène [420]. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, des essais réalisés par le Dr Philippe Nadeau, ont permis de montrer les effets de l'ajout d'un

antioxydant, le NAC, sur des cultures de lymphocytes B mémoires [100]. Les résultats obtenus ont montré une diminution de la prolifération ainsi qu'une augmentation de la viabilité des cellules en culture. En parallèle, une diminution de la sécrétion d'IgG et d'IgA a été observée. Une analyse des voies de signalisations impliquées dans l'ensemble des mécanismes altérés a permis de mettre en évidence une inhibition de la phosphorylation de la protéine STAT3. Cette protéine est impliquée dans les mécanismes de prolifération et de différenciation des lymphocytes B en plasmocytes [421, 422].

L'intérêt de ce premier objectif a donc été de confirmer les précédentes observations dans des lymphocytes B mémoires purifiés. Notre hypothèse étant que des acteurs en amont de l'activation de STAT3, soient sensibles à la présence d'un antioxydant. Les composantes de la voie JAK-STAT étant déjà définies [423], une analyse systématique des protéines susceptibles d'interagir avec STAT3 a été réalisée par cytométrie en flux et immunobuvardage.

Objectif 2 : Comparaison de l'interaction CD40-CD154 et CD27-CD70 lors de la différenciation des lymphocytes B mémoires

Notre équipe a démontré qu'une diminution de l'interaction CD40-CD154, avait pour effet d'amener les lymphocytes B à se différencier en cellules sécrétrices d'Ig [86, 419]. De plus l'interaction CD27-CD70 est impliquée dans les mécanismes de différenciation des lymphocytes B [424]. Afin d'améliorer le processus de différenciation des cellules en culture, les deux types d'interactions ont été testées en présence d'IL-6. Cet ajout d'IL-6 est basé sur son rôle au niveau des centres germinatifs in vivo, et son importance pour la différenciation des lymphocytes B in vitro [425, 426]. Des études par cytométrie en flux ont été effectuées pour comparer l'expression des marqueurs CD31, CD38, CD39 et CD138, caractéristique des plasmablastes et plasmocytes [245, 427] afin d'identifier la meilleure combinaison.

Objectif 3 : Différenciation des plasmocytes dans un environnement se rapprochant de la moelle osseuse.

La majorité des plasmocytes à longue vie étant présent essentiellement au niveau de la moelle osseuse [265], il est indispensable de s'intéresser aux caractéristiques spécifiques de cet environnement. Des essais visant à se rapprocher de ces conditions ont donc été réalisés afin de pallier aux lacunes du précédant modèle de culture. Le mimétisme d'un environnement de la moelle osseuse peut-être obtenu notamment en faisant varier le niveau d'oxygène in vitro [319]. De plus l'addition de cellules faisant partie de la niche de la moelle osseuse, telles les cellules souches mésenchymateuses et des éosinophiles [151] a été testés en coculture avec des lymphocytes B. Afin de s'aligner avec la perspective thérapeutique que pourrait apporter ce projet, l'intégralité de cette dernière étape a été réalisée dans un milieu exempt de sérum. La caractérisation des cellules générées a été réalisée par des analyses multiparamétriques par les méthodes de cytométrie en flux et de Luminex, ainsi que des dosages par ELISA des Ig sécrétées.

Chapitre I – Le N-acétyl cystéine régule la phosphorylation des protéines JAK à la suite d'une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires humains

Guillaume Bonnaure, Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure a élaboré et réalisé toutes les expériences présentées dans cet article. L'intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure. Finalement, la rédaction de l'article a été effectuée par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron, qui a supervisé l'ensemble de ces travaux.

Article publié dans : *Molecular Immunology* 62 (2014) 209-218.

Résumé

Au cours de leur développement, les lymphocytes B humains sont amenés à migrer dans différents environnements, chacun présentant des variations quant à leur disponibilité en oxygène. Ces modulations se traduisent par une variation du potentiel redox qui est déterminant pour la différenciation de ces cellules. Dans cette étude, nous avons montré que des lymphocytes B mémoires activés étaient sensibles à la présence d'un antioxydant, le N-acétylcystéine. Nos résultats montrent une diminution de la phosphorylation des kinases JAK2 et JAK3, chargées d'activer la protéine STAT3. De plus, l'expression de deux autres protéines, SOCS1 et SOCS3, est apparue dépendant du temps de traitement avec l'antioxydant. La diminution du niveau de S-glutathionylation des protéines totales confirme les effets du potentiel redox sur les résultats obtenus. Ces observations suggèrent qu'il serait possible d'utiliser le NAC, comme régulateur de la voie JAK-STAT, afin de contrôler la différenciation des lymphocytes B mémoires activés *in vitro*.

Title: N-acetyl cysteine regulates the phosphorylation of JAK proteins following CD40-activation of human memory B cells.

Authors : Guillaume Bonnaure^{*,†} and Sonia Néron^{*,†}

Affiliation :

*Production cellulaire, Recherche et développement, Héma-Québec, Québec, QC, Canada G1V 5C3

†Biochimie, microbiologie et bio-informatique, Faculté des Sciences et de génie, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V 0A6

Running title: NAC inhibition of JAK2 and JAK3 activation.

Key words: Antioxidant, NAC, JAK, STAT3, memory B cells,

Abbreviations: PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells, ROS, Reactive Oxygen Species, FCB, Fluorescence Cell Barcoding, O. D., Optical Density, MFI, Median Fluorescence Intensity

Abstract

During their development, human B lymphocytes migrate into various environments, each presenting important variations in their redox balance depending on oxygen availability. The modulation of the cells surroundings redox balance leads to the regulation of reactive oxygen species produced by the cell. These molecules are involved in the state of oxidation of the cytosol and affect many pathways involved in cell development, differentiation and protein secretion. B lymphocytes cultured in presence of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10 and under CD154 stimulation, present increases in their intracellular levels of ROS. However, when N-acetyl cysteine (NAC), an antioxidant, is added, STAT3 phosphorylation is decreased. In this study, we show that in activated human memory B cells, NAC inhibited STAT3 phosphorylation on tyrosine 705 but not on Serine 727. Moreover, higher concentrations of NAC decreased STAT3 synthesis. Two other antioxidants, α -tocopherol and Trolox, did not affect STAT3 phosphorylation. Furthermore, two kinases involved in STAT3 activation, known as JAK2 and JAK3, appeared down-regulated in presence of NAC. In parallel, three hours after antioxidants incubation, we have observed a decrease in SOCS1 and SOCS3 protein levels, which seems time-related to antioxidant treatment. The decrease in the phosphorylation of JAK2 and JAK3, earlier in the process, could explain the downregulation of STAT3 and offer a hypothesis on the mechanism of action of NAC antioxidant properties which were confirmed by a decrease in the level of S-glutathionylation of proteins. The reduced expression of SOCS1 and SOCS3 appears directly linked to the inhibition of this STAT3-regulated pathway. In summary, NAC appears as a potential regulator of the STAT3 pathway.

Introduction

Switched memory B cells are rapidly activated in response to the second appearance of infectious antigens [428]. In this process the binding of their CD40 by CD154 present at the surface of activated T cells is known to be crucial [77]. Stimulation by CD154 generates the trimerization of CD40 enabling the recruitment of TRAFs (TNF Receptor Associated Factor) or JAKs (Janus Kinase) proteins both resulting in signalisation cascade [429]. Once phosphorylated, TRAFs as well as JAKs which are directly linked to the intracellular domain of CD40, will transduce the signal to downstream targets including STATs (signal transducer and activator of transcription), PI3K (phosphatidyl inositol 3 phosphate), NF- κ B (nuclear factor kappa B), JNK (c-JUN (NH₂) terminal kinase) and ERKs (extracellular signal regulated kinase) [66, 73, 90, 430, 431].

Many studies report that CD40 is also involved in the release of reactive oxygen species (ROS) in the cytosol [384, 432]. This oxidative burst, following CD40 or BCR stimulation appears essential for the B cell differentiation process [433], which is sensitive to the presence of ROS in their environment [434, 435]. By the overcharge of electron on their structure, ROS are master regulators of the redox balance [436]. For example, it was reported that a small oxidative burst created by ROS is responsible for B cells activation [364]. In fact, each states of B cell differentiation, besides interaction with their environment and their localization in the organism, is dependent of O₂ availability [437, 438]. Secondary lymphoid organs, center of the last stage of B cells differentiation, are known to present hypoxic conditions, which lead to an increase of ROS production by the cells [333]. To regulate their oxidation state, the cells can use a molecular process based on antioxidants such as glutathione or tocopherol or enzymatic reduction of ROS, using superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) or peroxiredoxin (Prx) [347, 439]. Reversible post-translational modifications, such as addition of glutathionylated or nitrosylated groups, may be observed in order to protect proteins from oxidative damages [440].

Many diseases are found to be ROS related due to the disruption of the redox balance. Those molecules which are heavily negatively charged may modulate kinases or phosphatases activity involved in many pathways [366, 441]. Interestingly, in order to balance the system, the use of antioxidant agent seems benefit with an appropriate treatment [442, 443]. A recent study has shown the effects of the N-acetyl cysteine (NAC), a well-known antioxidant, on human B lymphocytes [100]. NAC combined with CD40 stimulation, increased viability, and inhibited Ig secretion. This anti-apoptosis effect seems related to an inhibition of caspase 3 and caspase 7 and an increase of Bcl2 [444]. From a signal transduction point of view, a significant decrease of STAT3 phosphorylation on tyrosine 705 was observed, without any major modulation of other pathways [100]. STAT3 is related to many cellular processes such as proliferation [97], differentiation [445] or secretion [99]. To perform its function, STAT3 needs to dimerize in order to translocate into the nucleus and regulate gene transcription [446]. The redox balance of the microenvironment needs to be tightly regulated for STAT3 to dimerize via a disulfide bond [447].

To understand the mechanisms involved in STAT3 activation, we focused on the proteins found in the upper part of this pathway. The JAK-STAT pathway is involved in the signal transduction induced by interleukin or growth hormone stimulation. JAKs proteins are kinases associated with non-receptor tyrosine kinase, in order to transfer a signal to downstream proteins known as STATs. The JAK family is composed of JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2 [93]. Except for JAK3, which is only expressed by immune cells [448], those enzymes are ubiquitous. The inhibition of this pathway is mediated by suppressor of cytokine signaling (SOCS)1, SOCS3 [449] or an enzyme with a phosphatase activity like SHP-1. The first two proteins are able to bind non-receptor tyrosine kinase or JAKs protein in order to obliterate the signal transduction through this pathway [103]. Despite our knowledge of the JAK/STAT pathway, attributing a specific pathway to each cytokine is still difficult [101]. In our culture model, in order to mimic the reaction involved in the germinal center in presence of IL-2, IL-4 and IL-10 and CD40 stimulation, we expand and induce differentiation of memory activated B

lymphocytes [86, 398]. Given the current knowledge of the redox balance for cell development, we focused on the effects of antioxidants such as NAC, Trolox and α -tocopherol, on STAT3 and proteins involved on its regulation, for different times and concentrations of treatment.

Materials and methods

Isolation of switched memory B cells

This study has been approved by Héma-Québec's Research Ethics Committee. Regular platelet donors who agreed to participate in this study have all signed an informed consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were recovered from leukoreduction chambers and stored frozen [450]. Switched memory CD19⁺ B lymphocytes were isolated from PBMC by a two-step negative selection using the EasySep™ B Cell Enrichment kit and EasySep™ custom cocktail removing all IgD and IgM positive cells (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) as previously described [418]. The purity of CD19⁺IgD⁻IgM⁻ was higher than 95% as confirmed by flow cytometry.

Culture and treatment of human activated B cells

Switched-memory B cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's media (IMDM) supplemented with 10% low IgG Fetal bovine serum (FBS) containing 10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin 6.7 ng/mL sodium selenium (all from Life technologies, Burlington, Canada) and interleukins (IL)-2 at 5 ng/ml, IL-10 at 40 ng/ml (both from Peprotech, Rocky hill, NJ, USA) and IL-4 at 3 ng/ml from (R&D system, Minneapolis, MN, USA). This medium sustains both expansion and differentiation of human switched memory B cells (Fecteau, 2009). B cells were co-cultured with adherent CD154⁺-L4.5 cells [86], using a ratio of about one L4.5 for five B cells, to generate a high level of CD154 interaction, for six to 14 days at 37°C and 5% CO₂. In addition, three frozen samples of pre-expanded B cells, submitted to high level of CD154 interaction for 33 days, were thawed and stimulated for 18 days in the presence of low level of CD154 interaction, namely 20 B cells for one L4.5 cell. Exceptionally, 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin G (all from Invitrogen, Burlington, ON, Canada) were added to the medium for those long-term culture experiments. Viability and cell counts were assessed by Trypan Blue exclusion using a hemocytometer. IgA and IgG content

and secretion rate were determined in culture supernatants as previously described by standard ELISA assays [418].

Antioxidant treatment was done using 5 to 30 mM N-acetyl cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 500 μ M Trolox (Sigma-Aldrich), and 70 μ g/mL α -tocopherol (EMD bioscience, San Diego, CA, USA) for periods varying from 15 min to 24 h at 37⁰C and 5% CO₂. Both Trolox and α -tocopherol concentrations were used as positive antioxidant controls based on their capacity to reduce the content of ROS in the cytoplasm (Data not shown and [100]). Before treatment, cultured B cells were collected and transferred in their initial media for two hours, but in the absence of L4.5. This pre-treatment period was used to minimize the phosphorylation of protein targets before addition of antioxidants. At the end of the treatment with the antioxidants, cell counts and viability assessments were performed with BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Briefly, cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies anti-human CD19 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and phycoerythrin (PE) conjugated antibodies anti-mouse CD154 from BD and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (abD Serotec, Raleigh, NC, USA). B cell numbers were assessed by counting the amount of CD19⁺CD154⁻ total cells and viability by determining the proportion of CD19⁺CD154⁻7-AAD⁻ cells. The cell population being negative for CD19 but positive for murine CD154 corresponds to the frequency of residual L4.5 harvested in parallel with B cells. Such frequency was found to be lower than 5% in all experiments.

Protein analysis by western blot

B cells were collected by centrifugation immediately after antioxidant treatment and lysed using a Laemmli buffer composed by 62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 2% SDS (EMD Millipore, Darmstadt, Germany), 20% Glycerol (Fisher scientific, Ottawa, ON, Canada), 50 mM DTT (EMD Millipore), 0,01% Bromophenol blue (Sigma Aldrich). Proteases and phosphatase inhibitors were added to the buffer according to the manufacturer's instructions (Protease and Phosphatase Inhibitor Tablets, Fisher Scientific). The buffer was heated at 37 ⁰C and added to the cell pellets at a ratio of

25 μ l per 1×10^6 cells. Following a period of 10 min on ice, cell lysate was sonicated for 5 seconds (Ultrasonic processor from Sonics and Materials, Newtown, CT, USA). A standard Bradford assay was used for protein quantification and all cell lysates were processed less than 48 h after lysis. The same number of cells was used to prepare each series of protein extracts loaded at 10 μ g or 20 μ g per well. Polyacrylamide gels from 8 to 12% were used in SDS-PAGE electrophoresis and proteins were transferred to Amersham Hybond ECL Membranes (GE Healthcare, Pittsburgh, AR, USA). After transfer, the membranes were blocked with Tween Tris-buffered Saline (TTBS) containing 5% BSA (Fisher scientific) and 3% of gelatin from cold water fish (Sigma Aldrich). This blocking solution was used for all treatments of the membranes until final analyzes performed with ImageQuant LAS400 using ImageQuantTL software (GE healthcare). All proteins were detected by using a specific rabbit anti-human primary antibody, such as SOCS1, SOCS3, STAT3 and phosphorylated protein as ERK1/2 (Thr202/Tyr204), NFkB (Ser529), SHP-1 (Tyr564), JAK1 (Tyr1023), JAK2 (Tyr1007/1008), JAK3 (Tyr980/981), TYK2 (Tyr1054 /1055) and STAT3 (Tyr705) (Cell signaling technology, Danvers, MA, USA). Every antibody tested was polyclonal, except for phospho-JAK2, phospho-JAK3 and phospho-SHP-1. A secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA) was used. The protein used as a reference was a monoclonal mouse anti-human GAPDH (Santa Cruz, biotechnology, CA, USA), which was detected with a HRP-conjugated anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch). Proteins were detected using ECL prime (GE healthcare) as a substrate for the peroxidases. In order to perform analyzes between each donor, all the controlled values were reported to a relative intensity equal to one. Then relative band intensity for each condition was obtained with the control condition as a reference and the data were normalized with GAPDH.

Controls were done to monitor whether residual L4.5 cells (<5% of total cells) can influence western blots. L4.5 extracts were analyzed in parallel to B cells extracts and no reactivity was detected for all the proteins tested.

Analysis of protein phosphorylation by fluorescent cell barcoding method

The phosphorylation of proteins was determined by fluorescent cell barcoding (FCB) [451] as previously described (Nadeau et al. [100] and Simard et al. 2013 [452]). After treatment with NAC and antioxidants, B cells were immediately fixed with formaldehyde (Sigma Aldrich) at a final concentration of 1.5%, and permeabilized with 50% methanol diluted in TTBS. A 4 x 3 matrix was created where each specific experimental conditions corresponds to one specific staining combination. More precisely, B cells were fluorescently barcoded with four dilutions of Pacific Blue (75 μ M, 187 μ M, 4.5 μ M and 1.1 μ M) and three dilutions of CFSE (12.5 μ M, 3.1 μ M and 0.8 μ M) and incubated during one hour, protected from light. The cells were then washed in TTBS containing 2% BSA, all barcoded cells were combined and then subdivided into 4 tubes and incubated with or without anti-p-STAT3, anti-STAT3 and anti-p-JAK2a mouse monoclonal antibodies all conjugated with Alexa 647, for 30 min, all from Cell Signaling, (Danvers, MA, USA). Untreated cells were used to determine the background values which were used to calculate the relative amount of each target proteins following NAC treatment.

Phenotypic analysis of cells by flow cytometry

At day 5, cultured B cells were analyzed by cytometry to confirm their purity and monitor their differentiation state. The purity of activated B cells present in the culture was measured using specific antibodies against CD3, CD14, CD19, IgM, IgD and IgG. The cells were harvested and then stained with pacific blue succinimidyl ester (PB) for 30 minutes in order to assess viability. Then the cells were washed in PBS-1% + FBS-0,001% NaN₃ and labeled with specific antibodies. Phycoerythrin-cyanin (PE-Cy7)-conjugated anti CD154 and anti-IgD, as well as allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD14 and anti-IgG, allophycocyanin alexa fluor (APC-eFluor)-conjugated anti-CD19, FITC-conjugated anti-CD3 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA) and FITC-conjugated anti-IgM from Jackson ImmunoResearch. All antibodies used were mouse monoclonal IgG₁. Once labeled, the cells were fixed in 2% formaldehyde. Data acquisition of approximately 20 000 events was done at most 18 hours after staining with a

Partec CyFlow flow cytometer (Swedesboro, NJ, USA). Data were subsequently analyzed with FCS Express 4 software (De Novo Software, Thornhill, ON, Canada).

Measure of S-glutathionylated protein levels

The measurement of total S-glutathionylated proteins was performed by using the S-Glutathionylated Protein Detection Kit following manufacturer instructions (Cayman chemical company, Michigan, USA). Activated B cells were treated with NAC for one to 12 hours at day eight of the culture, in presence of L4.5. Then the lymphocytes were harvested and washed three times. S-glutathionylated protein levels were assessed by flow cytometry.

Statistical analysis

Each analysis was performed either on Graphpad (Graphpad software, San Diego, CA) or Excel (Microsoft, Redmond, WA). Non-parametric Kruskal Wallis tests were used in order to analyze sample data. Data are presented as the geometric mean of combined experiment. Data variations are presented as the standard error of the mean (SEM).

Results

NAC inhibits differentiation of long-term cultured switched-memory B cells

We previously reported that the effects of NAC on B cells in vitro were an increase of cell viability, a decrease of their proliferation and a reduced secretion of immunoglobulins [100]. However, those observations were performed on the entire CD19⁺ B cells, including naive and memory, and treatments with antioxidants spanning the whole culture. In the present study, we focused to measure the effects of NAC specifically on switched-memory B cells proliferation (Fig. 1.1 A and B), viability (Fig. 1.1 C and D) and differentiation into immunoglobulin-secreting cells (Fig. 1.1 E and F). Blood switched-memory B cells were activated in the presence of high level of CD154 interactions and in the absence or presence of NAC, which was maintained at 10 mM during the 14-day period (Fig. 1.1 A, C, and E). NAC effects on switched-memory B cells were similar to those previously observed [100], namely a tendency to slightly increase viability, to diminish by about two-fold total expansion as well as to inhibit IgA (14-fold) and IgG secretion (six-fold). In a second step, we used 33-days pre-expanded B cells and seeded back the cells in the presence of low levels of CD154 interactions to provoke their differentiation as previously described [86]. In these cultures, NAC was maintained at 5 mM during the 18-day culture period (Fig 1 B, D and F). In such differentiation conditions, viability was not influenced by NAC treatment but a 5-fold decrease was noticed in total expansion while the secretion rate for IgA and IgG was decreased by three- and five-fold, respectively. These observations confirmed that NAC inhibited proliferation as well as IgA and IgG secretion into the highly purified switched-memory B cell population submitted to conditions enhancing their differentiation [419].

NAC inhibits of Tyr 705 phosphorylation on STAT3

Based on the above results, we next aimed at determining the effects of the inhibition of STAT3 phosphorylation in switched-memory B cells using NAC. As above (Fig 1.1), switched-memory B cells were activated in the presence of high

levels of CD154 interactions for six days. B cells were then harvested and transferred for two hours in medium containing cytokines and in absence of CD154 interaction. Cells were then treated for 24 h with or without NAC at concentrations ranging from 5 to 30 mM. At the end of the treatment period, cell viability was found to be similar in cells treated with five, 10 and 15 mM of NAC, $80\% \pm 2\%$, $76\% \pm 4\%$ and $72\% \pm 2\%$, respectively compared to controls and $84\% \pm 1\%$ (data not shown). Lower but adequate viability values were obtained in cells treated with 20 and 30 mM NAC treatment, $66\% \pm 4\%$ and $62\% \pm 2\%$, respectively (data not shown). Cells extracts were prepared and immediately analyzed by western blot to determine the STAT3 and phospho-STAT3 protein contents and compared to GAPDH as an internal reference (Fig. 1.2A). For three independent experiments, a progressive inhibition of STAT3 phosphorylation on tyrosine 705 was observed for cells treated with five to 15 mM of NAC. Moreover, for concentrations beyond 15 mM, the phosphorylation of STAT3 appeared completely shut down. The total content of STAT3 protein was not different from that of control cells when five and 10 mM of NAC were added to the cells. In contrast, the presence of NAC at concentrations of 15 mM to 30 mM appeared to cause a decrease in the synthesis of STAT3 protein.

Likewise, we investigated whether the down-phosphorylation of STAT3 observed on tyrosine (Tyr)⁷⁰⁵ with NAC treatments would also affect serine (Ser)⁷²⁷, another site of phosphorylation of STAT3 (Fig. 1.1B and 1.1C). Similarly to the western analysis shown above, B cells from five independent samples were activated for six days, rested for two hours and treated for 24 h in the presence or absence of NAC at indicated concentrations. The determination of Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷ phosphorylation was done by flow cytometry using specific monoclonal antibodies. Overall there was no modification on the pSer-STAT3 status following NAC treatment. However, we still observed a decrease of STAT3 phosphorylation on Tyr⁷⁰⁵ as well as a decrease of total STAT3 protein. The same five samples were also analyzed for NAC effects on p-ERK1/2 and p-NF- κ B found downstream in the signaling cascade and involved in the B cell development or survival [453]. NAC treatment didn't show any modulation on p-ERK and p-NF- κ B (Fig. 1.2C)

suggesting that it was more noticeable close to STAT3 function. Altogether, these results indicated that the decrease of STAT3 phosphorylation is specific for Tyr⁷⁰⁵ and appears proportional to NAC concentrations and also suggests that NAC can influence STAT3 synthesis.

NAC inhibits JAK2 and JAK3

Subsequently, we have further investigated the mechanisms involved in NAC inhibition of STAT3 phosphorylation. Besides, to determine the impact of the redox potential on the JAK/STAT pathway, in parallel with the NAC experiments, cells were also treated with antioxidant controls, namely α -tocopherol and Trolox. Due to the decrease of STAT3 phosphorylation, we focused on proteins involved in its downregulation, namely SOCS1 and SOCS3 as well as the phosphatase p-SHP-1 [454]. After two hours of treatment with or without antioxidants, activated B cells were harvested and lysed in order to perform western blot assays (Fig. 1.3). These analyzes didn't show any significant modulation of SOCS1, SOCS3 and p-SHP-1 protein relative quantities following NAC treatment (Fig. 1.3A). Likewise, the treatment with Trolox and α -tocopherol didn't seem to modulate the level of those proteins. Overall, NAC inhibition of STAT3 phosphorylation appeared to be independent of its downregulation by those three major players of the pathway.

JAKs activation patterns following the same treatment of activated B cells with NAC and antioxidant controls. All known JAKs members involved in STAT3 activation [101] were analyzed as shown in panels B and C. No significant modulation of JAK1 or TYK2 phosphorylation rates in B cells treated with NAC, α -tocopherol and Trolox was detected.

Remarkably, we observed a significant decrease ($n=6$; $p\leq 0.05$) of JAK2 and JAK3 phosphorylation (Fig. 1.3C) triggered only by the treatment with 15 mM NAC. A strong decreasing tendency was also observed when using 7.5 mM NAC but the variation was not statistically significant. As expected, a significant decrease in the phosphorylation level of STAT3 was obtained with 15 mM NAC treatment. Besides, no significant effect were observed following treatment with Trolox or α -tocopherol

suggesting that the REDOX capacity of NAC might not be responsible of JAK2 and JAK3 inhibition of activation.

NAC inhibition through JAK2

All previous presented results were obtained from cells treated for two hours and were all obtained by western blot analyzes. The following experiments aimed at determining the kinetic of NAC effect using very short treatments and also to confirm the above observations by another method. To do this, *in situ* detection of phosphorylated JAK2 was done by flow cytometry using FCB. Activated B cells were prepared as for all above experiments and treated for periods ranging from five to 15 minutes with 7.5, 15 and 30 mM NAC and compared to untreated cells (Fig. 1.4). The median fluorescence intensity (MFI) for JAK2 and STAT3 phosphorylation levels were determined for each condition and compared to untreated cells and summarized using a heatmap representation (Fig. 1.4A). As for the two hours treatment period, we observed a significant decrease of JAK2 and STAT3 phosphorylation levels in the presence of 30 mM NAC for all periods tested. When using 15 mM NAC treatment, the decrease of JAK2 phosphorylation was noticed after 10 minutes, which is prior to the decrease in STAT3 phosphorylation, which was significant only after 15 minutes. The 7.5 mM NAC treatment did not present any significant modification of JAK2 or STAT3 phosphorylation for such short period. These data indicated that NAC action can act upon inhibition of JAK2 activation, which in turn seems unable to phosphorylate STAT3. Furthermore, these observations are supporting the results obtained by western blot analysis.

STAT3 regulates SOCS protein level

Recent reports suggest a feedback downregulation of SOCS protein levels when STAT3 activation was impaired [455]. Using the same strategy, we used 7.5 and 15 mM NAC treatments to inhibit STAT3 phosphorylation in activated B cells and thus determine whether SOCS level of protein were modulated. For this purpose, we used treatment periods of one, three and six hours which are long enough to allow the turnover of the translation of those proteins [456]. Both SOCS1 and

SOCS3 protein levels did not appear to be modulated after one hour and six hours treatments (Fig. 1.5). However, SOCS1 and SOCS3 protein levels significantly decreased in activated B cells after three hours of NAC treatment adjusted to 7.5 and 15 mM. The indirect inhibition of NAC on those two proteins are in line with the reported feedback of STAT3 upon SOCSs proteins [455] and suggest that STAT3 inactivation is stable enough to shift to physiological targets.

Effects of NAC on total S-glutathionylated protein level

NAC appears as a by-product in glutathione synthesis, which is involved in the redox balance and in a protein post-translational modification known as S-glutathionylation. Treatment with 5 and 10 mM of NAC for one and 12 h, revealed the impact of NAC on total S-glutathionylation protein levels in activated human B cells (Fig. 1.6). The 12 h-treatment did not change the level of S-glutathionylation of the total proteins. However, after one hour exposure with NAC, the levels of total S-glutathionylated proteins decreased significantly ($p < 0.05$; $p < 0.01$) a proportionally to the antioxidant concentration.

Discussion

Many studies have already confirmed the relationship between the redox potential and the state of phosphorylation of STAT3 [100, 447, 457]. However none of them focus on proteins acting upstream the STAT3 signaling pathway or having a regulatory role. In this study we showed that NAC inhibition of STAT3 phosphorylation on Tyr⁷⁰⁵ was probably acting upstream on JAK2 and JAK3 by blocking their phosphorylation and thus their tyrosine kinase activity. To our knowledge, such perturbations in human B cells, for JAK2 and JAK3 phosphorylation under antioxidant conditions have never been reported. Furthermore, this work is in agreement with the central role of STAT3 in promoting differentiation of human B cells into plasma cells as highlighted by three recent studies [421, 422, 458]. Furthermore, considering its antioxidant properties, NAC action upon memory B cells activated in conditions mimicking their in vivo environment [86, 398], give a supplemental hint for the impact of the redox system in the germinal center.

N-acetyl cysteine can get into the cells by membrane permeability or by anion exchange transport [459]. It is known that NAC molecules could have a direct antioxidant function or can be transformed by an enzymatic process into glutathione, a major regulator of the redox system in the cells [460]. The glutathionylation of STAT3 inhibits its activation through JAK proteins [461], and the observed NAC action could thus be indirect by boosting such modifications. However, measures of total S-glutathionylated protein levels after NAC treatment, partially invalids this hypothesis. Since this modification occurs in response to an oxidative stress, a decrease of this post-translational modification was expected under NAC treatment (Fig 6). The return to levels similar to those found in control conditions after 12 hours, confirms the short effectiveness of NAC in the media. These results indicate that NAC inhibition of STAT3 phosphorylation is not caused by its own S-glutathionylation [461]. This observation confirmed our results that NAC may be involved on STAT3s activation pathway since a significant decrease of some JAKs proteins phosphorylation was noticed. Furthermore a chronological

effect of NAC treatment was observed among the decrease of activation of this pathway (Figs 1.3 and 1.4).

Beside the effects of NAC on STAT3 activation, some modulation upstream in the pathway may be pointed out. In fact, all JAKs have affinities with STATs involved in IL-2, IL-4 and IL-10 receptors [93, 101], which are present on activated B cells in our culture model (data not shown). We do see phosphorylation on each kinase in charge of the activation of STATs proteins. However the perturbations of these phosphorylation patterns, in human B cells, for JAK2 and JAK3 under antioxidant conditions are reported here for the first time.

Many reviews have already shown the inhibitory effects of ROS on JAK proteins in an in vitro model [462]. In contrast, in vivo studies report an activation of the pathway in response to ROS [457]. As expected, addition of NAC in our medium, counters the effects of ROS in the modulation of the JAK-STAT pathway. Similarly to what has been shown for angiotensin II [463], our results suggest that the redox balance regulated by NAC could either affect directly the receptor, or the signal involved in the JAK activation. Many studies report the impact of the redox system on the subunits clustering of cytokine receptors such as IL-2R [464] or on the structure of the receptor such as IL-4R [465]. The disruption of disulfide bonds may change the structure of the receptor. This could lead to a misregulation of the signal transduction and abrogate JAKs activation. The signal induced by interleukin 2 and 4, in order to activate their receptor, is known to induce JAK2 and JAK3 phosphorylation, which is linked to the activation of STAT3 [466]. Other kinases, such as JAK1 and TYK2, could be activated by IL-2 or IL-10 [101] and IL-10 [467], respectively. JAK1 and TYK2 appear to be strongly associated with IL-10R, and have been shown to activate STAT1, STAT3 and STAT5 in this pathway [468]. However, as previously described [100], treatment with NAC decreases B cells proliferation in presence of IL-2, IL-4, IL-10 and CD40 activation. In comparison, lack of IL-10 in the same condition, does not reduce the proliferation as much (data not show). Moreover, in our cultures, IL-10 concentration is eight times higher than the other cytokines. This over activation of IL-10R could explain why no variation

appears for JAK1 and TYK2 activation, and consequently on STAT1 and STAT5 as previously described. Beside the effects of interleukins, JAK2 and JAK3 are known to be potentially activated by the stimulation of CD40, which is activated by CD154 [469, 470]. A study pointed out the sensitivity of this receptor to antioxidants treatment [471]. Many other proteins related to cytokines stimulation, such as TRAF, are able to activate proteins deeper in the pathway. Our results, performed on activated memory B cells, demonstrate how fast the response to an antioxidant treatment could modulate the phosphorylation of JAK2 and JAK3. Given their proximity to the membrane receptor, those two kinases present a high sensitivity to any modification to the cells environment. Furthermore, given instability to translocate through the cell membrane, NAC, like other redox associated molecules, act as a quick modulator of the redox system [457]. This reducing burst should quickly, but temporarily abrogate the activation signal expressed through the cytokine receptor and inhibit JAK2 and JAK3 phosphorylation, before any modulation of glutathione synthesis. In parallel to the quick modulation of JAK2 and JAK3, the decrease of STAT3 activation appears later following the treatment with antioxidants, at approximately 30 minutes, possibly due to the inactivation of the main kinases involved in its phosphorylation.

It is also important to consider the environment of the cell culture. By using normoxic conditions, it is possible to greatly modulate the redox sensitivity of those cells. Activated memory B cells, are found in secondary lymphoid organs, known as being an hypoxic environment [333]. Growth in environment with 20% oxygen may probably affect mechanisms involved in oxidative stress and modulate the response to NAC in the medium, but no perturbation in the cells development or viability seems affected in our system.

In our model, only STAT3 was modulated by NAC treatments. For this reason, we focus on actors involved in the phosphorylation of STATs, such as JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2 or their inhibitors SOCS1 and SOCS3 and SHP-1. Our first thought was that an increase of the amount of SOCS1/3 protein in the cell would counter the activation of STAT3. However, while western blot results didn't show

any variation in total proteins at one or two hours (Fig. 1.2), a decrease was observed after three hours of treatment (Fig. 1.4). Finally, after six hours of induction, the levels of SOCS1 and SOCS3 appeared similar to the control. In fact, STAT3 has been reported to be involved in the regulation of those proteins [472]. These results suggest that at least another pathway is involved in the regulation of SOCS proteins since STAT3 is still down-phosphorylated at this time of induction.

In summary, we report that NAC can act through JAK2 and JAK3 to downregulate STAT3 phosphorylation. Our results also enable us to underline for the first time that JAK2 and JAK3 are regulators of STAT3 phosphorylation in human activated memory B cells. Overall, our observations suggest that NAC effects could be linked to its antioxidant nature. However we can not completely discard the possibility that it can also be related to its specific molecular structure. Further investigations to analyze expression and association of those cytokines receptors with NAC as well as how NAC inhibits JAK2 and JAK3 phosphorylation would be of interest. Such experimentation could indeed help to determine whether NAC modulation of JAK/STAT pathways is due to its antioxidant properties, or to its molecular structure. Such observations may be useful to improve our knowledge on different cancer treatment. Many studies highlight the over-phosphorylation of STAT3 found in malignant cells [473]. JAK2 also appears as responsible for a number of tumor diseases. Our results could open new paths in human lymphoma treatment.

Acknowledgment

We thank Carl Simard for his help in the cytometry assays and their analysis, especially regarding FCB experiments. We thank Annie Roy M.Sc. and Philippe Nadeau Ph.D. for the long-term B cell culture experiments with and without NAC and Marie-Ève Allard Inf. for the coordination of the blood sample collection. We are also thankful for all volunteers who participated in this project. We are grateful to Marc Cloutier Ph.D. for excellent critical review and manuscript editing.

Figures legends

Figure 1.1: N-acetyl cysteine inhibits differentiation of switched-memory B cells.

Switched-memory B cells were isolated from three independent samples and activated in vitro using interaction with high levels of CD154 interaction. Their total expansion (A) and viability (C) were determined on days five, nine and 14 and the cumulated amount of secreted IgA and IgG was determined in supernatants on day 16 (E). Three independent pre-expanded B cells, initially submitted to high level of CD154 interaction, were thawed and activated for 18 supplemental days in the presence of low levels of CD154 interaction. The total expansion (B) and viability (D) were determined on days four, eight, 13 and 18 and the secretion rate (F) was determined on day 13 in the supernatant of cells that were washed and seeded at 2×10^6 cells/mL over a 24h period. All cultures were done in the presence of a mix of IL-2, IL-4 and IL-10.

Figure 1.2 : Effect of N-Acetyl cysteine on STAT3 in human activated B cells.

B cells were stimulated for six days with a high level of CD40-CD154 interaction in the presence of a mix of IL-2, IL-4 and IL-10. B cells were then harvested and rested for two hours before being treated with or without NAC. (A) After 24 h of treatment with NAC at concentrations ranging from 5 mM to 30 mM, STAT3 phosphorylation on Tyr705 and total STAT3 protein was measured by Western blot analysis. Results were compared with GAPDH and are representative of three independent experiments (n=3). (B) STAT3 activation rates measured by FCB after 30 minutes of treatment of NAC at 10, 20 and 30 mM, for different phosphorylation sites and for the total protein. UL represent the MFI measured for unlabeled cells (negative control). Results are presented as the fluorescence of Alexa 647 detected with the cognate intensity of staining representing a log 2

ratio of median with 0 mM as a reference, results from one out of five representative experiments. (C) Compilation of the results as obtained above by cytometry for STAT3 phosphorylation on Tyr705 and Ser727 and the total content of the STAT3 protein (Total) are showed. Histogram values represent the mean of five independent experiments \pm SEM. (D) Expression of p-NfkB and p-ERK protein after treatment with different concentrations of NAC. Relative value represents the mean obtained for three independent samples \pm SEM. Statistical analyzes were conducted using the Kruskal-Wallis test with * and ** indicating $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$ respectively.

Figure 1.3: N-acetyl cysteine as a potential inhibitor of members of the JAK-STAT pathway

B cells were activated for six days and prepared as above before being treated with 7.5, and 15 mM NAC as well as 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -tocopherol (α -toco) or 500 μM Trolox for two hours at 37°C in a CO₂ incubator. Western blot analysis was done immediately as previously on fresh protein extracts. (A) The protein content of SOCS1, SOCS3 and p-SHP-1, (B) the level of phospho-JAK1 and phospho-TYK2 (C) as well as phospho-JAK2, phospho-JAK3 and the total STAT3 protein contents were evaluated after two hours of NAC treatment. For each analysis a representative western blot is presented and relative values were determined using O.D. values for the target protein over O.D. values of GAPDH used as the reference protein. All results are presented as the mean of relative values \pm S.E.M. A and B are for three independent experiments and C is for six independent experiments. Statistical analyzes were conducted using the Kruskal-Wallis test with * indicating $p \leq 0.05$.

Figure 1.4: Quick response of JAK2 after N-acetyl cysteine treatment

p-JAK2 and p-STAT3 phosphorylation, as measured by FCB, after five, 10 and 15 minutes of treatment with 7.5, 15 and 30 mM of NAC. (A) Heatmap representation of the log₂ ratio of geometric mean with Ctrl as a reference for each treatment periods and concentration of NAC. (B), (C) and (D) represent the level of phosphorylation of JAK2 and STAT3 after NAC treatment at 5, 10 and 15 minutes respectively. Those results are from five independent experiments. Results are presented as the mean ratio \pm S.E.M of MFI values for p-JAK2 and p-STAT3 over the control condition. Those data combine five different experiments. Statistical analyzes were conducted using the Kruskal-Wallis test.*: $p < 0.5$; **: $p < 0.1$; ***: $p < 0.01$.

Figure 1.5 : Delayed effect of N-acetyl cysteine on SOCS1 and SOCS3

Detection of total SOCS1 and SOCS3 protein found in activated memory B cells after one, three and six hours of treatment with either 7,5 mM or 15 mM of NAC. Results are presented as the relative value for the specific condition over the value of GAPDH for this condition \pm S.E.M. Those data represent the compilation of three independent experiments. Statistical analyzes were conducted using the Kruskal-Wallis test.* $p < 0.05$.

Figure 1.6 : Total S-glutathionylated protein levels after N-acetyl cysteine treatment

Total S-glutathionylated protein levels were determined after treatment with NAC at five mM and 10 mM for one to 12 hours. (A) Histograms overview of MFI values of total S-glutathionylated protein versus control a condition obtained by flow cytometry. (B) Relative values of total S-glutathionylated protein with a

control condition as a reference. Error bars represent S.E.M. Those data represent the compilation of five independent experiments. Statistical analyzes were conducted using the Kruskal-Wallis test. * $p < 0.05$; ***:

Figures

Figure 1.1 : N-acetyl cysteine inhibits differentiation of switched-memory B cells

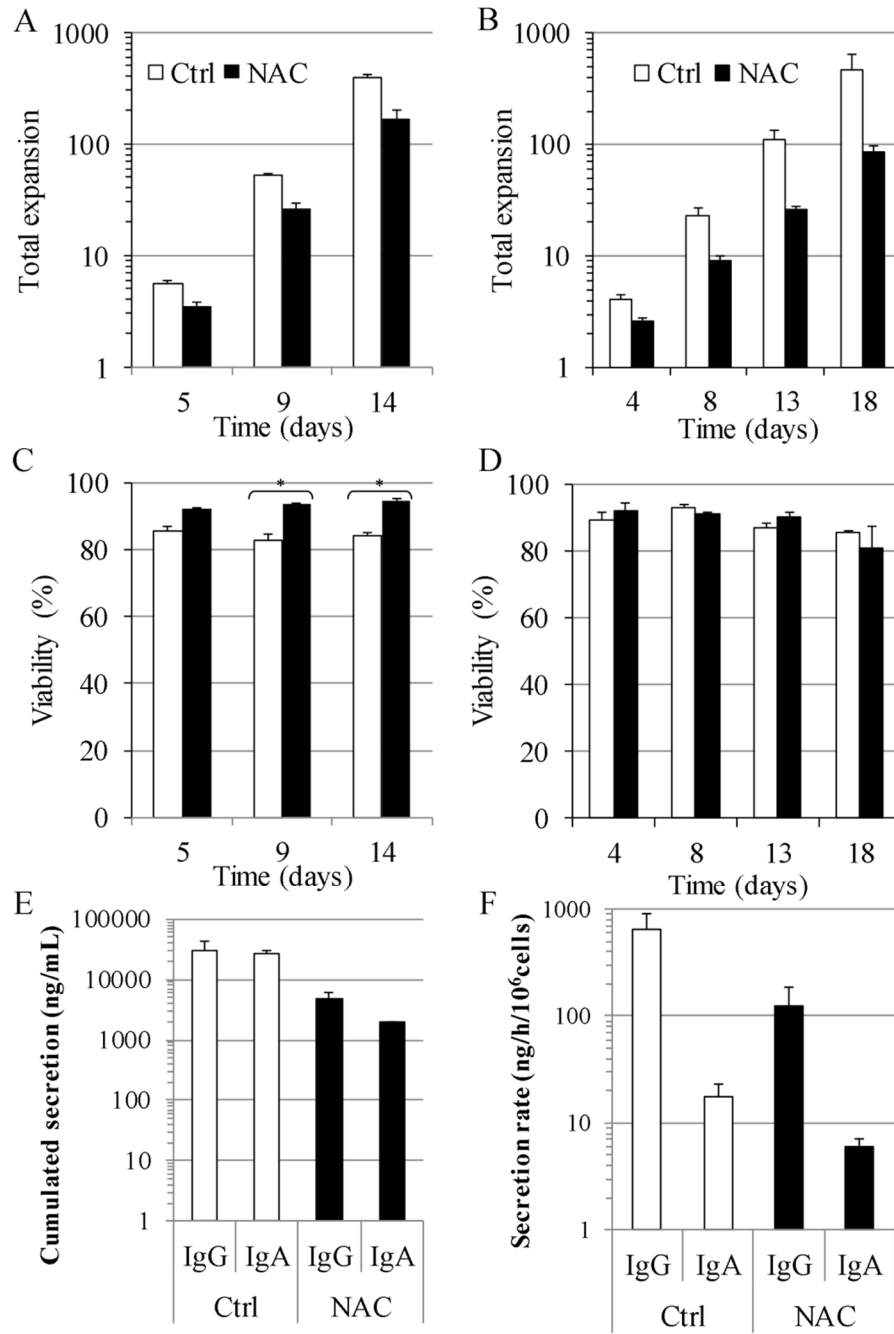


Figure 1.2 : Effect of N-Acetyl cysteine on STAT3 in human activated B cells

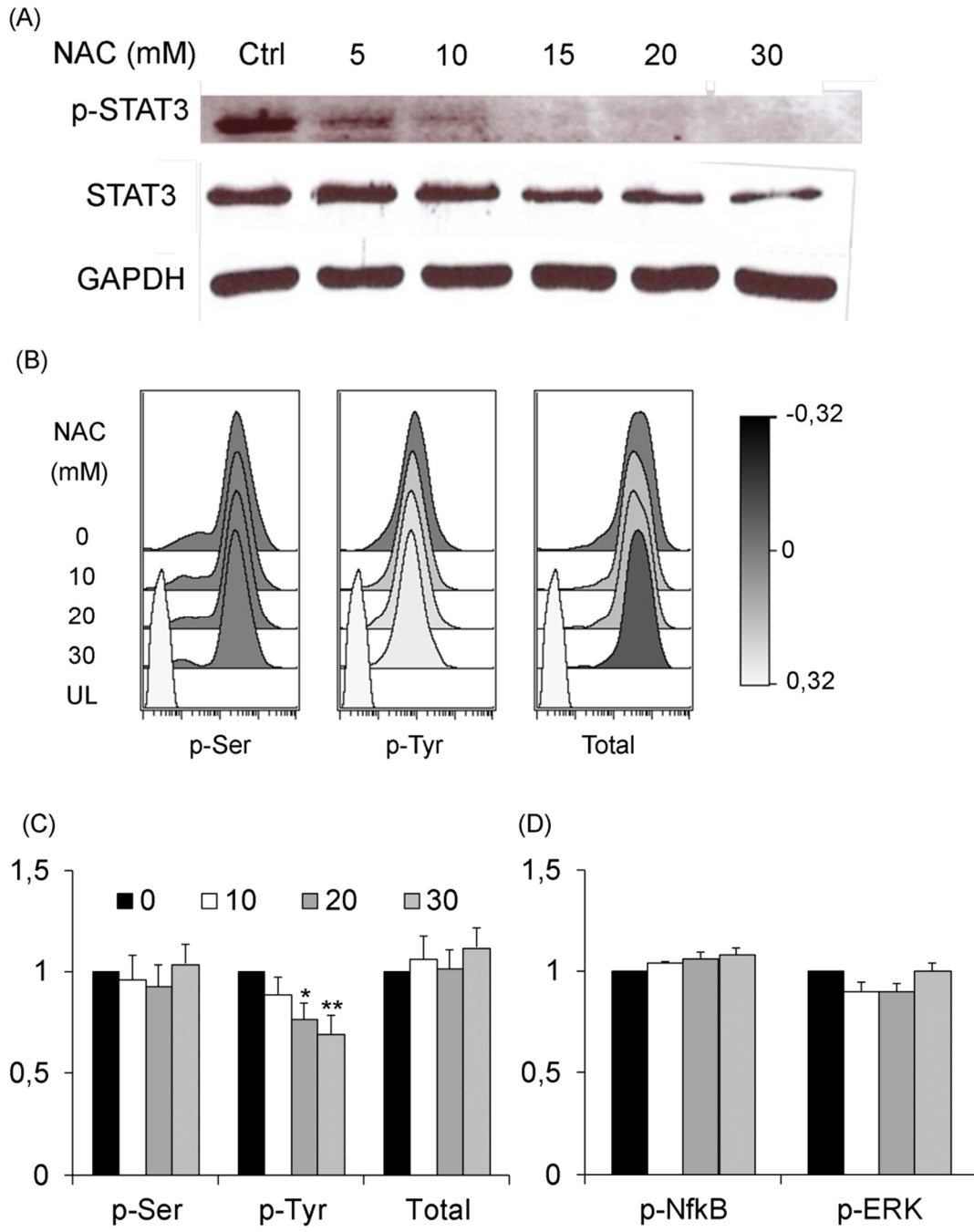


Figure 1.3 : N-acetyl cysteine as a potential inhibitor of members of the JAK-STAT pathway

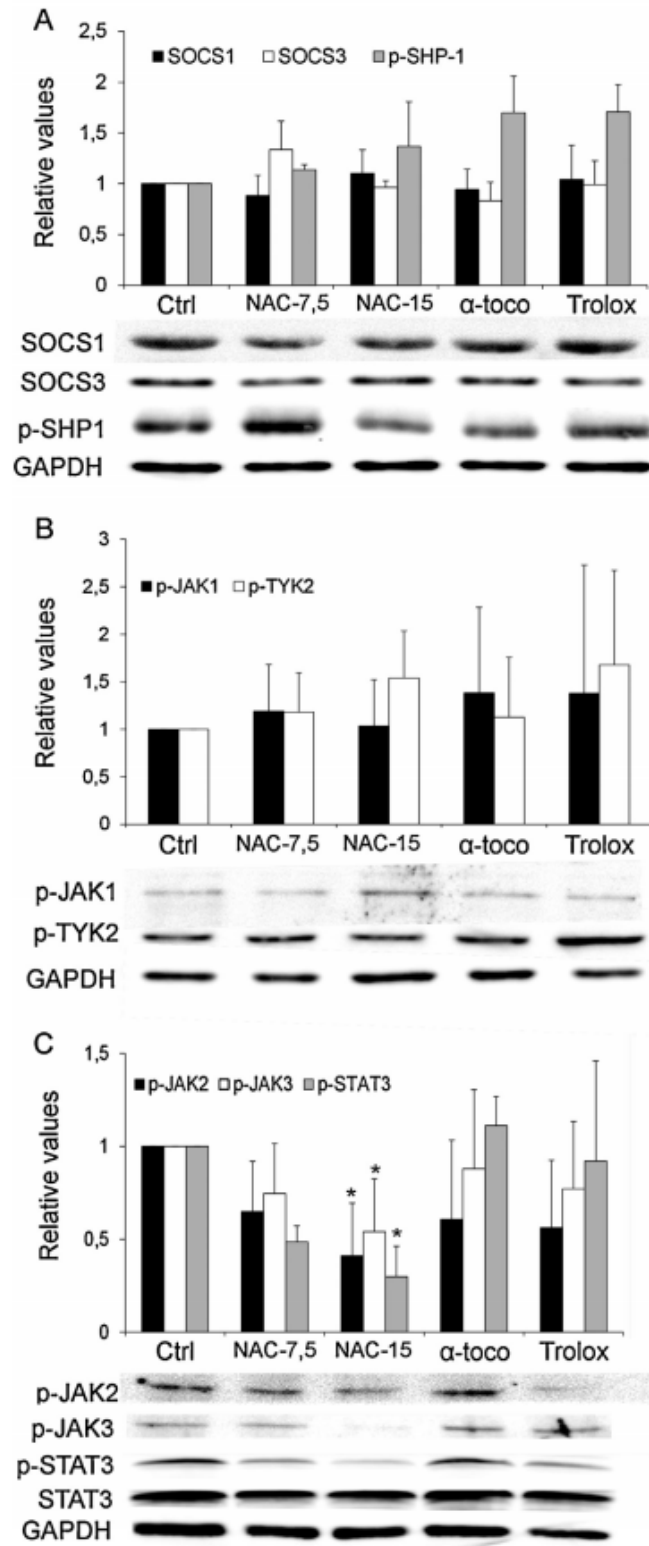


Figure 1.4 : Quick response of JAK2 after N-acetyl cysteine treatment

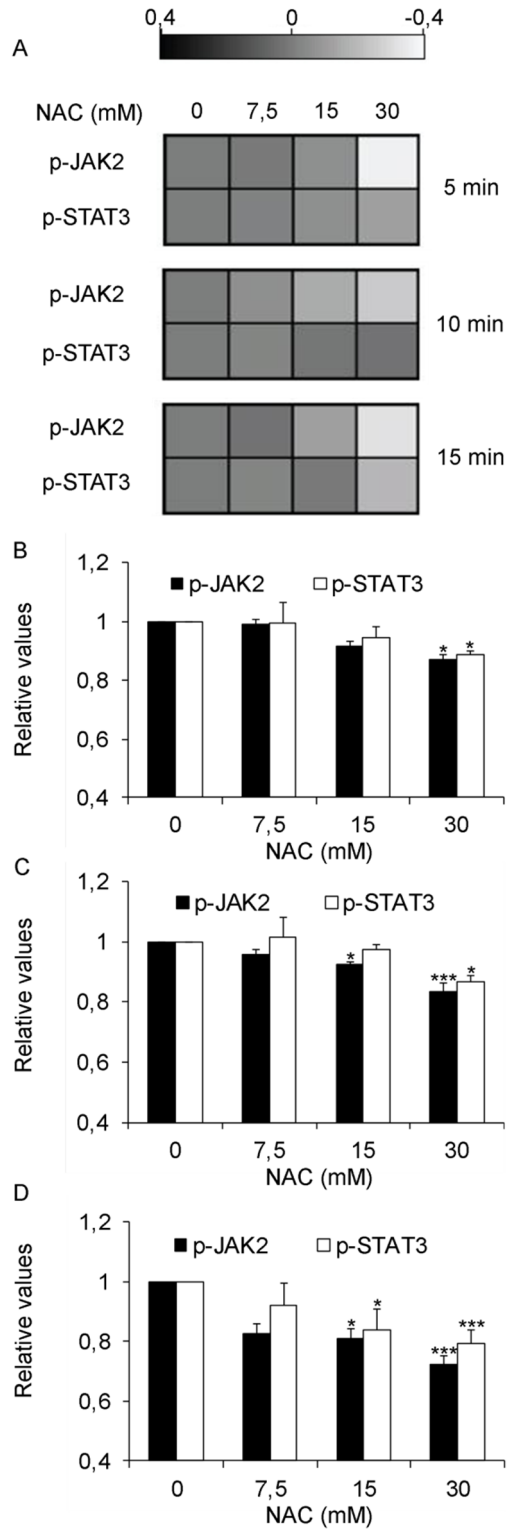


Figure 1.5 : Delayed effect of N-acetyl cysteine on SOCS1 and SOCS3

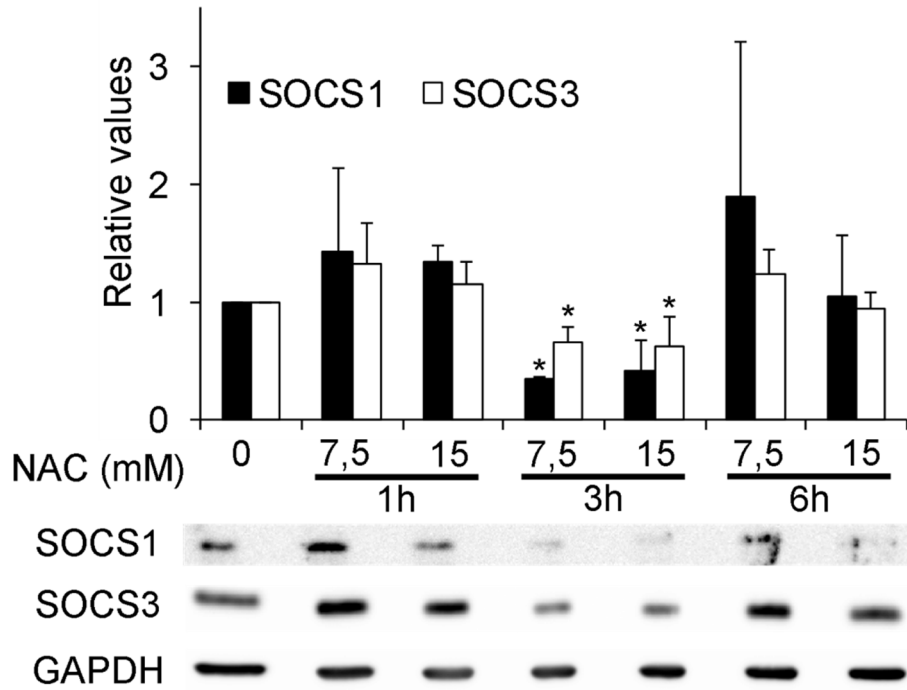
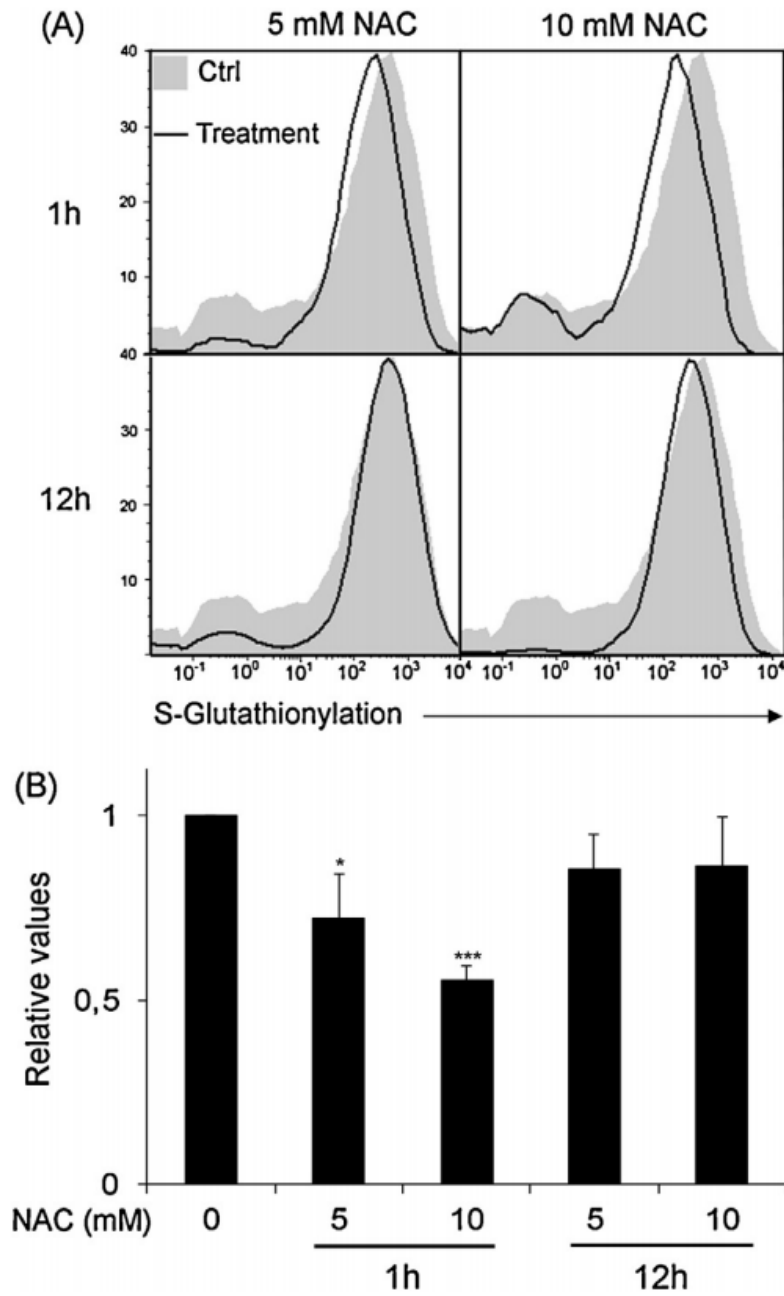


Figure 1.6 : Total S-glutathionylated protein levels after N-acetyl cysteine treatment



Chapitre II – Les plasmocytes CD38^{Haut}CD138⁺ humains peuvent être générés in vitro à la suite d’une activation par le CD40 des lymphocytes B mémoires activés

Auteurs : Guillaume Bonnaure, Rayelle Itoua-Maïga, Josiane Tremblay-Rochette et Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure et Rayelle Itoua-Maïga ont élaboré et réalisé les expériences présentées dans cet article. Josiane Tremblay-Rochette a participé à la réalisation de ces manipulations L’intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure et Rayelle Itoua-Maïga. Finalement, la rédaction de l’article a été effectuée par Guillaume Bonnaure, Rayelle Itoua-Maïga et Sonia Néron, qui a supervisé l’ensemble de ces travaux.

Article publié dans : Journal of Immunology Research 2014: 635108.

Résumé

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes à longue vie est un élément clé pour la production d'anticorps à long terme. Les interactions CD40 et CD27 sont impliquées dans le devenir de telles cellules sécrétrices. Au cours de cette étude, nous avons comparé la capacité de ces interactions à conduire des lymphocytes B mémoires activés à se différencier en plasmocytes CD38^{Haut}CD138⁺. Suite à la phase de différenciation, seules les cellules CD38^{Haut} exprimaient le marqueur CD31, dont le niveau d'expression est plus important chez les populations CD138⁺. Cependant, les analyses réalisées sur des plasmocytes du sang humain et de moelle osseuse ont montré que les populations CD38^{Haut}CD138⁻ générées in vivo et in vitro, ont un profil d'expression similaire du CD31, mais différent quant au CD39. Finalement, nous avons mis en évidence que les plasmocytes générés in vitro étaient hétérogènes et apparaissaient comme des précurseurs CD39⁺ des cellules présentes dans la moelle osseuse.

Title: Human CD38^{hi}CD138⁺ plasma cells can be generated in vitro from CD40-activated switched-memory B lymphocytes

Guillaume Bonnaure ^{*,†}, Rayelle Itoua Maïga ^{*,†}, Josianne Tremblay-Rochette^{*,†}and Sonia Néron^{*,†}

Affiliation

* Department of biochemistry, microbiology and bio-informatics, Laval University, 1045 avenue de la Médecine, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6.

† Hema-Quebec's department of Research and Development, 1070 avenue des Sciences-de-la-Vie, Québec, Québec, Canada, G1V 5C3

Running title: In vitro generation of CD38⁺⁺CD138⁺ plasma cells.

GB and RIM: These authors contributed equally to this work

Abstract

B lymphocyte differentiation into long-lived plasma cells is the keystone event for the production of long-term protective antibodies. CD40-CD154 and CD27-CD70 interactions are involved in human B lymphocyte differentiation into CD38^{hi}CD138⁺ cells in vivo as well as in vitro. In this study, we have compared these interactions in their capacity to drive switched-memory B lymphocytes differentiation into CD38^{hi}CD138⁺ plasma cells. The targeted B lymphocytes were isolated from human peripheral blood, expanded for 19 days and then submitted to CD70 or CD154 interactions for 14 days. We found that within 5 days in the differentiation environment, the CD27-CD70 interaction generated more plasma cells than the CD40-CD154 interaction ($53 \pm 7\%$ versus $35 \pm 6\%$). The expanded B lymphocytes were constitutively expressing CD39, whereas CD31's expression was noticed only following the in vitro differentiation step (day 5) and was exclusively present on the CD38^{hi} cell population. Furthermore, the generated CD38^{hi}CD138⁺ cells showed a higher proportion of CD31⁺ cells than the CD38^{hi}CD138⁻ cells. The resulting de novo CD31⁺CD38^{hi}CD39⁺CD138[±] cells were secreting IgA, IgG and IgE and their distribution was similar regardless of the CD70 or CD154 interactions they were submitted to. Besides, analyses done with human blood and bone marrow plasma cells showed that in vivo and de novo generated CD38^{hi}CD138⁺ cells have a similar CD31 expression profile but are distinct according to their reduced CD39 expression level. Overall, we have evidences that in vitro generated plasma cells are heterogeneous and appear as CD39⁺ precursors to the ones present in bone marrow niches.

Introduction

T-dependent B cell activation leads to the emergence of memory B cells (B_{mem}) as well as plasmablasts [474]. The former are B cells interacting with the antigen during the secondary immune response while the latter are terminally differentiating B cells. These processes occurring in lymph nodes involve numerous soluble factors and cellular interactions. Several soluble factors such as IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-21, IFN- α , and IFN- γ , assure the activation and differentiation process of B cells into memory cells and plasmablasts [8, 104, 475-480]. Furthermore, signalling through STAT3 activation, involving IL-21, and/or IL-10 or IL-6 is considered as a critical point for the differentiation of naïve and memory B lymphocytes as well as plasma cells survival [421, 422, 458]. On the other hand, the CD40-CD154 interaction is known to be at the heart of B cell activation [63, 481]. In addition, we have shown that a very low intensity of CD154 interaction combined to a mix of IL-2, IL-4 and IL-10 can lead CD19⁺ cells [482] as well as CD27⁺IgG⁺ human B lymphocytes [419] to expand and differentiate into Ig-secreting cells. Individuals with defective CD40 fail to form germinal centers and perform isotype switching, leading to a disorder called the X-linked hyper IgM syndrome [483]. Another important cellular interaction occurs between CD27 and CD70, which are from the TNF and TNF receptor families, respectively [484]. CD27 is expressed on memory B cells while CD70 is transiently expressed on activated B, T as well as dendritic cells [485]. This interaction is known to play a key role in B cell differentiation [486-488]. Similarly to the CD40-CD154 interaction, CD70⁺ naïve cells can drive CD27⁺ memory B lymphocytes to differentiate into antibody secreting cells [63]. Sequential interactions involving CD40-CD154 and then CD27-CD70 have been proposed to drive terminal differentiation of B lymphocytes in germinal centers [489].

Following the germinal center reaction, plasmablasts can differentiate into either short or long-lived plasma cells, approximately 7 days following antigen encounter [104]. The short-lived plasma cells have a high immunoglobulin (Ig) secretion rate and die from apoptosis after a few days due to endoplasmic reticulum stress [261, 490]. As for long-lived plasma cells, they complete their terminal differentiation in survival niches found notably in the bone marrow, the spleen, lymphoid tissues or mucosa associated lymphoid-tissues (MALT) (reviewed in [491]). While these cells secrete Ig at a slower rate than short-lived plasma cells, they do so over a longer period of time, ranging from a couple of years to the life of an individual [220]. This sequence allows to have an important antibody secretion at the peak of the immune response while keeping a protective antibody level in the serum several years after antigen encounter [220]. Although there is no extracellular marker allowing to distinguish between short-lived and long-lived plasma cells, they are known to highly express CD38 (CD38^{hi}) and may or may not express CD138 (CD138^{+/-}) [240]. Bone marrow plasma cells, which are usually considered to be long lived, are CD38^{hi}CD138⁺ [427]. Due to their low concentration in the peripheral blood (2 cells/ μ L) [240], in vivo plasma cells are hard to isolate for further characterisation. Several studies aimed at generating plasma cells in vitro [232, 240, 281, 289, 482, 492-494] to further understand their biology and regulation.

Given that they are at the heart of the humoral immune response [220, 495] and that they are also involved in several autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), multiple myeloma, macroglobulinemia as well as high chains diseases [496-500], a precise characterisation of these cells is essential. Furthermore, a meta-analysis grouping the data provided by independent groups have led a study on the mRNA expression of surface markers, chemokine receptors as well as several proteins related to memory B cells, plasmablasts and plasma cells differentiation states [494]. This large study highlighted the exclusive presence of

CD31 and CD39 mRNA in bone marrow plasma cells and plasmablasts, respectively, allowing differential characterization of those two cell types.

Our team has recently reported the development of a culture system allowing large-scale expansion of switched-memory B lymphocytes [395]. Herein, we compare the capacity of CD40-CD154 and CD27-CD70 interactions to induce the differentiation of these expanded cells in vitro and characterize the generated plasma cells using two surface markers: CD31 and CD39. We have found that both interactions had the same capacity to induce plasma cell generation even though the CD27-CD70 interaction led to a faster differentiation. We have also found that these in vitro generated CD38^{hi}CD138⁺ cells were different from bone marrow or peripheral blood plasma cells based on their CD39 expression. Our study suggests that such in vitro plasma cells are precursors of those found in the bone marrow thus, precursors of long-lived plasma cells.

Materials and methods

Human mononuclear cells and memory B lymphocytes

This study has been approved by Héma-Québec's Research Ethics Committee. Regular platelet donors who agreed to participate in this study have all signed an informed consent statement. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) were recovered from leukoreduction chambers by centrifugation on Ficoll-Paque and stored frozen as previously described [450]. CD19⁺ B lymphocytes were isolated from PBMNCs by negative selection using the EasySep™ B Cell Enrichment kit following manufacturer's instructions (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Switched-memory B cells, representing IgG⁺, IgA⁺ and IgE⁺ cells, were further isolated using an EasySep™ custom cocktail, which removes most IgD⁺ and IgM⁺ cells (Stem Cell Technologies). This two-step negative selection provided untouched switched-memory B-lymphocytes with a purity level exceeding 95% as determined by flow cytometry analyses [395].

Bone marrow mononuclear cells

Bone marrow mononuclear cells were obtained from Lonza (Walkerville, Maryland, USA). Prior to assays, the cells were thawed and incubated overnight in IMDM medium supplemented with 10 % ultra-low IgG fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, ON, Canada).

CD154⁺ and CD70⁺ adherent cell lines

L4.5 and 3H7 cells are genetically modified L929 cell lines (CCL-1, American Type Culture Collection, Manassas, VA) expressing CD154 [501] or CD70 [502], respectively. L4.5 cells expressing about 21,000 CD154 molecules per cell and 3H7 cells expressing about 25000 CD70 molecules per cell [482] were cultured in IMDM medium supplemented with 5% FBS. For B lymphocytes co-cultures, L4.5 and 3H7 cells were irradiated with 7500 rad using a GammaCell 1000 Elite ¹³⁷Cs-Y-irradiator (Nordion International, Kanata, Canada).

Culture of human switched-memory B lymphocytes

All cultures were done in IMDM supplemented with 10 % ultra-low IgG FBS containing 10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin and 6.7 ng/mL sodium selenite (all from Invitrogen). Purified switched-memory B-lymphocytes were submitted to a three-step culture protocol. Firstly, the cells were seeded at 3×10^5 cells/mL in 6-wells Primaria plates (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) with 1.8×10^5 γ -irradiated CD154⁺ L4.5 cells corresponding to about 5 B cells for 1 L4.5 cell [482, 501]. This ratio is referred in the study as the high interaction level. The medium was supplemented with 5 ng/mL IL-2 (≥ 50 U/mL), 40 ng/mL IL-10 (≥ 20 U/mL) (both from PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and 3.5 ng/ml IL-4 (≥ 100 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [395]. When indicated, an expanded-memory-B-cell bank at day 19 was cryopreserved and thawed when needed for further differentiation assays. Secondly, thawed expanded-cells were cultured using a lower CD154:CD40 (or CD70:CD27)-ratio corresponding to one L4.5 (CD154⁺) or 3H7 (CD70⁺) cell per 20 B cells (1:20 ratio). This ratio is referred in the study as the low interaction level. To initiate differentiation, a transition step was performed by adding 12.5 ng/ml IL-6 (≥ 125 U/mL, Peprotech) to the IL-2, IL-4 and IL-10 mixture. The third phase started 4 to 5 days later. The 1:20 ratio was maintained and the medium was only supplemented with IL-6 (12.5 ng/ml) and IL-10 (40 ng/mL) until the end of the cultures. Refer to the supplementary material, Fig. 2.S1 for the experimental model schematic. When indicated, B lymphocytes were washed between the transition and the differentiation phases to remove residual cytokines. In addition, a combination of L4.5 cells and 3H7 cells were used in equal part to constitute a high and low ratio. Of note, L4.5 [501] and 3H7 [486] cell lines are genetically modified L929 cell line. Consequently, the L929 mock cell line was used as a negative control during the differentiation phase. Cultures were fed by adding fresh medium every 2-3 days and γ -irradiated L4.5 or 3H7 cells were renewed every 4-5 days,

maintaining the low level of CD40-CD154 interaction. Cell counts and viability were evaluated in triplicates by Trypan Blue exclusion using a hemocytometer.

Flow cytometry analysis

FITC-conjugated anti-CD31, PE-conjugated anti-CD38 and PCP-eFluor 710-conjugated anti-CD39 were all from eBioscience (San Diego, CA, USA). Cells were also stained with PE-Cy7-conjugated anti-CD19 (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), PCP-Cy5.5-conjugated anti-CD38, V500-conjugated anti-CD45, alexa fluor 488-conjugated anti-CD20, APC-conjugated anti-CD27 (BD Biosciences), krome orange conjugated-CD45 (Immunotech, Mississauga, ON, Canada), alexa eFluor 647 or PE-conjugated anti-CD138 (BA38)(AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), APC-conjugated anti-CD39 and PE-Cy7-conjugated anti-CD38 (Biolegend, San Diego, CA, USA). Dead cells were discarded using Pacific Blue and Sytox Blue staining (Molecular Probes, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) or 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences). Cells stained with Pacific Blue were fixed with 2% formaldehyde. Data acquisition was done immediately or 18 to 20 hours after staining with a CyFlow ML flow cytometer and the FlowMax 3.0 software (Partec, Münster, Germany) by gating on 10 000 to 300 000 events. Data was subsequently analyzed with FCS Express 4 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). For all analyses, cells were selected based on a SSC/FSC plot after which live cells were selected for further analyses of bone marrow or blood mononuclear cells as well as cultured cells according to CD45 expression. Quadrants were determined using fluorescence minus one (FMO) controls.

Fluorescence microscopy

Differentiated cells morphology was visualized by fluorescence microscopy. Nuclei were stained with DAPI (Sigma Aldrich, ON, Canada) and F-actin was labeled with phalloidin 594 (Molecular Probes, Life technologies). Briefly, cells were concentrated on microscope slides using the Cytospin 4 Cytocentrifuge

(Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA), spin at 500 rpm for 5 minutes. They were fixed with 2% paraformaldehyde, at room temperature, for 30 minutes, after which they were incubated during 20 minutes with a 2% BSA-0.01% saponin solution. Actin labeling was done by incubating the cells with a 1:40 phalloidin solution for an hour. They were then washed twice with a 0.1% NP-40 solution and incubated with a 100ng/mL DAPI solution and mounted with Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen, Life Technologies) and a cover slip. Images were captured using a Nikon Eclipse TE 2000-S microscope (Nikon, Mississauga, ON, Canada) with 100X plan immersion oil objective and TsView 7 software (Xintu Photonics Co., Ltd, Fuzhou, China). They were merged using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Determination of Ig concentrations

For the determination of IgG and IgM secretion rates, cells were harvested at indicated days, washed with PBS-glucose and seeded at $1-2 \times 10^6$ cells/mL in IMDM medium supplemented with 10% FBS. Supernatants were collected after 6 hours and IgG and IgM concentrations were determined by ELISA as previously described [394]. In addition at indicated days, IgA and IgG contents were also determined by ELISA directly in the supernatants. IgA, IgE, IgG subclasses and IgM levels were quantified on days 5 and 14 in culture supernatants using the Bio-Plex Pro Human Isotyping kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The assay was carried out in a flat-bottom Immulon-II plate and the plate was washed by hand on a 96-well magnet. The rest of the assay was performed following the manufacturer's instructions and the plate was read on a Luminex IS 100 Instrument (Luminex, Austin, Texas, USA).

Statistical analyses

The appropriate post-hoc tests used are described in the results section.

Results

Determination of the best cytokine-environment for B cell differentiation

The combination of IL-2, IL-4, and IL-10 along with high CD40-CD154 interaction has been proven to stimulate long-term memory B cell expansion in vitro [395]. Based on the fact that a lower CD40-CD154 interaction leads to B cell differentiation [482], we have compared the IL-2, IL-4 and IL-10 cytokine combination to that of IL-6 and IL-10 in promoting in vitro differentiation at a low CD40-CD154 interaction. This comparison was based on the capacity of either combination to induce immunoglobulin secretion and emergence of CD38⁺ or CD38^{hi}CD138⁺ cells. Cells were expanded for 19 days in a medium containing IL-2, IL-4 and IL-10 [395, 419] followed by a 4 day-long transition phase and a 18-days differentiation phase with IL-2-4-10 or IL-6-10 combinations. As shown in figure 1A, the passage to the differentiation environment in both conditions slowed cell expansion (Fig. 2.1A) and allowed to maintain cell viability above 80% (Fig. 2.1B). Being an important feature of B cell differentiation, immunoglobulins secretion was measured in both conditions. IgG secretion rate reached up to $11 \pm 2 \mu\text{g}/10^6\text{cells/h}$ with the IL-2-4-10 combination and $13 \pm 2 \mu\text{g}/10^6\text{cells/h}$ with the IL-6-10 combination on day 33 (Fig. 2.1C). Differentiated cells also showed an important IgA secretion in supernatants, reaching $43 \pm 12 \mu\text{g/ml}$ for the IL-2-4-10 combination and $48 \pm 19 \mu\text{g/ml}$ for the IL-6-10 combination, while having as expected, a negligible IgM secretion in both conditions (Fig. 1D). On day 38, cells cultured with the IL-6-10 combination had an IgG₁ secretion of $203 \pm 157 \mu\text{g/ml}$, which was almost two-fold higher than the $106 \pm 65 \mu\text{g/ml}$ measured for the IL-2-4-10 condition (Bonferroni t test $p < 0.05$.) (Fig. 2.1E). As for phenotypic cell differentiation, we noticed a more important CD38⁺ cell population with the IL-6-10 combination, reaching up to $51 \pm 7\%$ of all CD45⁺CD19⁺ cells by day 33. Both interleukins combinations led to the emergence of CD38⁺CD138⁺ plasma cells, $23 \pm 4\%$ for IL-2-4-10 and $38 \pm 4\%$ for IL-6-10 (Fig. 2.1F). Overall, the IL-6-10 combination enhanced IgG₁ secretion

and generated a higher frequency of CD38⁺ cells indicating that this cytokine combination was more favorable to the in vitro generation of plasma cells.

Besides, we have also evaluated the capacity of IL-6, IL-21 and IFN- α used alone, in pairs or combined, in an attempt to improve differentiation of switched-memory B lymphocytes into plasma cells. None of these soluble factors enhanced plasma cell maturation or viability more than the combination of IL-6 and IL-10 (data not shown).

CD27-CD70 interaction leads to a faster differentiation

To verify whether CD40-CD154 and CD27-CD70 interactions were similarly competent for in vitro differentiation of switched-memory B lymphocytes, we used a cryopreserved expanded-memory B-lymphocytes bank. In all following experiments, the day 0 (D0) is the first day the thawed cells were put in culture to induce their differentiation. For the differentiation phase in the presence of IL-6 and IL-10, adherent cell lines expressing CD70 (3H7) or CD154 (L4.5) were used to generate a low level of interaction stimulation (Figs 2.2 and 2.3).

The level of proliferation was thus compared for both stimulation and a negative control was performed using the cell line L929^{mock} at a ratio of 1 for 20 B lymphocytes. During the transition from day 0 to 4, the switched-memory B lymphocytes were able to expand, by 2 to 3-fold in all conditions (Fig 2A). However, the L929^{mock} cells were unable to sustain viability of the B cells, which was decreasing rapidly from day 4 (60% \pm 4%) to day 8 (32% \pm 2%) (Fig. 2.2B). The B lymphocytes submitted to CD154 or CD70 low level of interaction stopped proliferating on day 8 while their viability was maintained until day 11 at 73 \pm 2% and 73 \pm 3% respectively (Fig. 2.2A and 2.2B). In addition, flow cytometry analyses using 7-AAD showed that at that time point, the viability of CD154 and CD70 stimulated cells was about 82 \pm 2% and 84 \pm 3% in these two conditions respectively. Moreover, monitoring of cell division using CellVue Jade assay allowed us to notice an important decrease of cell division when cells were put in the in vitro differentiation environment compared to the cells in the expansion

phase. Between days 8 and 11 in the differentiation phase (including the transition), we observed an absence of cell division while 3 to 4 divisions were observed in conditions with a high level of interaction of CD27-CD70 or CD40-CD154 (data not shown).

Finally, CD154 interaction slightly increased IgG secretion compared to CD70 interaction (Fig. 2.2C). However, IgA secretion was quite similar between the two conditions. The frequency of CD38⁺ and CD38⁺CD138⁺ cells was also similar in both conditions. In those cultures, the differentiation in the presence of CD154 and CD70 resulted respectively in a frequency of 65 ± 7% and 43 ± 7% CD27⁺ cells inside the CD138⁺ population. In regards to CD20 expression, only 2.9 ± 0.7% and 2.6 ± 0.6% of cells were positive to this marker at the end of the differentiation phase (data not shown).

We then compared the differentiation of B lymphocytes during a 14 day period in the presence of IL-6-10 combination. Figure 2.3 (A, B and C) shows the evolution of the expression of CD38 and CD138 on cultured cells in both conditions. At D0, nearly half the cells were expressing CD38 and the proportion of CD38^{hi} cells was of 17 ± 4 %. Five days after the cells were placed in a differentiation environment with either CD70 or CD154 cellular interactions, a higher proportion of CD38^{hi} cells was generated with the CD70 interaction (53 ± 7 %) than with the CD154 interaction (35 ± 6 %) (p=0.0260, n=6; Mann-Whitney). By day 14, the proportion of differentiated cells in both conditions reached 50%. Increased frequency of CD138⁺ cells, which was however not significant (Bonferroni multiple comparison test, p= 0.0564), was also noted on day 5 and 14 in the presence of CD70, 28% ± 7% and 36% ± 12% respectively, compared to 19% ± 7% and 27% ± 13% with the CD154 interaction. Additionally, both interactions led to a significant increase in the proportion of CD38^{hi} and CD138⁺ generated cells when compared to the initial profiles, namely at the end of the expansion phase (Fig. 2.3B and 2.3C). During this 14-day differentiation phase, the total expansion was negligible. i.e. less than 2-fold in both conditions, and the viability was

around 80% on day 5 and decreased gradually to approximately 50% on day 14 (data not shown).

Immunofluorescence labeling confirmed the plasma cell-like morphology of the generated cells (Fig. 2.3D). The staining highlighted the elliptical cell shape, shown through actin labeling in red and the very large cytoplasm with a decentered nucleus, which are typical plasma cell features. These observations were made on cells generated with CD154 or CD70 cellular interactions.

Important immunoglobulin secretion by in vitro differentiated B cells

To further compare the B cells generated by each interaction, immunoglobulins concentration was determined in culture supernatants on days 5 (Fig. 2.4A) and 14 (Fig. 2.4B). As shown, five days into the differentiation environment led to equivalent IgA and IgG secretion from cells in both interaction settings. IgG₁ was as expected, according to human serum level, the most secreted IgG subclass with a concentration of $51 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ following CD70 interaction and $59 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ following CD154 interaction. IgA was secreted at a very high level, with $244 \pm 137 \mu\text{g/ml}$ following CD70 interaction and $211 \pm 112 \mu\text{g/ml}$ following CD154 interaction. However in contrast to IgG₁, IgA secretion was highly variable among samples, ranging from 36 to 915 $\mu\text{g/mL}$ for CD70 interaction on day 5. IgG₁ concentration was maintained for cells cultured with CD154 until day 14 ($51 \pm 10 \mu\text{g/ml}$), while cells cultured with CD70 showed a decreased secretion of that immunoglobulin subclass ($29 \pm 4 \mu\text{g/ml}$). Moreover, IgG₃ secretion with CD154 interaction ($17 \pm 4 \mu\text{g/ml}$) was also two fold higher than with the CD70 interaction ($7 \pm 2 \mu\text{g/ml}$). Based on the high viability and absence of proliferation during the transition phase (D0 to D5), a normalization according to cell concentrations on day 5 was done in order to compare secretion levels on day 14 (Fig. 2.4C). Overall, all immunoglobulin secretion rates were equivalent in both conditions indicating similar differentiation status of generated plasmablasts and/or plasma cells.

The pattern of IgG secretion was also determined by a standard ELISPOT assay (see Supplementary material, Fig. 2.S2) for B lymphocytes submitted to CD70 or CD154 in differentiation conditions and was compared to that of plasma cells present in bone marrow samples. Differentiating B lymphocytes showed a heterogeneous IgG secretion pattern composed of small and large spots, suggesting the presence of different subtype of terminally differentiated IgG secreting-cells.

CD31 and CD39 expression on expanded B cells

To further characterize the emergent CD38^{hi} cells, we analyzed their phenotypes according to CD31 and CD39 expression before their transfer into the differentiation conditions. As shown previously (Fig. 2.3A), about half ($52 \pm 5\%$, $n=8$) of the expanded cells were positive for CD38 expression and less than 10% were CD138⁺ ($6 \pm 3\%$, $n=8$) at D0. Moreover, $22 \pm 3\%$ of the expanded cells highly expressed CD38 and up to $95 \pm 4\%$ of them were CD39⁺ with a MFI of 592 ± 63 (Fig. 2.5A). This result was observed independently of their CD138 expression. At this step, only a small proportion of cells were CD31⁺ ($9 \pm 3\%$). By the end of the differentiation phase, this cell population reached $35 \pm 2\%$ following CD154 interaction and $44 \pm 7\%$ following the CD70 interaction. Furthermore, analyses done on purified B cells before they were expanded showed that $85 \pm 3\%$ ($n=3$) were positive for CD39 expression (MFI= 238 ± 15) (data not shown). Therefore, the frequency of CD39⁺ cells remained constant during in vitro cell expansion (data not shown).

Distinct plasma cell populations in vitro

We then investigated how CD39 and CD31 evolved on differentiated CD38^{hi}CD138^{+/-} cells after 11 or 14 days in an in vitro differentiation environment. As observed for expanded B cells (Fig. 2.5B), more than 90% of generated plasma cells were positive for CD39, regardless of the interaction with CD70 or CD154 (Fig. 2.6A and Table 2.1). Moreover, culture conditions did not seem to influence the frequency of CD31⁺ cells as CD70 and CD154 interactions led to

the emergence of respectively $76 \pm 2\%$ and $74 \pm 3\%$ CD31⁺ cells among the CD38^{hi}CD138⁺ cells (Fig. 2.6C and Table 2.1). However, a smaller proportion of the CD38^{hi}CD138⁻ cells expressed CD31. Following the CD70 or CD154 interactions, only $37 \pm 7\%$ and $25 \pm 7\%$ respectively expressed CD31. This difference was also observed through the CD31 mean fluorescence intensity (MFI) that was much higher for CD38^{hi}CD138⁺ cells (MFI 568 ± 108) than for CD38^{hi}CD138⁻ cells (180 ± 19) when submitted to CD70 interactions. Overall, four populations of CD38^{hi}CD39⁺ were observed in vitro following CD70 or CD154 interactions, namely CD138⁺CD31⁺, CD138⁺CD31⁻, CD138⁻CD31⁺ and CD138⁻CD31⁻ cells.

CD31 and CD39 expression on bone marrow and peripheral blood plasma cells

The frequency of CD38^{hi}CD138⁻ and CD38^{hi}CD138⁺ was evaluated in 14 peripheral blood (PB) samples and ten bone marrow (BM) samples (Table 2.1). In PB, about 0.3% of CD38^{hi} cells were detected, which can be separated into equal frequency of CD138⁻ and CD138⁺ cells as reported elsewhere [240]. In BM, we observed about 2% of CD38^{hi} among the mononuclear cells [262], which included about 25% of CD138⁺ cells. The phenotype of PB and BM CD38^{hi} plasma cells was then evaluated according to CD31 and CD39 (Fig. 2.6B and Table 2.1). PB plasma cells were predominantly CD31⁺, with $81 \pm 5\%$ of CD138⁻ cells and $93 \pm 2\%$ of CD138⁺ cells. Furthermore, CD31 expression was fivefold higher on CD138⁺ plasma cells (MFI = 1547 ± 223) versus CD138⁻ plasma cells (MFI = 310 ± 44). In the blood, CD39⁺ cells frequency within the CD38^{hi}CD138^{+/-} population was lower ($34 \pm 5\%$) than their in vitro generated counterpart. BM plasma cells showed a significant difference of CD39⁺ cells frequency, with $33 \pm 2\%$ of CD38^{hi}CD138⁻ and $55 \pm 2\%$ of CD38^{hi}CD138⁺ cells. Besides, the proportions of CD31⁺ cells were respectively of $43 \pm 2\%$ and $80 \pm 3\%$ among those plasma cell subsets. Though the proportion of CD39⁺ and CD31⁺ plasma cells were similar in the PB and BM, the expression level of CD31 was eight

times higher on PB CD138⁺ plasma cells compared to the same population in the BM (MFI: 194 ± 12).

Overall, there was no significant difference in the proportion of CD31⁺CD138⁺ plasma cells found in vivo and in vitro. There was however a striking difference in CD39 expression. Indeed, the expression level of this surface marker was more than 10 times higher on vitro generated CD138⁺ plasma cells than PB and BM plasma cells.

Discussion

In this study, we have shown that CD27-CD70 and CD40-CD154 interactions can both induce switched-memory B lymphocytes differentiation into CD38^{hi}CD138^{+/-} plasma cells. We also demonstrated that such in vitro generated plasma cells were heterogeneous according to their CD31 and CD39 expression profiles. We observed that the final frequency of generated CD38^{hi}CD138[±] cells was equivalent in both conditions after 14 days. However, we also found that the CD70 interaction led to a much faster differentiation in the first 5 days. The functional potential of the newly-generated plasma cells with both interactions was assessed and found to be similar with IgA and IgG₁ secretion as high as 200 µg/mL and 60 µg/mL, respectively. Further characterization of the in vitro generated CD38^{hi}CD138^{+/-} plasma cells also showed that CD39 was present on more than 80% of these cells while CD31 was present on about a quarter of the CD138⁻ and on approximately 75% of the CD138⁺ population with a significantly higher frequency as well as level of expression on the latter plasma cell subset.

The selected in vitro differentiation environment was based on low levels of CD70 and CD154 interactions combined to IL-6 and IL-10. These conditions were found to be the most effective for commitment to differentiation with concomitant negligible proliferation. It has been largely reported that IL-6 and IL-10 were excellent to drive B cell differentiation drivers. [477, 503] Moreover, in accordance with the reported in vivo process in germinal centers, the switch from expansion to differentiation led to a reduced cell expansion rate in our culture system [474]. The fast differentiation induced by the CD70 interaction between day 0 and 5 can illustrate the rapid in vivo differentiation of memory B lymphocytes following antigen encounter, when CD27⁺ B cells interact with CD70⁺ T cells [489, 504], following proliferation signalling through the CD40-CD154 interaction [489]. Interestingly, the low level of CD40-CD154 interaction seems to have a delayed but similar role during long-term culture. The culture system developed in this study simulates the germinal center reaction during a

secondary immune response and could be used for the production of large amounts of plasma cells in vitro. For instance, we have previously established that memory B cells can be expanded to 2000-fold in 20 days [418]. We show here that their transition into differentiation provides after 5-7 days at least 50% of CD138⁺ cells with a viability of 80%. Consequently, we could generate, starting with 1x10⁶ memory cells, nearly 800x10⁶ cells committed to terminal differentiation into plasma cells.

Furthermore, IgG secretion rate in this system can reach up to 13 µg/10⁶cells/h with the CD154 interaction (Fig. 2.1), which is higher than several in vitro models developed to date [232, 281, 289, 482, 492]. Taken together, we can conclude that the observed effects of those two interactions are due to the molecular pathway of the expressed surface molecule (CD70 on 3H7 cells and CD154 on L4.5 cells) during cellular interaction and not related to the co-cultured cell line since L929mock, which was used to construct 3H7 and L4.5 cell lines [486, 501] did not allow B lymphocyte differentiation (Fig. 2.2B). Furthermore, their use in our culture system actually highly hindered cell viability.

This model enables to circumvent the plasma cells rarity in circulation or in the bone marrow, thus we studied two extracellular markers CD31 and CD39 in order to discriminate between plasmablasts and plasma cells, as proposed by de Vos and coll. [494]. CD31 is an adhesion molecule that participates in cellular interactions [505, 506] and is a ligand for CD38 [507]. Their interaction has been associated with the microenvironment of leukemia cells [508-510] and high CD31 density has been associated to B-cell chronic lymphocytic leukemia [511]. On the other hand, CD39 is an integral membrane protein, whose main role is to metabolize extracellular ATP and ADP into AMP [280]. The CD31⁺CD39^{+/-} profile is expected for terminally differentiated B lymphocytes from peripheral blood as well as bone marrow plasma cell [282, 427, 494]. Our results show a prevalence of CD31⁺ cells (74% to 77%) among the CD38^{hi}CD138⁺ population, and a lower expression (25% to 29%) within the CD38^{hi}CD138⁻ in vitro generated plasma cells population. However, the expression of CD39 indicates that the in vitro

generated PCs are one step preceding fully differentiated PCs and can be lost in response to migratory stimuli or the modifications of their microenvironment. Our finding that in vitro generated PCs were characterized by a higher CD31⁺ cell population among CD138⁺ plasma cells, indicates that we produced a mature plasma cell population [232, 240, 512]. Moreover, increased expression of CD31 on plasma cells correlate with the mRNA expression profile in plasmablasts and plasma cells [494]. The investigation of CD31 and CD39 expression can be a useful tool for plasma cell characterization and may allow uncovering subsets with specific roles during an immune response as recently reported [513, 514]. Furthermore, CD31 being a ligand for CD38 [515], their co-expression on plasma cells suggests a role for this interaction in the plasma cell survival niche as already proposed for leukemia cells [507, 510].

In conclusion, we have developed a culture system using either CD70 or CD154 interactions enabling the in vitro culture of CD31⁺CD38^{hi}CD39⁺CD138⁺ cells, which have similar phenotype to bone marrow CD138⁺ cells. The large amounts of plasma cells that can be generated with this system can now be exploited to produce differentiated B-cells from patients or vaccinated volunteers, enabling the further characterization of memory B cells specific to a known antigen. Moreover, ex vivo production of plasma cells could also, as proposed elsewhere [240], be used for their protective role during stem cell transplantations in immunocompromised patients. The cells generated in the system described herein could thus become a new source of passive immunity during the period of vulnerability to opportunistic infections before the complete restoration of the patients' immune system.

Acknowledgment

We thank all the volunteers who participated in this study. We thank Annie Roy for her technical assistance in the culture of B lymphocytes and all related methods. We are grateful to Marc Cloutier Ph.D. for excellent critical review and manuscript editing.

Figures legends

Figure 2.1: In vitro plasma cell generation and cytokine microenvironment

B lymphocytes were expanded for 19 days with IL-2, IL-4 and IL-10 at high interaction level with CD154. The same interleukin combination was used for the differentiation phase (filled symbols and bars) or the cells were cultured from day 19 with a combination of IL-6 and IL-10 (empty symbols and bars). The transition and differentiation phases lasted a total of 18 days with a low CD154 interaction. The results shown are the mean of 6 independent experiments. **(A)** Cell expansion **(B)** Cell viability **(C)** IgG secretion rate in the differentiation environment, from D19 to D38 **(D)** IgG, A and M secretion on day 33 supernatants **(E)** IgG subclasses secretion on day 33 supernatants. A significant difference was noticed in IgG1 secretion among the two interleukins combinations. Statistical analyses were done using the Bonferroni t test and the p value was < 0.05 **(F)** CD38 and CD38⁺CD138⁺ cells frequency. The IL-6-10 combination generated a larger CD38⁺ cell population on day 33, confirmed by a paired t test, p value = 0.0188. All errors bars stand for SD and can be smaller than symbols.

Figure 2.2: Proliferation and viability following low CD70 and CD154 interaction

B lymphocytes were monitored following their stimulation with CD70, CD154 as well as for their response to the mock L929 cell line using a low ratio (1:20) for all support cells. **(A)** Proliferation and **(B)** viability were measured on days 4, 8 and 11. The time laps between days 0 and 4 are the transition phase and differentiation phase was started on day 4 and lasted until day 11. **(C)** Secretion of IgG and IgA were measured by ELISA assay with the pooled supernatant harvested on days 6, 8 and 11. **(D)** At the end of the differentiation phase (day 11), B lymphocytes were analysed using flow cytometry to evaluate the frequency of CD38⁺ cells and CD38⁺CD138⁺ cells. These results are

representative of 5 independent experiments. All errors bars stand for SD and can be smaller than symbols.

Figure 2.3: Generation of plasma cells from switched-memory B lymphocytes

Monitoring of plasma cell generation in the differentiation phase was done by flow cytometry and all analyses were done on viable cell populations. The results are presented as the mean \pm S.E.M. of 6 independent samples **(A)** CD38 and CD138 expression profiles on D0, 5 and 14. D0 being the day that the expanded memory B cells were thawed and were put in culture with CD70⁺ or CD154⁺ cell lines. **(B)** CD38^{hi} cells frequency. The comparison of CD38^{hi} cells frequency at D5 was determined using a Mann-Whitney test, p value= 0.0260. For the monitoring of CD138⁺ cells frequency **(C)**, the Kruskal-Wallis test was used (*p value < 0.05; **p value <0.01; ***p value <0.001). **(D)** Generated plasma cells morphology at D14 shown by fluorescence microscopy (100X immersion oil objective). Blue: nucleus; Red: actin. Representative cells are shown.

Figure 2.4: In vitro generated plasma cells secrete high level of IgA and IgG

Immunoglobulin secretion in supernatants was measured by the Bio-Plex human Isotyping Kit. The cumulated Ig concentration was determined on **(A)** day 5 (D5) after the transition phase and **(B)** day 14 (D14) at the end of differentiation **(C)** Relative secretion was determined on D14 by normalising immunoglobulin concentrations with total cell count on day 5, corresponding to the plateau in proliferation. The results are presented as the mean \pm S.E.M. of 6 independent samples. No differences were observed between CD70 and CD154 conditions.

Figure 2.5: High frequency of CD39⁺ cells among the expanded B lymphocyte population

Viable cells were analyzed for CD31 and CD39 expression before their transfer into differentiation conditions (D0) **(A)** Profiles of total viable cells according to CD38 and CD138 (left) and to CD31 and CD39 (right) are shown. The CD38^{hi}CD138^{+/-} cells represented 22 ± 3% of the cell population in the presence of CD154 interaction **(B)** and 25 ± 6% in the presence of CD70 **(C)**. They represented 14 ± 2% of the population when in the simultaneous presence of both interactions **(D)**. These cells were further analyzed for their expression of CD31 and CD39 according to their expression of CD138 as indicated in **B**, **C** and **D**. These results are representative of 11 and 10 independent experiments for the stimulation with L4.5 cells (B) or 3H7 cells (C), respectively. The results in D are representative of three independent experiments.

Figure 2.6: CD31 as an in vivo and in vitro generated plasma cell marker

Analyses were done on cells submitted to 14 days in differentiation conditions. **(A)** D14 viable CD38^{hi} cells were analyzed based on their CD31 and CD39 expression. Plots are representative of 10 independent experiments for the CD70 interaction and 13 for the CD154 interaction. **(B)** Bone marrow and peripheral blood plasma cells (viable CD45⁺CD38^{hi}). Plots are representative of 10 and 14 independent experiments for bone marrows and for peripheral blood, respectively. **(C)** Comparison of CD31 and CD39 expression and frequency on generated (CD70 and CD154) and in vivo (PB and BM) plasma cells. CD138⁻ (-) and CD138⁺ (+) plasma cells expression profiles were compared using the Unpaired t- or the Mann-Whitney test (* indicating a significant difference with p values <0.03). The expression profile of CD138⁻ (-) cells from different origins were compared (** indicating significant differences with p values < 0.02), as well

as CD138⁺ (+) plasma cells (***) indicating significant differences with p values < 0.006) using the Kruskal-Wallis test.

Supplemental Figure 2.1: Experimental model

Purified switched memory B lymphocytes were cultured for 19 days in the presence of a high level of CD154-CD40 interaction (1 :5 ratio) provided by the contact with L4.5 cell line (Phase I or expansion phase). The cells were then cryopreserved or not. As a second step (Transition between Phase I and Phase II) the expanded cells (fresh or thawed) were transferred in the presence of a low level of interaction (1:20 ratio) provided by the L4.5 cell line (CD154+ cells) or by the 3H7 cell line (CD70+ cells). The cytokines were as indicated a mix of IL-2, IL-4 and IL-10 during Phase I, then IL-6 was added for the transition and IL-2 and IL-4 were removed and replaced by IL-10. The culture days are indicated for each step, namely 19 days for Phase I, 4 days of transition (D +4) and 7 to 10 supplemental days (D + 11/14).

Supplemental Figure 2.2: Secreting patterns of bone marrow PC compared to in vitro generated PC

(A) ELISPOT assays were done to determine the secretion patterns of bone marrow plasma cells; in this example about 0.13% of total seeded cells were IgG secreting cells. **(B)** B lymphocytes were stimulated for 9 days in differentiation conditions and compared to bone marrow. Each pattern presented here contained 62 spots; corresponding to 62,500 seeded bone marrow cells (0.09%) and 625 differentiated B lymphocytes (10%). **(C)** B lymphocytes stimulated for 9 days in differentiation conditions using CD70 or CD154 feeder cells were compared for their IgG-secreting cells frequencies. In this example, CD70 and CD154 interaction gave 16% and 31% of secreting cells, respectively. Bone marrow ELISPOT patterns are representative of 5 independent assays while

ELISPOT patterns for B lymphocytes submitted to either CD154 or CD70 interaction are representative of three independent assays.

Table

Table 2.1 : CD31⁺ and CD39⁺ cells frequencies within plasma cells in vitro and in vivo

| Cell origin ¹ | Subsets ² | | Phenotype of CD38 ^{hi} CD138 ^{+/-} cells ³ | | | |
|--------------------------|----------------------|-------------|---|--------|------------|--------|
| | | | CD39 | | CD31 | |
| | CD138 | (%) | MFI | (%) | MFI | (%) |
| CD70 | neg | 23 ± 3 | 515 ± 127 | 81 ± 6 | 180 ± 19 | 29 ± 7 |
| | + | 21 ± 4 | 687 ± 78 | 91 ± 2 | 568 ± 108 | 77 ± 2 |
| CD154 | neg | 26 ± 3 | 512 ± 100 | 81 ± 6 | 140 ± 23 | 25 ± 7 |
| | + | 18 ± 2 | 694 ± 69 | 91 ± 2 | 526 ± 72 | 74 ± 3 |
| Blood | neg | 0.16 ± 0.02 | 44 ± 14 | 34 ± 5 | 310 ± 44 | 81 ± 5 |
| | + | 0.15 ± 0.03 | 59 ± 11 | 34 ± 5 | 1547 ± 223 | 93 ± 2 |
| Bone marrow | neg | 2.17 ± 0.28 | 9 ± 0.3 | 34 ± 2 | 67 ± 7 | 43 ± 2 |
| | + | 0.41 ± 0.08 | 52 ± 2,8 | 54 ± 2 | 194 ± 12 | 80 ± 3 |

¹ B lymphocytes following in vitro differentiation in the presence of CD70 (n=10) or CD154 (n=13) for 11 and 14 days or mononuclear cells isolated from peripheral blood (n=14) and bone marrow samples (n=10).

² The frequency of CD38^{hi} cells was further analyzed in relation to the expression of CD138.

³ CD31 and CD39 frequency and MFI were determined on CD38^{hi}CD138⁻ (neg) and CD38^{hi}CD138⁺ (+) as indicated.

Figures

Figure 2.1 : In vitro plasma cell generation and cytokine microenvironment

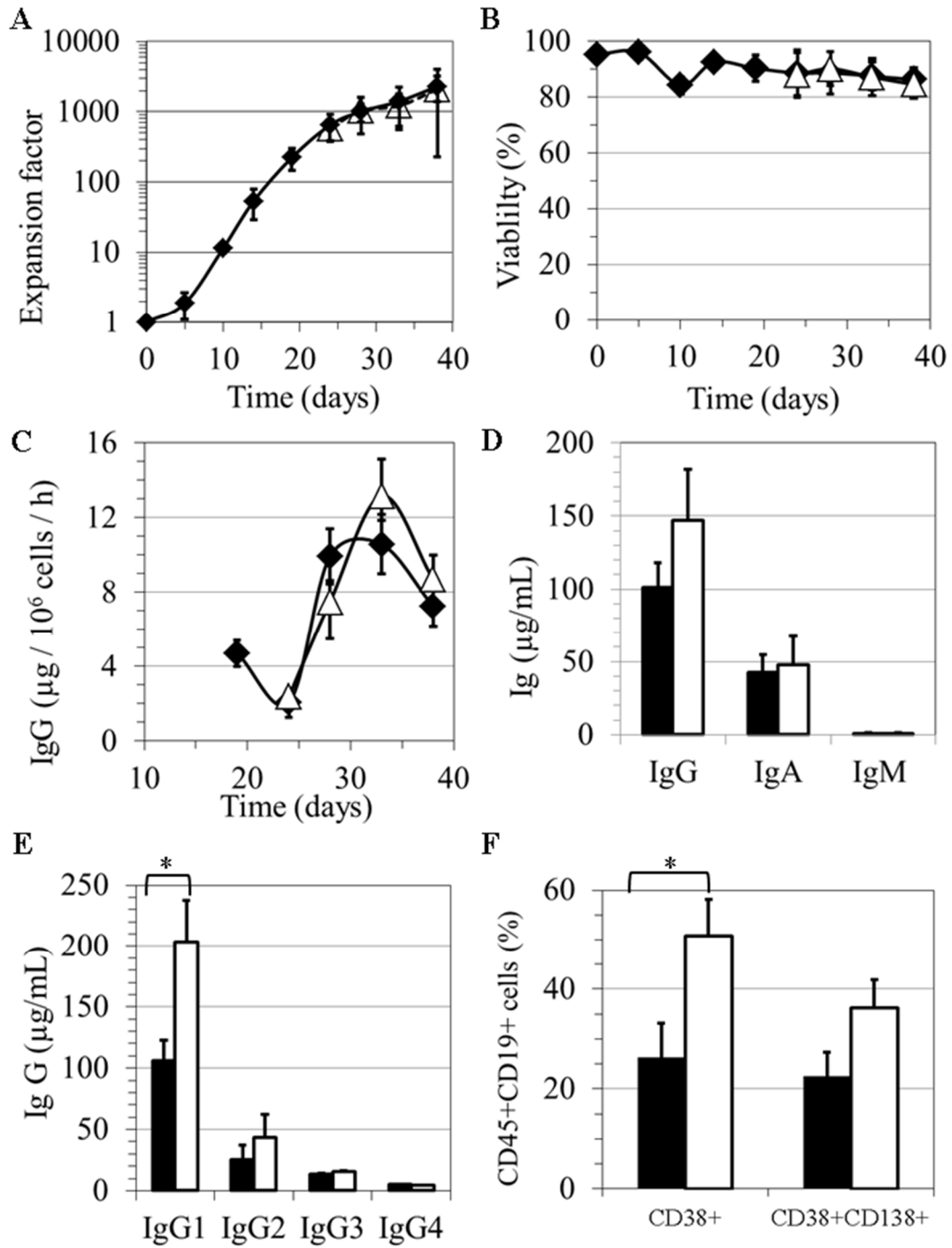


Figure 2.2 : Proliferation and viability following low CD70 and CD154 interaction.

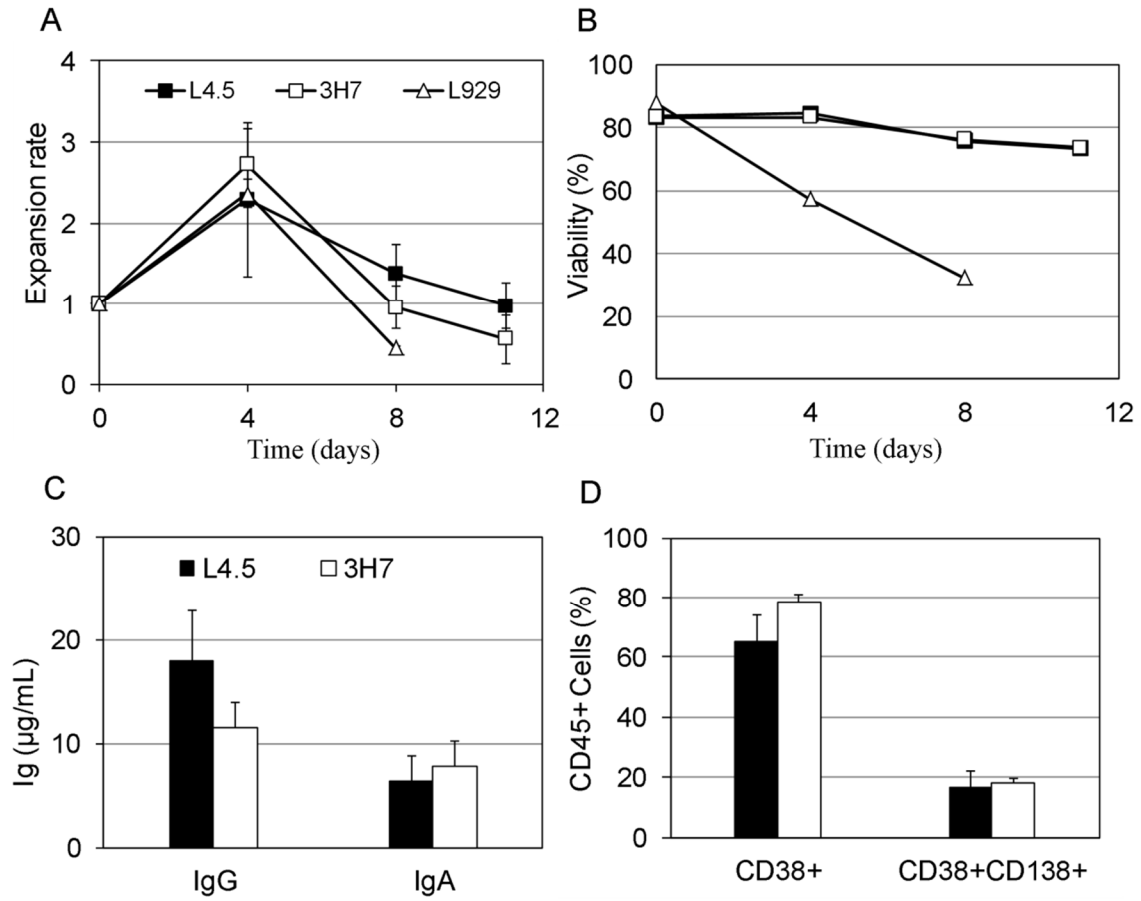


Figure 2.3 : Generation of plasma cells from switched-memory B lymphocytes

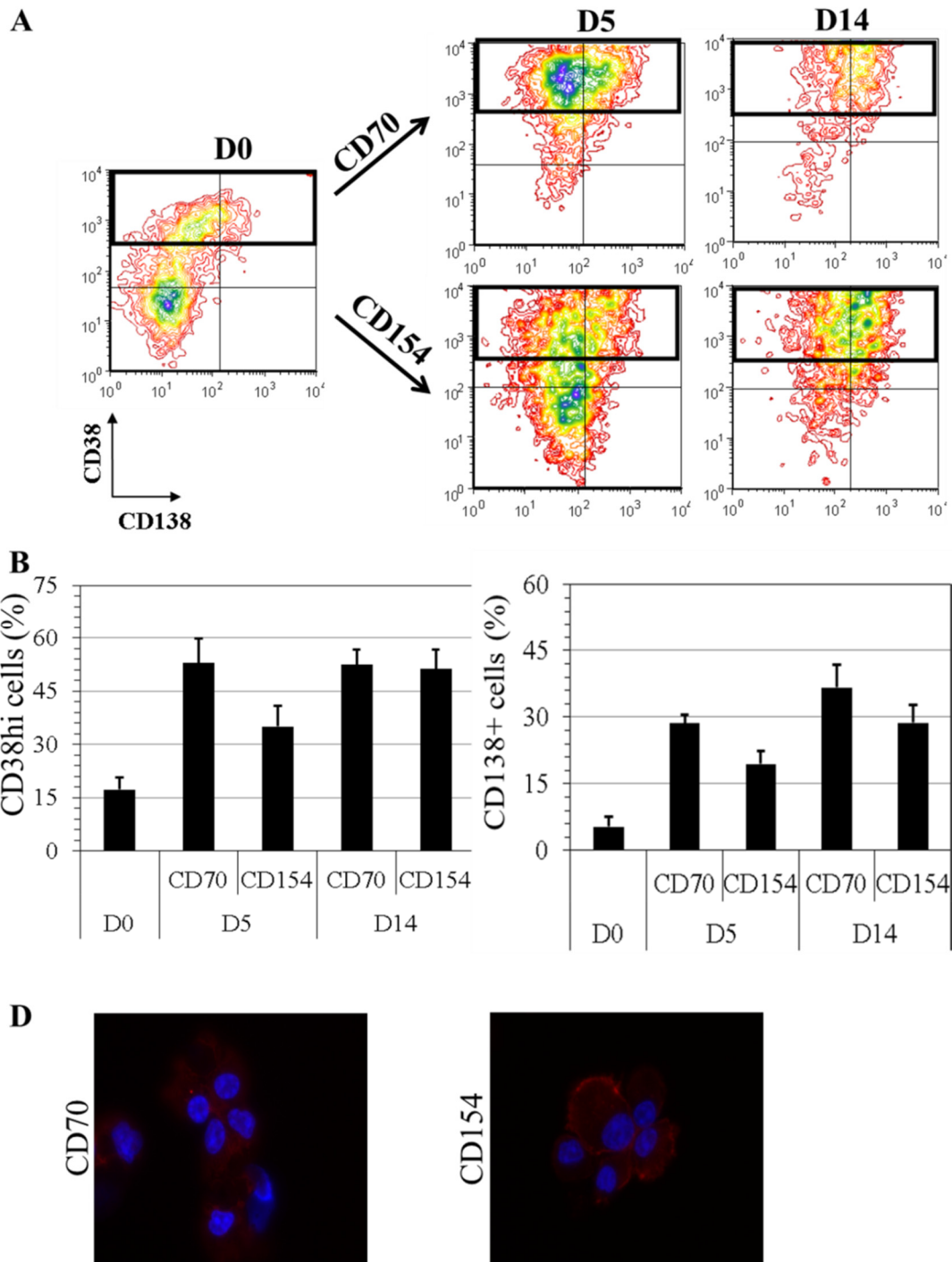


Figure 2.4 : In vitro generated plasma cells secrete high level of IgA and IgG

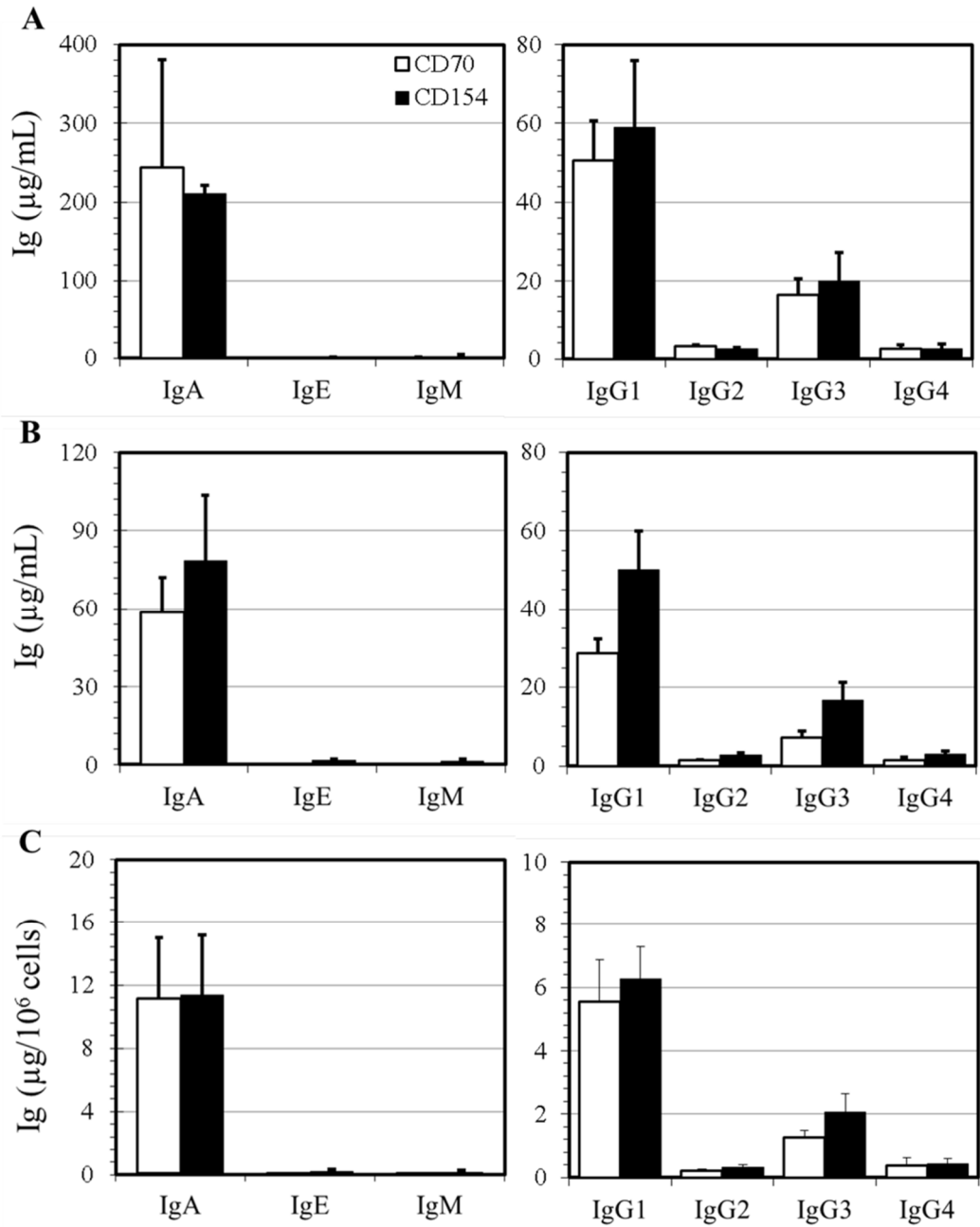


Figure 2.5 : High frequency of CD39⁺ cells among the expanded B lymphocyte population

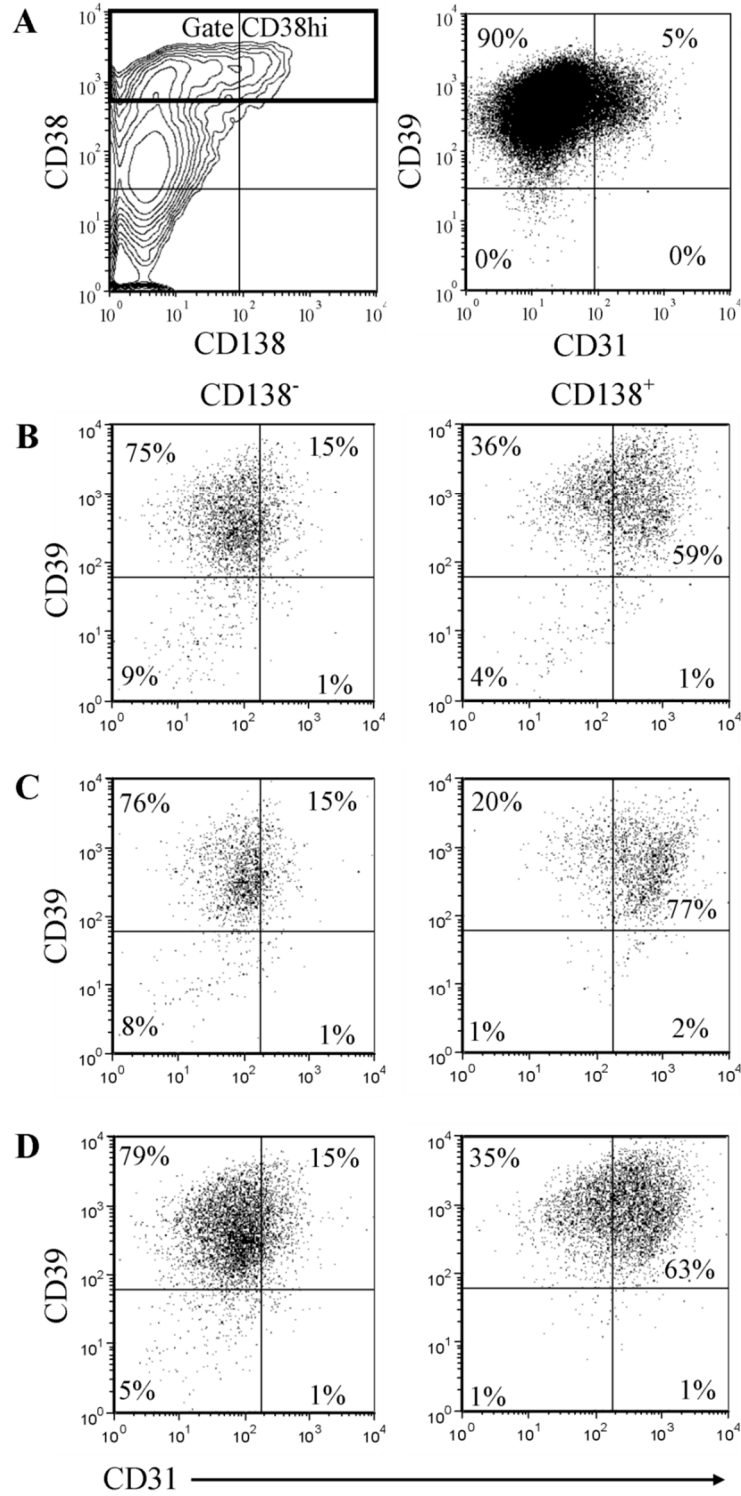
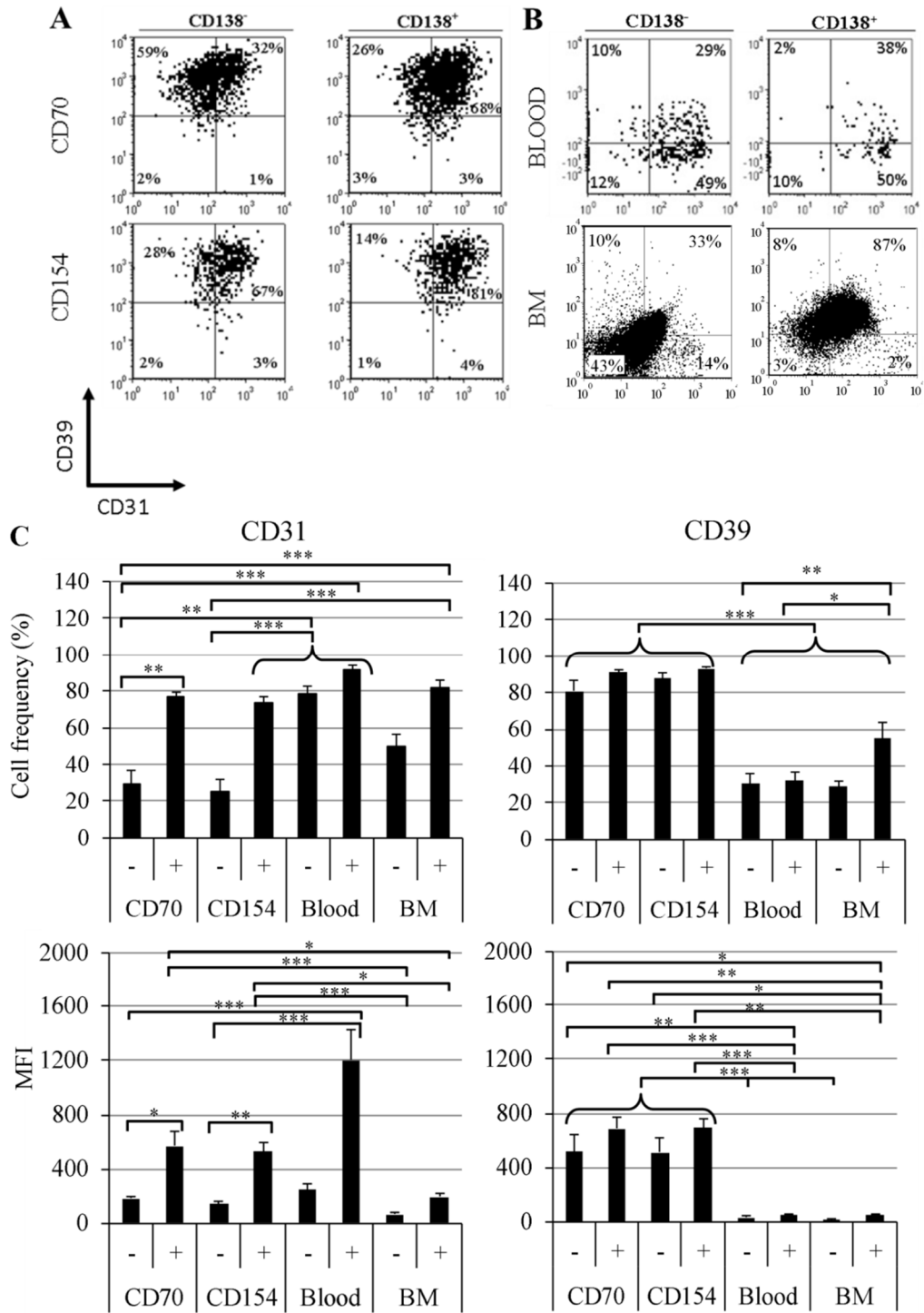


Figure 2.6 : CD31 as a in vivo and in vitro generated plasma cell marker



Supplemental Figures

Figure 2.S1 : Experimental model

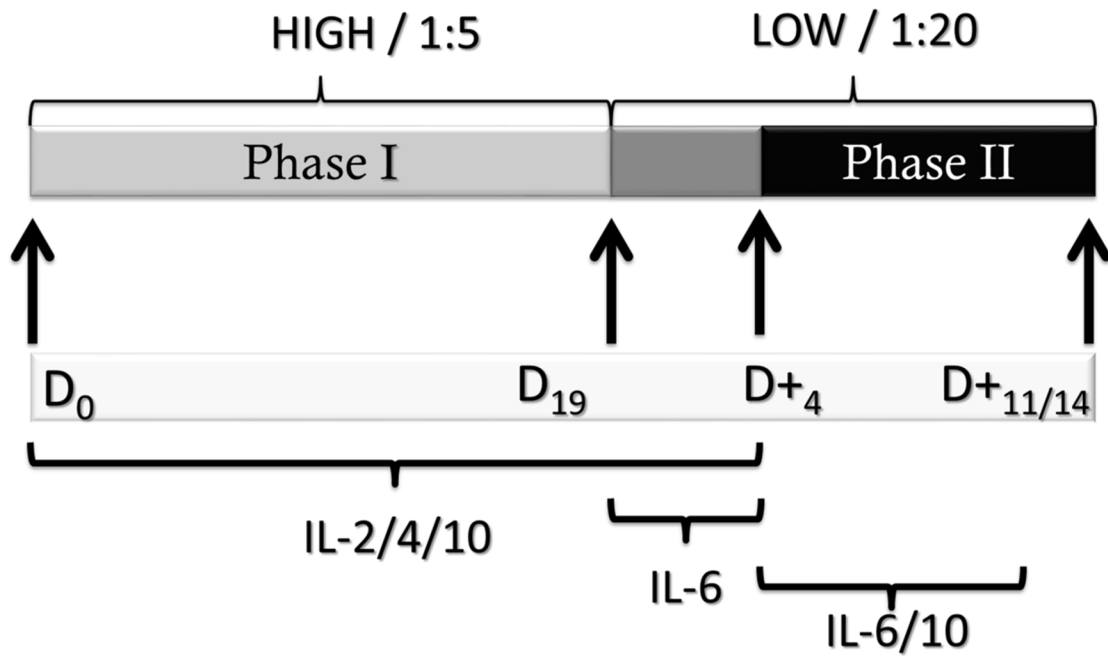
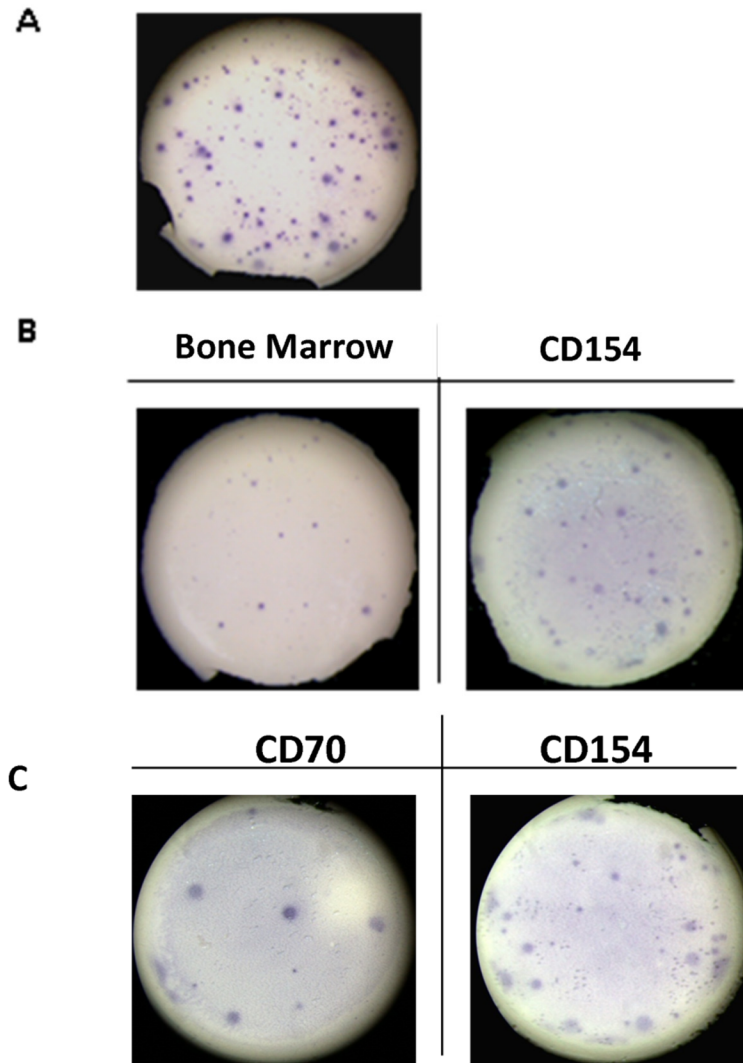


Figure 2.S2 : Secreting patterns of bone marrow PC compared to in vitro generated PC



Chapitre III – Les cellules souches mésenchymateuses favorisent la différenciation des lymphocytes B mémoires humains en plasmocytes dans un milieu sans sérum

Auteurs : Guillaume Bonnaure, Catherine Gervais Saint-Amour et Sonia Néron

Contribution des auteurs :

Guillaume Bonnaure a élaboré et réalisé les expériences présentées dans cet article. Catherine Gervais Saint-Amour a participé à la réalisation de ces manipulations. L'intégralité des résultats ont été analysés par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron. Finalement, la rédaction de l'article a été effectuée par Guillaume Bonnaure et Sonia Néron, qui a supervisé l'ensemble de ces travaux.

Article révisé soumis à Journal of Immunological Research (21-07-2016)

Résumé

De nos jours, plusieurs modèles basés sur une interaction CD40-CD154, permettent d'expansionner et différencier des lymphocytes B mémoires en cellules aux caractères plasmocytaires in vitro. Dans le but d'optimiser ces procédés, nous avons utilisé des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse afin de recréer en culture, une niche de résidence des plasmocytes à longue vie. En parallèle, l'intégralité du modèle a été réalisée dans des conditions exemptes de sérum animal. Nos résultats ont montré que les conditions en présence de MSC, favorisent la génération ainsi que la survie des plasmocytes obtenus, comparativement à une stimulation par le CD40. La détection de CXCL12 et TGF- β 1, sécrétés par les MSC, confirment le rapprochement avec l'environnement de la moelle osseuse. Finalement, à travers ce modèle, nous avons montré qu'il est possible de générer in vitro des plasmocytes, dans un milieu exempt de sérum animal.

Title: Bone marrow mesenchymal stem cells enhance the differentiation of human switched memory B lymphocytes into plasma cells in serum-free medium

Authors : Guillaume Bonnaure^{1,2}, Catherine Gervais-St-Amour^{1,2}, Sonia Néron^{1,2}

¹ Héma-Québec, Recherche et Développement, Production cellulaire, Québec, Québec, CANADA

²Université Laval, Faculté des sciences et de génie, Département de Biochimie, Microbiologie et Bioinformatique, Québec, Québec, Canada

Short title : Mesenchymal stem cells enhanced plasma cell differentiation

Abstract

The differentiation of human B lymphocytes into plasma cells is one of the most stirring questions with regards to adaptive immunity. The ability to expand and differentiate human B cells under CD154 stimulation has led to several well-established models. However, the terminal differentiation and survival of plasma cells are still topics with much to be discovered, especially when targeting switched memory B lymphocytes. It is known that plasma cells can migrate to the bone marrow in response to a CXCL12 gradient and survive for several years while secreting antibodies. The main actors known in this specific niche are mesenchymal stem cells, which provide survival factors such as IL-10. In this study, we aimed at getting a closer representation of those niches favoring plasma cell survival. To mimic such an environment, we tested low oxygen concentrations and co-culture with mesenchymal stem cells (MSC) from human bone marrow. Besides, all expansion and differentiation assays were performed using an animal protein-free medium. Overall, our model enables the generation of high proportions of CD38⁺CD138⁺CD31⁺ plasma cells (≥50%) when CD40-activated switched memory B lymphocytes were cultured in direct contact with mesenchymal stem cells. In these cultures, the secretion of CXCL12 and TGF-β, cytokines usually found in the bone marrow, was linked to the presence of MSC. The level of oxygen appeared less impactful than the contact with MSC. In summary, following their in vitro expansion through CD40 activation, switched memory B lymphocytes can be differentiated into plasma cells. Finally, this is the first report of in vitro plasma cells generation using exclusively a serum-free medium.

Introduction

Following their activation, memory B lymphocytes differentiate into plasmablasts, namely a pre-plasma like-cell, which can simultaneously proliferate and secrete antibodies [474]. Plasmablasts can quickly differentiate into short-lived plasma cells that secrete high amounts of antibodies, more than 10.000 molecules per cell per second [157, 226]. An increase in reactive oxygen species secondary to this important protein synthesis causes an oxidative stress responsible for their short lifespan [227, 516]. IgG short-lived plasma cells are known to migrate toward infection sites, while IgA populations favor mucosal tissues [255, 256]. A germinal center reaction will generate memory B lymphocytes as well as a second wave of «memory» plasma cells, which will strengthen the initial wave of short-lived plasma cells [122] that may migrate and persist in survival niches in the bone marrow [151]. To reach the bone marrow micro-environment, plasma cells need to express the protein C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) [268, 278], a Transmembrane Activator and CAML Interactor (TACI) [517, 518]. These receptors bind C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12) and A Proliferative Induced Ligand (APRIL) [268, 519]. IL-6 is also present and acts as pro-survival factor [268]. Furthermore, as plasma cell niches found in the bone marrow are limited in number, a competition occurs within resident cells and newly-formed cells to replenish the long lived plasma cell pool [279, 280].

Bone marrow niches involved in plasma cell survival are highly complex environment characterized by a very low level of oxygen (pO_2), ranging from 1 to 6%, depending on blood vessel vicinity [316, 520]. These niches include several cell populations [291], such as megakaryocytes [313], basophils [314], monocytes [517], macrophages [271], dendritic cells [71] and T-cells [296]. Mesenchymal stem cells (MSC) as well as eosinophils are also present in bone marrow niches and appear to be essential for plasma cell survival [151, 307, 312, 521]. Eosinophils secrete IL-6 as well as APRIL, both promoting the maintenance and survival of plasma cells in the bone marrow for several years [522]. In the

bone marrow, eosinophils are found to be highly proliferative and located in the vicinity of plasma cells [307, 312]. MSC are involved in the secretion of extracellular components and cytokines [523]. MSC secrete CXCL12 [524, 525], which is involved in plasma cell migration as well as survival in bone marrow niches [304, 305]. MSC secrete transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) and TGF- β 2, involved in B-cell homeostasis and death regulation in mouse models [526, 527]. In addition, MSC can synthesize extracellular matrix molecules such as laminin, heparan sulfate and elastin [271, 523, 528]. As reported in a mouse model study, the ability of plasma cells to adhere to their bone marrow niche is necessary for their survival, and can be impaired by anti-VLA-4 and anti-LFA treatments [303]. Besides, VCAM-1 and ICAM-1, which are natural ligands for VLA-4 and LFA, respectively, are present on MSC and are involved in cell-cell as well as extracellular matrix interactions [529].

The requirement for MSC in plasma cell bone marrow niches is well-established [151, 312]. However, their role on human B-cell maturation is still controversial [530]. MSC from human bone marrow were shown to inhibit proliferation, [531, 532] and B-lymphocyte Ig secretion following polyclonal activation with CpG [533]. In contrast, MSC have been shown to promote LPS-activated B-lymphocyte IgG secretion [534].

Currently, studies on the generation of differentiated B lymphocytes are often based on in vitro interaction with CD154 [63]. These culture models support the differentiation of naive [86, 285-287] or activated B lymphocytes [127, 288, 395] upon CD40 activation in the presence of a cocktail of cytokines such as IL-4, IL-10 and IL-6. Such in vitro-generated plasma cells are often close to a short-lived phenotype, showing very high levels of Ig secretion and a limited capacity to proliferate. In fact, the majority of in vitro models generate short-lived plasma cells. Conversely, the study of long-lived plasma cells has been quite challenging. Actually, only a few studies have reported the successful generation of long-lived plasma cells in vitro [269, 289]. The goal of this study was to establish culture conditions enabling the differentiation of switched memory B

cells into plasma cells using a bone marrow-like environment. For this purpose we used a defined serum-free medium to avoid undesired interactions with animal proteins and to exert maximum control over the components present in the medium. Here, we describe a three-phase culture system which generates high proportions of CD31⁺CD38⁺CD138⁺ plasma cells, using interactions with human bone marrow mesenchymal stem cells.

Materials and methods

Isolation of switched memory B lymphocytes

This study has been approved by Héma-Québec's Research Ethics Committee. Regular platelet donors who agreed to participate in this study have all signed an informed consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were recovered from leukoreduction chambers of plateletpheresis apparatus (Trima Accel, Terumo BCT, Lakewood, CO) and stored frozen as previously described [450]. Switched memory CD19⁺ B lymphocytes were isolated from PBMC by a two-step negative selection using the EasySep™ B Cell Enrichment kit and EasySep™ custom cocktail removing all IgD⁻ and IgM⁺ cells (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), as previously described [395]. The purity of CD19⁺IgD⁻IgM⁻ intact switched memory B lymphocytes was higher than 95%, as determined by flow cytometry.

Human Mesenchymal Stem Cells

Mesenchymal stem cells from human bone marrow were obtained from Lonza (Walkerville, Maryland, USA). Human bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) were cultured in α -MEM from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, CANADA) with 10% Fetal Bovine serum from Life technology (Burlington, ON, CANADA) and 2 mM glutamax from Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA). A master bank was prepared by expanding the cells for 7 days using a Quantum Cell expansion System from Terumo BCT (Lakewood, CO, USA). The MSC population was homogeneous, with > 95% of the cells of phenotype CD73⁺CD90⁺CD105⁺, as determined by flow cytometry [535].

CD154⁺ murine cell line and human eosinophilic cell line

L4.5 cells are modified L929 mock cells expressing CD154 at their surface [501]. These adherent cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 5% low IgG Fetal bovine serum (FBS), both from Life

Technologies. L4.5 cells were irradiated with 7500 rad using a GammaCell 1000 Elite ^{137}Cs - γ -irradiator (Nordion International, Kanata, Canada) in order to inhibit their proliferation [536]. The human eosinophilic cell line EOL-1 was obtained from DSMZ (ACC 386; Braunschweig, Germany). They were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) with 10% ultra-low IgG FBS, from Life Technologies. After 10 days of culture, EOL-1 cells were activated for 9 days with 0.1 mM dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) from Sigma-Aldrich.

Culture of human CD40-activated B cell

Components of culture media

Switched memory B lymphocytes were cultured in two different media. The first one, termed FBS, was made of IMDM, 10% ultra-low IgG fetal bovine serum (FBS) and 1 % ITS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ human insulin, 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ human transferrin, 6.7 ng/ml sodium selenite), all from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The second medium is a Bovine protein free medium (BPFM) [396]. In addition to the supplements added to IMDM, BPFM was supplemented with 60 ng/ml of long-R3 insulin-like growth factor 1 (IGF-1), 100 μM of Trolox and 5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human holo-transferrin from Sigma-Aldrich; Lipid mixture 1 (LP-1), composed of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ arachidonic acid and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each of limoleic, linolenic, myristic, palmitic, stearic, and oleic acids, and 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cholesterol from New Zealand sheep's wool, 2.2 mg/ml Tween-80, 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tocopherol acetate and 100 mg/ml Pluronic F-68 from Sigma-Aldrich; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of low density lipoprotein (LDL) from STEMCELL Technologies; 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 5% human serum albumin (HSA) from Bayer Inc. (Toronto, ON, Canada) and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human recombinant insulin from Life Technologies.

Cytokines and co-culture conditions

Cytokines were added following a three-step culture protocol. During the expansion phase, 50 U/ml of interleukin 2 (IL-2), 120 U/ml of IL-4 and 20 U/ml of IL-10, all from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) were added. In these conditions,

irradiated L4.5 cells were seeded with switched memory B cells at a ratio of one L4.5 for 5 B lymphocytes (1:5) to sustain proliferation for 8 to 12 days [419, 482]. For the 4-day long second phase, called transition phase, 10 U/ml IL-6 (from Peprotech) was added to the medium to induce switched memory B-cell differentiation. In addition, the L4.5:B-cell ratio was reduced to 1:20. The last step, the differentiation phase, was performed in the presence of 10 U/ml IL-6 and 20 U/ml IL-10. Control was performed with L4.5 cells at a constant 1:20 ratio. At the end of the culture, irradiated L4.5 cells represent less than 5% of total harvested cells (data not shown).

Assays in the presence of activated EOL-1 cells were achieved at a 1:20 ratio with switched memory B lymphocytes in a 6.5 mm polycarbonate Transwell with 5 μ m pores (Fisher, Pittsburgh, PA, USA). EOL-1 cells were seeded in the top well, while switched memory B lymphocytes were seeded in the bottom well in presence of L4.5 cells at a ratio of 1:20. MSC were seeded with B lymphocytes at a 1:5 ratio. In Transwell conditions, MSC were plated in the top well, with or without activated EOL-1. For direct contact assays, MSC were seeded in Primaria 24 wells (Fisher) 1 hour before the addition of B lymphocytes.

The differentiation phase was performed for 8 days next to the transition phase of cell culture. All conditions tested were run in parallel at 37°C with 5% CO₂, under atmospheric O₂ conditions (18%) and normoxic physiologic conditions with 8% O₂ using a HeraCell 150i incubator (Thermo Scientific). For assays at 8% O₂, media were preincubated for 12 to 24 hours in the absence of cytokines before the start of the culture to reach gas pressure equilibrium. Between each step, switched B lymphocytes were centrifuged at 200g to remove the supernatant containing the previous cytokine cocktail. During the culture process, media were changed every 2 days, and corresponding cell lineages were replaced every 4 days. Cell viability was measured on a NucleoCounter NC-250[®], after labeling with AO Solution 18 following the manufacturer's instructions (Chemometec, Allerod, Denmark). IgG and IgA content was measured in the culture supernatant by standard ELISA assay as previously described [395].

Flow cytometry analysis

Determination of the phenotype of B lymphocytes was performed every 4 to 8 days by flow cytometry during expansion, transition and differentiation phases. On day 4, cultured B lymphocytes were analyzed to confirm their purity by targeting CD3, CD14, CD19, CD45, CD154, IgA, IgD, IgG and IgM markers. Viability was assessed following a 30-minute staining protocol using Pacific Blue succinimidyl ester (PB). Cells were washed with PBS supplemented with 1% FBS and 0.001% NaN₃, and then stained with the appropriate antibodies listed above. Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD3 and anti-IgG, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IgD and anti-CD154 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD14, anti-IgM and PE-conjugated anti-CD45 were from eBiosciences (San Diego, CA, USA) and FITC-conjugated anti-IgA was from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). To assess their differentiation status, cells were stained with antibodies targeting CD19, CD31, CD38, CD39 and CD138 markers. MSC were monitored using CD105. FITC-conjugated anti-CD31 (clone WM59), APC-conjugated anti-CD39, eFluor450-conjugated anti-CD38 (clone HB7) were all from eBiosciences. PE-conjugated anti-CD138 (clone BA-38) was from Abcam (Toronto, ON, Canada), PE-Cy7-conjugated anti-CD105 (clone 43A3) from BioLegend (San Diego, CA, USA), and PE-Cy7-conjugated CD19 from BD Biosciences. Dead cells were stained with 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences). Data analyses were performed directly after labeling with a Partec CyFlow ML flow cytometer (Swedesboro, NJ, USA) and FlowMax 3.0 software (Partec, Münster, Germany). For each experiment, dead cells were excluded from analysis, and at least 10 000 events were recorded. Analyses were performed with FCS Express 4 software (De novo, Los Angeles, CA, USA), and positivity for each marker was determined by fluorescence minus one (FMO). In addition, B-cell proliferation was measured with CellVue Burgundy, following the manufacturer instructions (eBiosciences) for a period of 4 days. An initial measure performed on day 0 was used as a reference for the assay.

Redox potential assessment

The oxidation-reduction potential in culture medium was measured with a micro Pt/AgCl combination MI-800/410cm redox electrode (Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, USA) connected to a pHi model 510 pH meter (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Measures were performed directly after medium preparation, and analyses in culture supernatants were done at the end of the cultures.

Quantification of cytokine secretion

Cytokines and Immunoglobulins were measured in culture supernatants by a Multi-Analyte Profiling technology using Luminex IS 200 system (Luminex, Austin, TX, USA). Each of the targeted molecules were measured separately on flat-bottom Immulon-II plates using Bio-Plex Pro Human, inflammation Panel 1 APRIL/TNFSF13, SDF1 α + β , IP-10/CXCL10, Th17, IL-21, TGF- β 1 and TGF- β 2 (all from Bio-Rad). Bio-Plex Pro Reagent kit III was used for APRIL, CXCL12 and CXCL10, Bio-Plex Pro Reagent kit II was used for IL-21, and Bio-Plex Pro Reagent kit I for TGF- β . IgA, IgE, IgM and IgG subclasses were measured using Bio-Plex, Pro Human isotyping kit (Bio-Rad). All analyses were done following the manufacturer's instructions.

Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) analysis

In order to visualize cellular heterogeneity from a single cell cytometry assay, data for plasma cells (day 8) were run on the SPADE analysis software (Cytobank, Inc, <http://www.cytobank.org/>) [537]. Analyses were performed on viable cells, classified in 50 nodes, with each one gathering cells according to the similarities in their phenotype. Baseline was set with L4.5 at 21% O₂ conditions, for each cell culture. Data provided represent the mean of global medians used for the standardization of results from each experiment, and the color scale was set to asymmetric.

Statistical analysis

All statistical analyses were done using GraphPad InStat version 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as means \pm S.E.M. The post-hoc tests used are described in the appropriate Results section.

Results

Proliferation of switched memory B lymphocytes in FBS or serum-free media

We have previously established that the presence of IL-2, IL-4 and IL-10 allows long-term expansion of CD40-activated switched memory B lymphocytes in the presence of bovine serum [395]. Besides, we reported that our in-house serum-free medium, namely bovine protein free medium (BPFM), was able to sustain the proliferation of CD40-activated B lymphocytes, including naive and memory cells, using the same cytokine cocktail [396]. The next steps were done to evaluate the outcome of switched memory B lymphocytes when cultured in BPFM. Purified CD19⁺IgD⁻IgM⁻ cells were cultured in parallel for 12 days in BPFM and in a medium containing 10% FBS in the presence of CD154⁺ L4.5 cells and IL-2, IL-4 and IL-10 (Fig 1).

The proliferation rate was calculated for 3- to 4-day periods to monitor the progression of the CD19⁺IgD⁻IgM⁻ cells (Fig 1A). Overall, during this three-step culture, the cells were expanding similarly in both conditions (Bonferroni multiple comparisons test, $p > 0.05$); giving an average of 5.3 ± 0.2 fold expansion in BPFM and 5.8 ± 0.1 fold expansion in the presence of FBS. Total expansion, starting from 1×10^6 seeded cells, had reached 82- to 429-fold for cells cultured in FBS and 71-to 328-fold in BPFM (data not shown). The presence of FBS was slightly advantageous for the switched activated B lymphocytes in regards to total expansion (Paired t-test, $p=0.0118$). Viability assessment did not show any significant differences when comparing both conditions (Fig 1B) (Dunn's multiple comparison test; $p > 0.05$), decreasing on day 12 to $77 \pm 2\%$ and $72 \pm 2\%$ in FBS and BPFM, respectively. The cells were maintained in culture for an additional 9 days to measure their commitment towards differentiation by measuring the secretion of IgG and IgA (Fig 1C). IgA secretion was similar in both conditions, reaching 14.4 ± 4.9 $\mu\text{g/ml}$ and 15.2 ± 5.6 $\mu\text{g/ml}$, in FBS and BPFM, respectively.

IgG secretion appeared higher when cells were cultured in the presence of FBS ($122.5 \pm 28.8 \mu\text{g/mL}$) than in BPFM ($72.3 \pm 17.2 \mu\text{g/ml}$), however this difference was not statistically significant (Dunn's multiple comparisons test, $p > 0.05$). The progression towards differentiation was also monitored on day 12 according to CD31, CD38, CD39 and CD138 expression (Fig 1E). Overall, the cellular phenotype was similar in both conditions, except for the proportion of CD38⁺ cells, which was lower in cells cultured in BPFM ($39\% \pm 8\%$, compared to $75\% \pm 8\%$ in FBS) (unpaired Student's t-test, $p \leq 0.05$). The proportion of CD38⁺CD138⁺ cells was lower than 5% in both conditions. Finally, the measure of redox potential in both media and in cell culture supernatants showed no significant differences (Fig 1D).

Overall, we showed that BPFM allows switched memory B lymphocytes to proliferate and to initiate differentiation. This medium was thus used to further investigate the in vitro generation of plasma cells. Noticeably, the significant decrease in the proportion of CD38⁺ cells had no impact on the smaller CD38⁺CD138⁺ cell population.

Differentiation of switched memory B lymphocytes in BPFM under low oxygen levels

B lymphocytes were pushed into differentiation in BPFM using a simple three-step model involving a shift in the L4.5:B-cell ratio and modifications of cytokines, as previously described [286] (Fig 2A). As previously observed, CD38 and CD39 expression rapidly increased following B-cell activation (Fig 2B, D8). However, CD38 expression decreased during the transition and differentiation steps. This decrease was related to the absence of retinoic acid in the BPFM medium (data not shown), as already reported for CD34⁺ cells [538]. Besides, transition towards differentiation resulted in an increase in the number of cells expressing the CD31 and CD138 markers (Fig 2B). At the end of the differentiation phase, most of the cells were still positive for CD39 (> 85%) and about half of them were

also positive for CD31, CD38 and CD138. Overall, subjecting cells to an 8% O₂ level resulted in phenotypes similar to what is obtained with the standard 21% O₂ condition. The IgG content appeared higher at 21% O₂ (73 ± 8 µg/ml) than at 8% O₂ (25 ± 6 µg/ml). IgA content was similar for both conditions, namely 10 ± 7 µg/ml and 12 ± 7 µg/ml, respectively, for 21% and 8% O₂ (data not shown).

Finally, monitoring of cell division using CellVue staining showed evidence for a significant decrease, by about 2- to 3-fold, in the proportion of dividing B lymphocytes during differentiation at 21% and 8% O₂ (Figs 2C and S1). In this assay, cell viability varied from 80 ± 1.5 % and 75 ± 1.7 % for 21% and 8% O₂, respectively (data not shown).

Overall, the above results confirm that the BPFM medium is allowing efficient differentiation of B lymphocytes when combined with a low CD154 interaction level in the presence of IL-6 and IL-10. However, at this point, this differentiation appeared independent of oxygen concentration.

Optimization of B-cell differentiation

The purpose of the next experiment was to model the environment found in the bone marrow, using an activated eosinophil cell line, namely EOL-1, and human bone marrow mesenchymal stem cells, during the differentiation phase (Fig 3). For these assays, B lymphocytes were maintained in direct contact with L4.5 cells (L), while EOL-1 (E) and/or MSC (M) were added in the upper chambers of transwell plates.

The proportions of CD38⁺CD138⁺ cells, CD38^{hi}CD138^{hi} cells, and CD31⁺ cells within these subpopulations of plasma cells were determined in viable cells at the end of the differentiation phase, on day 20 (Fig 3A). No significant differences were observed between cells cultured at 8% O₂ and 21% O₂ for all combinations tested. In contrast, the proportions of CD38⁺CD138⁺ cells and CD38^{hi}CD138^{hi} cells was greatly influenced by the composition of the co-culture partners (Figs

3B-C). Differentiating cells subjected to 21% O₂ showed that CD154 activation alone or in combination with EOL-1 cells allowed the formation of respectively 13.9 ± 3.5% and 14.8 ± 2.3% of CD38⁺CD138⁺ cells. In this condition, the addition of MSC to CD154 and EOL-1 cells (LEM) significantly increased the proportion of CD38⁺CD138⁺ to 27.1% ± 4.4% (Dunn comparison t-test with p ≤ 0.01). When cells were subjected to 8% O₂, no differences were observed between the addition of EOL-1 to L4.5 cells compared to L4.5 cells alone (9.6 ± 0.6% and 12.4 ± 2.5%), while a significant increase was observed when MSC were added (Dunn comparison t-test with p ≤ 0.05). Furthermore, CD154 activation alone allowed the generation of 3,4 ± 0,8% CD38^{hi}CD138^{hi} cells, which was significantly less than activation with LEM (11.6 ± 4,3%, p≤0.05) (Fig 3C). The presence of EOL-1 cells and MSC also resulted in a significant enhancement of differentiation in regards to the proportion of CD31⁺ cells for cultures done at either 21% or 8% O₂ within the CD38⁺CD138⁺ cell population. Furthermore, the effect was more striking at 21% O₂, since the proportion of CD31⁺ cells increased to 55.2 ± 10.4% with EOL-1 alone, and to 85.1 ± 1.4% when both cells were added to the upper wells (p ≤ 0.05) (Fig 3D). In contrast, the expression level of CD31 within the CD38^{hi}CD138^{hi} cells was systematically higher than 75% in all conditions tested (Fig 3E). Finally, the total populations of CD138⁺ and CD138^{hi} cells were favored when MSC were added to EOL-1 and L4.5 cells, increasing by almost 2-fold at 49.4 ± 4.7% (21% O₂) and 23.7 ± 2.6% (8% O₂), respectively, when compared to L4.5 cells alone (23.2 ± 5.2% (21% O₂) and 13.1 ± 2.9% (8% O₂), Figs 3F and 3G).

Overall, these results suggest that MSC appear to enhance differentiation of switched memory B lymphocytes. MSC appear able to secrete factors which synergize with CD154 stimulation to increase the proportion of plasma cells.

Effect of mesenchymal stem cells on plasma cell differentiation

Since the addition of MSC to switched memory B-cell cultures seems to promote the emergence of plasma cells, we have measured the influence of MSC using direct contact and transwells in the presence or absence of L4.5 cells (Fig 4). The outcome of the cells was monitored as above, using 8% and 21% O₂ levels. Analyses excluding residual MSC, were done on viable cells. The proportions of CD38⁺CD138⁺ cells (Figs. 4A and 4B) and CD31⁺CD39⁺ cells (Figs. 4C and 4D) were evaluated for all conditions. For the four co-culture conditions tested, no differences were observed between the two oxygen levels. The addition of MSC in direct contact, or in indirect contact using a transwell plate, was the most potent stimulus for the emergence of CD38⁺CD138⁺ cells. A direct interaction of switched memory B lymphocytes with MSC allowed the differentiating cells to reach about 50% of the cultured cells, which was significantly higher than with L4.5 cells alone (Fig 4A). Furthermore, when MSC were added in the upper chambers of transwells, the proportions of CD38⁺CD138⁺ were comparable to those obtained when in direct contact, reaching 40.2% ± 8.2% and 45.7% ± 7.9% in 8% and 21% O₂, respectively. However, when L4.5 cells were present in the lower chambers, we noticed a significant decrease, by about 2-fold, in the proportions of CD38⁺CD138⁺ cells (Figs. 4A-C-E), suggesting an inhibitory effect of L4.5 cells.

On the other hand, the proportion of CD31⁺CD39⁺ cells reached at least 80%, and significantly increased in all conditions whenever MSC were present, with or without direct contact with B lymphocytes (Figs. 4C-D). Overall, a 2-fold increase was noticed compared to co-cultures done with L4.5 cells alone, which yielded about 40% CD31⁺CD39⁺ cells at either 8% or 21% oxygen. For this cellular phenotype, no negative effect of L4.5 cells, present in the lower chamber, was observed when MSC were added to the upper compartment of the transwell.

Co-cultures of switched memory B lymphocytes were also done with activated EOL-1 cells alone, and compared to L4.5 cells alone, as well as the above

conditions with MSC. Our results from two independent samples showed that EOL-1 cells were unable to maintain the viability of B lymphocytes. Viability was lower than $40\% \pm 1.2\%$ and decreased rapidly from day 12 to day 20. Nevertheless, we also noticed that the proportion of residual cells being able to differentiate into $CD38^+CD138^+$ was much lower than that observed with L4.5 and MSC (data not shown).

These observations indicate that MSC alone efficiently promotes the differentiation of switched memory B cells into plasma cell, independently of oxygen concentration. Our results also indicate that MSC could secrete soluble factors contributing to this differentiation-promoting effect.

Increase in $FSC^{hi}SSC^{lo}$ cell subset following differentiation in the presence of MSC

The above results established that MSC stimulation enhances plasma cell generation under either 8% or 21% O_2 levels. Furthermore, analyses of the cell profiles according to the FSC and SSC parameters also revealed two distinct populations (Fig. 3A). We thus further characterized these subsets by delineating the $FSC^{lo}SSC^{hi}$ as population A and $FSC^{hi}SSC^{lo}$ as population B, as indicated by the respective gates shown in Figs. 5A and B. All analyses were done at the end of the differentiation phase, and cells were cultured in direct contact with MSC (Figs. 5 B, D, and F) or L4.5 cells (Figs. 5 A, C, and E), and subjected to both oxygen conditions. Overall, about 50% of all cells analyzed were present in population B ($FSC^{hi}SSC^{lo}$) when the cells were cultured with MSC. However, the frequency of $FSC^{hi}SSC^{lo}$ was significantly lower in the presence of L4.5 cells, reaching about 10% and 15% in 8% and 21% O_2 , respectively (Dunn's multiple comparisons test; $p < 0.05$; data not shown).

Additionally, we have observed important variations in regards to the expression of CD31, CD38, CD39 and CD138 within the A and B populations. These variations were independent of the co-culture conditions, namely L4.5 cells or

MSC, and oxygen levels (Fig 5 and Table 1). The cells present in population A and B were all positive for CD39. Overall, population A cells showed low expression of CD31, CD38 and CD138 (Figs. 5C-F), and low frequencies of cells positive for these markers (Table 1). In contrast, cells forming population B were characterized by a high expression of CD31, CD38 and CD138, which are hallmarks of plasma cells. Furthermore, cells found in gate B included the highest proportion of CD138⁺ cells ($\geq 75\%$) and CD38^{hi}CD138^{hi} cells ($85 \pm 1.2\%$, data not shown) when cultured in the presence of MSC (Table 1). To highlight this shift from A to B, we then compared the frequency of CD38^{hi}CD138⁺ populations inside each gated subset compared to their content in the total (A+B) population (Fig 5G). Again, no significant differences were observed between 8% and 21% O₂ culture conditions. The proportions of FSC^{hi}SSC^{lo}CD38^{hi}CD138⁺ cells (B population) reached $38.4\% \pm 1.9\%$ and $30.1\% \pm 3.2\%$ of total CD38^{hi}CD138⁺ cells, following culture in the presence of MSC at 21% and 8% O₂, respectively. Culturing cells in the presence of L4.5 cells led to lower proportions of plasma cells, as only $10.9\% \pm 3.9\%$ and $13.7\% \pm 2.4\%$ of CD38^{hi}CD138⁺ cells were observed at 21% and 8% O₂, respectively ($p \leq 0.001$ in both conditions). Moreover, a comparison of viabilities in regards to A and B populations (Fig 5H) showed that the FSC^{hi}SSC^{lo} cells were characterized by the highest viability when cultured with MSC or L4.5 cells. However, low viability was observed for cells in population A when cultured with MSC, with $35.6\% \pm 9.6\%$ and $23.7\% \pm 53\%$ viable cells for 21% and 8% O₂, respectively. In contrast, cells in populations A were still viable at 70% when cultured with L4.5 cells. Finally, we also observed that the CD138⁺ cells generated at the end of the differentiation phase were characterized by low expression of CD19, and were also predominantly positive for CD49d (VLA-4), which is very important for interactions with the bone marrow cellular matrix (data not shown) [539].

Once again, these results emphasize the ability of bone marrow MSC to favor plasma cell generation in BPFM medium, but they do not show any impact related to O₂ levels. Noticeably, the distinct population characterized by

FSC^{hi}SSC^{lo} includes a majority of plasma cells with a high viability and which are better supported by the presence of MSC.

Heterogeneity among plasma cells generated in vitro

The above results highlight that the differentiation phase with MSC and L4.5 cells generates two distinct populations of plasma cells. Thus, the heterogeneity of the A and B populations was further investigated using SPADE analysis. This tool enables us to directly visualize the relative expression of CD31, CD38, CD39 and CD138 (Figs 6 and S2). SPADE 2-dimensional representation underlines the distinction of the A and B populations inside gated viable cells. No variations were observed for CD39 expression. The nodes representing population B, namely FCS^{hi}SSC^{lo}, are showing higher expression of CD31, CD38 and CD138 when compared to the nodes of population A (Fig 6). We observed, similarly to what was shown above, that MSC were more efficient in maintaining this plasma cell population than L4.5 cells, yet no distinctions were seen according to oxygen levels.

Profiling of cytokine secretion by MSC

The observations (Fig 3 and 4) that switched B lymphocytes were directed to differentiate towards plasma cells when cultured in the presence of MSC, even without direct contact, suggested the involvement of soluble factors in the differentiation-promoting effect. Thus, further evaluation of culture supernatants using multiplex Luminex assays were performed to measure their contents in IL-21, CXCL10, CXCL12, TGF- β 1, TGF- β 2 and APRIL at the end of the differentiation phase after co-culture with L4.5 cells or with MSC, in either direct contact or in transwell (Figs. 7A and B). Our results revealed that IL-21, CXCL10, TGF- β 2, and APRIL were in negligible amounts for all tested conditions (data not shown). In fact, we were able to detect only CXCL12 and TGF- β 1 in culture

supernatants, and the same secretion patterns were observed for both O₂ levels. The quantities of CXCL12 were significantly higher when MSC were in direct contact with the differentiating cells. Curiously, supernatants of MSC added in transwell without contact did not contain comparable amounts of CXCL12 than direct co-cultures. We determined that MSC, when cultured alone (Ctrl), can secrete 276 ± 129 ng/ml and 335 ± 112 ng/ml of CXCL12 at 21% and 8% O₂, respectively. Noticeably, when B lymphocytes were cultured in 21% O₂ in contact with MSC, the secretion of CXCL12 reached 315 ± 119 ng/ml; this concentration was reduced by about 50% (148 ± 32 ng/ml) was detected when of the culture was done in 8% O₂.

We observed very high variations among samples for the amount of TGF-β1 (Fig 7B). However, TGF-β1 secretion appeared significantly different only when secretion of MSC alone was compared to that of B lymphocytes cultured in the presence of either L4.5 cells or MSC in transwell assays done at 8% or 21% O₂. All co-culture conditions showed similar quantities of TGF- β1 secretion. These results indicate that MSC can efficiently secrete CXCL12 and TGF- β1. Furthermore, conditions leading to reduced levels of CXCL12 and TGF- β1, for example in transwell assays or in 8% O₂, may suggest a variation in the B lymphocytes' capacity to use soluble factors.

Functional differentiation of switched memory B lymphocytes

The functional characteristics of the differentiated cells were further characterized by evaluating their secretion of immunoglobulins (Figs. 7 C to G). As expected, IgG₁ was the highest and the main isotype detected in our supernatants for all conditions tested. IgG4 and IgA were detected in all conditions, with no differences between co-culture conditions or oxygen levels. No IgM was detected in these supernatants (data not shown). The most significant difference, an almost 10-fold increase, was observed for IgG₁ secretion by cells cultured in direct contact with MSC compared to those cultured with L4.5 cells, regardless of

the oxygen level (Fig 7C). However, at 21% oxygen, IgG₁ secretion was significantly higher when cells were in contact with MSC ($66.5 \pm 12.9 \mu\text{g/ml}$) than in transwells ($31.1 \pm 7.2 \mu\text{g/mL}$). IgG₂ and IgG₃ secretion levels were higher when cells were in contact with MSC compared to L4.5 cells in 21% O₂ (Figs. 7D and E).

Furthermore, we have estimated the secretion rate according to total IgG content using the seeding density on day 16. At that point, cells were washed and put back in fresh culture medium for four supplemental days. The estimated secretion rate is 18 pg of IgG per cell per day (data not shown).

Collectively, these data confirm that MSC are very efficient at supporting the generation of functional Ig-secreting cells displaying several characteristics of fully differentiated plasma cells.

Discussion

In this study, we show that MSC allow the differentiation of human switched memory B cells into CD38^{hi}CD138⁺ plasma cells in a serum-free medium. To our knowledge, this is the first model allowing the generation of CD31⁺CD38^{hi}CD138⁺ cells in the presence of MSC from human bone marrow, and the first report of such differentiation in the absence of bovine serum. In addition, the newly generated plasma cells are mainly non-dividing cells and gain Ig-secreting function. The detection of CXCL12 and TGF- β 1 secreted by MSC validates the usefulness of the in vitro model aiming to reproduce an environment similar to plasma cell niches found in the bone marrow. Our results also highlight the differential effects of CD40 or MSC stimulation on the differentiation of human switched memory B lymphocytes. While MSC favored the commitment towards CD31⁺CD38^{hi}CD138⁺ plasma cells, L4.5 cells seem to be slowing down this process and to preferentially activate cells with an intermediate CD31[±]CD38^{lo}CD138^{lo} phenotype. Finally, we observed that the generation of newly formed plasma cells appears independent of oxygen levels in our model.

The in vitro generation of human long-lived plasma cells has been reported in two independent studies [269, 289]. Cocco and collaborators were the first to report the long-term maintenance of plasma cells using a three-step culture allowing to maintain cells for up to 62 days [269, 289]. As a first step, they used polyclonal activation of peripheral blood CD27⁺ B cells to generate plasmablasts. The last step was designed to reproduce stromal environment using the gamma-irradiated fibroblastic mouse cell line M2-10B4 supplemented with IL-6 and IL-2. Their model generated CD38^{hi}CD138^{hi} cells which were characterized by expression of genes associated with long-lived plasma cells and were secreting IgG at about 150 pg/cell/day. The authors however reported that a rapid decrease in total viable cell numbers was observed during this last step, suggesting that persistent viable cells were not abundant in their model.

A second group also used purified peripheral blood CD27⁺ cells, but in a four-step culture system [269]. Similarly to Cocco et al., CD27⁺ cells were first activated through soluble CD40 interaction in the presence of a polyclonal activator (CpG) and a mixture of IL-2, IL-10 and IL-15. Jourdan's group was able to generate long-lived plasma cells using stromal cells purified from human tonsils, in the presence of IL-6 and APRIL. Long-lived plasma cells were generated by purifying CD138⁺ cells obtained at the end of the third step and incubating these cells with stromal cells, with or without contact, for the last culture step. At the end of their 4-step process, Jourdan and collaborators obtained newly-formed CD38⁺CD138⁺ cells typical of long lived plasma cells according to their gene expression pattern. These cells were maintained in culture for months. These authors also observed a rapid decrease in cell numbers during the final step of their culture system.

One unique study reports the differentiation of switched memory B lymphocytes using contact with bone marrow MSC [540]. In their study, Traggiai and collaborators have cultured purified cells with MSC, in combination to stimulation by soluble CD40L and CpG. Interestingly, they found that MSC favored IgG secretion when B lymphocytes were in direct contact compared to a barrier system modeled by transwell assays.

Noticeably, all of the above studies were performed with media containing bovine serum, and used soluble CD40 and polyclonal activation in a separate first step, or simultaneously with other cellular effectors [269, 289, 540]. In our model, the source of B lymphocytes is also peripheral blood, but the selection method we use includes CD27⁻ IgG⁻ and IgA⁻ positive cells [127] and excludes CD27⁺IgD⁺gM⁺ cells [541], which are respectively absent and present in Jourdan and Cocco culture systems. Our culture model was initiated by an 8-day expansion step generating CD40-activated memory B lymphocytes [286, 542]. The expansion rate we obtained was at least 20-fold, i.e., starting with 1×10^6 switched memory B lymphocytes on day 0, we could generate up to 20×10^6 cells. Despite the fact that cells stopped to proliferate and viability decreased

during the differentiation phase, we were able to recover at least 5×10^6 CD138⁺ cells on day 20. The last step of our culture system was based upon direct contact with viable human bone marrow MSC in the presence of IL-6 and IL-10. We did not maintain the cells for longer periods, as we deliberately stopped cultures on day 20, but the observed phenotype was similar to that reported by Cocco and Jourdan studies. MSC could favor plasma cell formation and survival by secretion of CXCL12 and TGF- β 1 [543] and direct contact as reported in studies of the bone marrow microenvironment of plasma cells [312]. MSC secretion was probably supported by the presence of IL-6 in our culture medium [544] and could have been increased under low oxygen conditions [545-547]. TGF- β 1 can favor the quiescent state of hematopoietic stem cells in the bone marrow [548] and thus might also help to maintain the survival of plasma cells. In addition, the newly-generated plasma cells were almost all positive for CD31, an adhesion molecule, supporting their commitment to respond to direct cellular interactions.

APRIL is considered as essential for plasma cell generation [269, 518]. However, we did not add APRIL in our culture medium and did not detect APRIL in our co-culture supernatants. Furthermore, we did not detect significant amounts of APRIL receptors on the differentiated cells (data not shown). Such discrepancy with other studies could be linked to the fine composition of the switched memory B lymphocytes used in our study, which included both CD27⁺ and CD27⁻ cells and excluded IgD⁺ and IgM⁺ cells.

In our model, the newly-generated plasma cells were secreting at an approximate rate of 18 pg of IgG per cell per day, which is quite similar to the rate reported by Jourdan et al. for long-lived plasma cells [269]. From a molecular perspective, we can estimate that one cell is able to release an average of 800 IgG molecules per second. The secretion rate of short-lived plasma cells can reach up to 10 000 IgG/sec/cell [226]. Therefore, our observation of a low secretion rate is consistent with a long-lived character for our in vitro-generated plasma cells. Furthermore, the absence of benefit for

cultivating in 8% O₂ could be explained by a very low exposure to oxidative stress, which is usually associated with a very high secretion of Ig [227]. Moreover, the direct contact with MSC favored a low IgG secretion and correlates with previous observations done with MSC from bone marrow and B lymphocytes [540, 549].

Further analyses revealed the emergence of two distinct populations, FCS^{lo}SSC^{hi} and FCS^{hi}SSC^{lo}, from switched memory B lymphocytes. Both populations were present regardless of L4.5 cells or MSC stimulation. These observations could be related to with the hypothesis of a predefined fate upon differentiation [550] related to asymmetrical divisions in germinal center (GC) reactions, leading to different fates for daughter cells [551]. Such variability in FSC and SSC patterns has already been reported for plasma cell populations in regards to their cytoplasmic composition [552]. Furthermore, we observed that the FCS^{lo}SSC^{hi} cells were mainly CD31⁻CD38^{lo}CD138^{lo}, a phenotype that resembles early plasma cells [553].

In conclusion, our study presents a culture model enabling the generation of plasma cells from switched memory B lymphocytes. This model allows the production of large quantities of plasma cells by combining a short expansion step (< 14 days) and a differentiation phase in a bone marrow-like environment. All cultures were done in the absence of bovine serum which, in the perspective of cellular therapy development, is very important for preventing adverse immunogenicity [554-556]. We believe that this model opens new avenues for autologous cell therapy for immunocompromised patients following cancer treatment or stem cell transplantation. Such plasma cells generated in vitro from activated switched memory B lymphocytes could attenuate the risk of infections in patients [557]. Clinical studies have showed that 85% of bone marrow transplant patients will have at least one infection during the year that follows the graft, with a higher risk during the first 100 days [414]. Furthermore, in our model, the newly formed plasma cells are exposed to human physiological oxygen levels [558-560], so they could adapt more rapidly and migrate more easily to bone

marrow niches. However, additional investigations are needed to confirm the long-lived character of our in vitro-generated plasma cells. First, we plan to produce enough cells to detect Blimp1, IRF4 and XBP-1 proteins, as has been reported elsewhere [269, 289, 553]. We are also currently investigating whether plasma cells generated in this model will be able to migrate to the bone marrow and reconstitute the secretion of human immunoglobulins in a NOD-SCID IL2R γ (null) mouse model that is primarily designed for in vitro-generated stem cell transplantation [561].

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

We thank Carl Simard, M.Sc. for his help with the Luminex and cytometry assays. We thank Annie Roy, M.Sc., for providing us with MSC purified from human bone marrow, and Marie-Ève Allard, RN, for the coordination of blood sample collection. We are also thankful to all the volunteers who participated in this project. We are grateful to Marc Cloutier, Ph.D., for excellent critical review and manuscript editing.

Figures legends

Figure 1 : In vitro expansion of switched B lymphocytes in medium containing FBS or in serum-free medium.

Five samples of switched memory B lymphocytes were cultured in the presence of IL-2, IL-4 and IL-10 and CD154⁺ cells (L4.5 cells) at a ratio of five B lymphocytes per L4.5. Cells were cultured in parallel in medium containing FBS or in serum-free medium. (A) and (B) show respectively the proliferation rate and viability of B lymphocytes after 12 days of culture. (C) The cells were kept in culture for 9 supplemental days to determine the secretion level of IgG and IgA. (D) Redox potential of cell culture supernatants (day 8) and media was measured on 5 independent samples. (E) The proportions of cells expressing CD38 and CD138 markers were determined on gated CD19⁺ B lymphocytes on day 12, (* indicates $p \leq 0.05$, unpaired Student's t-test). All data are from 5 independent experiments, except for the monitoring of CD31 and CD39 in panel E, which was done on 4 independent samples. Data are presented as means \pm SEM.

Figure 2 : Differentiation profile of switched memory B cells under atmospheric and physiologic O₂ in BPFM medium.

Switched memory B cells were subjected to a 3-step culture process (A). All cultures were done in BPFM. As illustrated in A, the first 8 days of expansion were done as described in Figure 1. Afterwards, a transition period of four days was applied to decrease the CD154 interaction to a 1:20 ratio and to expose B lymphocytes to IL-6. Finally, cells were maintained in the latter condition for an additional 8 days, except that IL-2 and IL-4 were removed from culture medium. During the differentiation phase, cells were subjected in parallel to 21% and 8% O₂. (B) CD31, CD38, CD39 and CD138 expression was monitored at the end of each phase by gating on viable cells as shown in Fig 3A. These results are representative of 5 independent experiments. (C) The effect of oxygen levels on cell cycle progression was studied in five additional independent samples

cultured as above, using the CellVue method. During the last four days of expansion and differentiation phases, cells were subjected to 21% or 8% O₂ in parallel; (C) show the proportion of dividing cells. Statistical analyses were done using the Dunn multiple comparison t-test and the *p* values are * ≤ 0.05 and ** ≤ 0.01, as indicated. Data are presented as means ± SEM.

Figure 3 : Effects of eosinophil and mesenchymal stem cells on the differentiation of switched memory B lymphocytes.

Switched memory B lymphocytes were cultured as described in Fig 2A for the expansion and transition phases. Then, cells were exposed to L4.5 cells (L) alone or in combination with EOL-1 cells (E) or EOL-1 cells plus bone marrow MSC (M) during the differentiation phase. During that phase, all cultures were done in 21% and 8% O₂ condition. (A) Plasma cell content was determined on day 20 by excluding debris and dead cells. Analysis relative to CD38⁺CD138⁺ cells are gated within the upper right (UR) quadrant, and results are shown in (B) and (D). Results for CD38^{hi}CD138^{hi} population, gated within R1 (red square), were analysed in (C) and (E). (G) Analysis for CD138^{hi} cells gated within R2 (green square). (B) Frequencies of CD38⁺CD138⁺, (C) CD38^{hi}CD138^{hi}, (D-E) CD31⁺, (F) CD138⁺ and (G) CD138^{hi} populations are shown for 7 independent experiments for cells cultured in the presence of L4.5 cells alone and for 5 independent experiments for LE and LEM assays. Statistical analyses were done using a Dunn multiple comparison t-test with *p*-values as indicated: **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.005. Data are presented as means ± SEM.

Figure 4 : Mesenchymal stem cells influence plasma cell formation with or without cellular contact.

Five independent samples of switched memory B lymphocytes were cultured as described in Fig 2A for the expansion and transition phases. For the differentiation phase, cells were grown in the presence of L4.5 cells, with or without MSC, which were added either in direct contact or in the upper chambers

of a transwell. All assays were done in parallel for all conditions and at 21% and 8% O₂. Same gating strategy was used as describes in Figure 3. (A) and (B) Frequencies of CD38⁺CD138⁺ populations as observed following culture at 21% and 8% O₂, respectively. (C) and (D) Frequencies of CD31⁺CD39⁺ populations as observed following culture at 21% and 8% O₂, respectively. (E) A representative profile of CD38 and CD138 expression at the end of the differentiation step for each condition tested at 21% O₂ is shown. Statistical analyses were done using a Dunn multiple comparison t-test, and *p* values are shown as indicated; **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001. Data are presented as means ± SEM.

Figure 5 : Two subsets of differentiated B lymphocytes can be distinguished according to their size and granularity.

Switched memory B lymphocytes were cultured as described in Fig 2A during the expansion and transition phases. For the differentiation phase, cells were grown in the presence of L4.5 cells or MSC. All assays were done in parallel at 21% and 8% O₂ and analyses done on day 20. (A) and (B) Profiles of populations A and B as revealed by size (FSC) and granularity (SSC) parameters. (C) and (D) Expression of CD38 and CD138 as well as (E) and (F) expression of CD31 and CD39 were determined and corroborated with populations A and B. Profiles shown in C to F are representative of five independent samples (G) Relative frequencies (RF) of CD38^{high}CD138⁺ were determined for B populations using this formula: $RF = B \div (A + B)$ (H) Viability in the A and B populations is shown for all conditions tested. Results in G and H are presented as the mean ± SEM of five independents experiments. Statistical analyses were done using Dunn multiple comparison t-test with ****p* ≤ 0.001.

Figure 6 : Two-dimensional analysis of differentiated A and B populations.

CD38 and CD138 distributions in cells cultured with MSC and L4.5 cells were analyzed on day 20 at the end of the differentiation phase. The strategy used to create SPADE trees was based on size and granularity as clustering channels with 50 nodes. Baseline was set with L4.5 in 21% O₂ conditions for each cell

culture. Results shown are representative of 5 independent experiments. Mean fluorescence intensity ranging from low (green) to high (red) was used to localize CD31, CD38 and CD138 expression as indicated. Color scale was set to asymmetric to highlight differences between the dots.

Figure 7 : Cytokines and immunoglobulins secretions.

All analyses were done at the end of the differentiation phase (day 20). (A and B) CXCL12 and TGF- β 1 contents were determined in cell culture supernatants of differentiated cells. Control (Ctrl) corresponds to the supernatant of MSC cultured in α -MEM for 4 days in the absence of B lymphocytes. All other conditions correspond to B lymphocytes in co-culture with MSC or L4.5 cells or cultured in the presence in MSC seeded in the upper chamber of transwell (Trans). Cultures were done in parallel and at 21% or 8% O₂. (C-G) IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 secretion was determined in cell culture supernatants on day 20. Statistical analyses were performed using a Dunn multiple comparison t-test with (*p \leq 0.05; **p \leq 0.01 and ***p \leq 0.001). No significant differences were observed between MSC in direct contact and transwell assays at 8% O₂ (p = 0.0556; Kruskal-Wallis U-test). Except for with the results of MSC in direct contact, which were obtained from four independent experiments, all data are from five independent experiments. and all are presented as means \pm SEM.

Supplemental Figure 1 : Dividing profiles measured by CellVue analysis.

Visualization of switched memory B-cell division profiles using a lipophilic dye. Dividing profiles measured for expansion and differentiation phases by CellVue labeling. Assays were performed after four days of culture in parallel at 21% and 8% O₂. For each histogram, the black curve represents the starting generation. The brown curve and light blue curve represent respectively the last division recorded for expansion and differentiation phases. The red curve represents the overall contour of the fitted data and the black curve represents the raw histogram contour. These results are representative of five independent experiments.

Supplemental Figure 2 : Summary of SPADE analyses for 5 independent experiments following the differentiation phase.

Distribution of CD31, CD38, CD39 and CD138 markers among plasma cell populations exposed to L4.5 or MSC stimulation, and in the presence of 21% or 8% O₂, analyzed at the end of the differentiation phase. (A) Gating strategy among SPADE trees to dissociate A and B population in regards to FCS and SSC, among viable cells. (B-E) Representative SPADE trees, respectively, for CD31, CD38, CD39, and CD138 expression within the A and B populations from 5 independent experiments. As shown in Fig 7, mean fluorescence intensity ranging from low (green) to high (red) was used to localize CD31, CD38 and Cd138 expression as indicated. Color scale was set to asymmetric to highlight differences between the dots.

Table

Table 3.1 : Expression of CD31, CD38, CD39 and CD138 among plasma cells population on day 20

| Conditions | | Populations ¹ | Cells ² (%) | | | |
|--------------------|------|--------------------------|------------------------|------------|------------|------------|
| | | | CD31 | CD38 | CD39 | CD138 |
| 21% O ₂ | L4.5 | A | 19,2 ± 4,8 | 23,0 ± 6,8 | 93,3 ± 1,0 | 44,9 ± 4,8 |
| | | B | 57,8 ± 4,4 | 49,4 ± 8,9 | 93,1 ± 4,4 | 57,3 ± 8,0 |
| | MSC | A | 26,2 ± 4,4 | 40,8 ± 5,7 | 77,9 ± 7,6 | 11,8 ± 6,2 |
| | | B | 87,4 ± 2,3 | 86,3 ± 5,6 | 97,0 ± 2,4 | 74,9 ± 6,0 |
| 8% O ₂ | L4.5 | A | 14,5 ± 4,6 | 15,5 ± 4,8 | 91,6 ± 1,4 | 24 ± 6,4 |
| | | B | 62,6 ± 2,3 | 42,7 ± 6,0 | 97,6 ± 0,9 | 52,5 ± 7,6 |
| | MSC | A | 23,9 ± 3,3 | 36,7 ± 2,4 | 76,2 ± 5,1 | 7,3 ± 1,7 |
| | | B | 87,1 ± 1,7 | 89,9 ± 1,2 | 98,2 ± 1,3 | 78,3 ± 4,1 |

¹Analyses were done according to the populations A and B as describes respectively as FSC^{lo}SSC^{hi} and FSC^{hi}SSC^{lo} presented in figures 5 and 6.

²The proportion of cells positive for each marker was determined for 5 independent experiments by cytometry analysis as showed in figure 6. Data are mean ± S.E.M.

Figures

Figure 3.1 : In vitro expansion of switched B lymphocytes in medium containing FBS or in serum free medium.

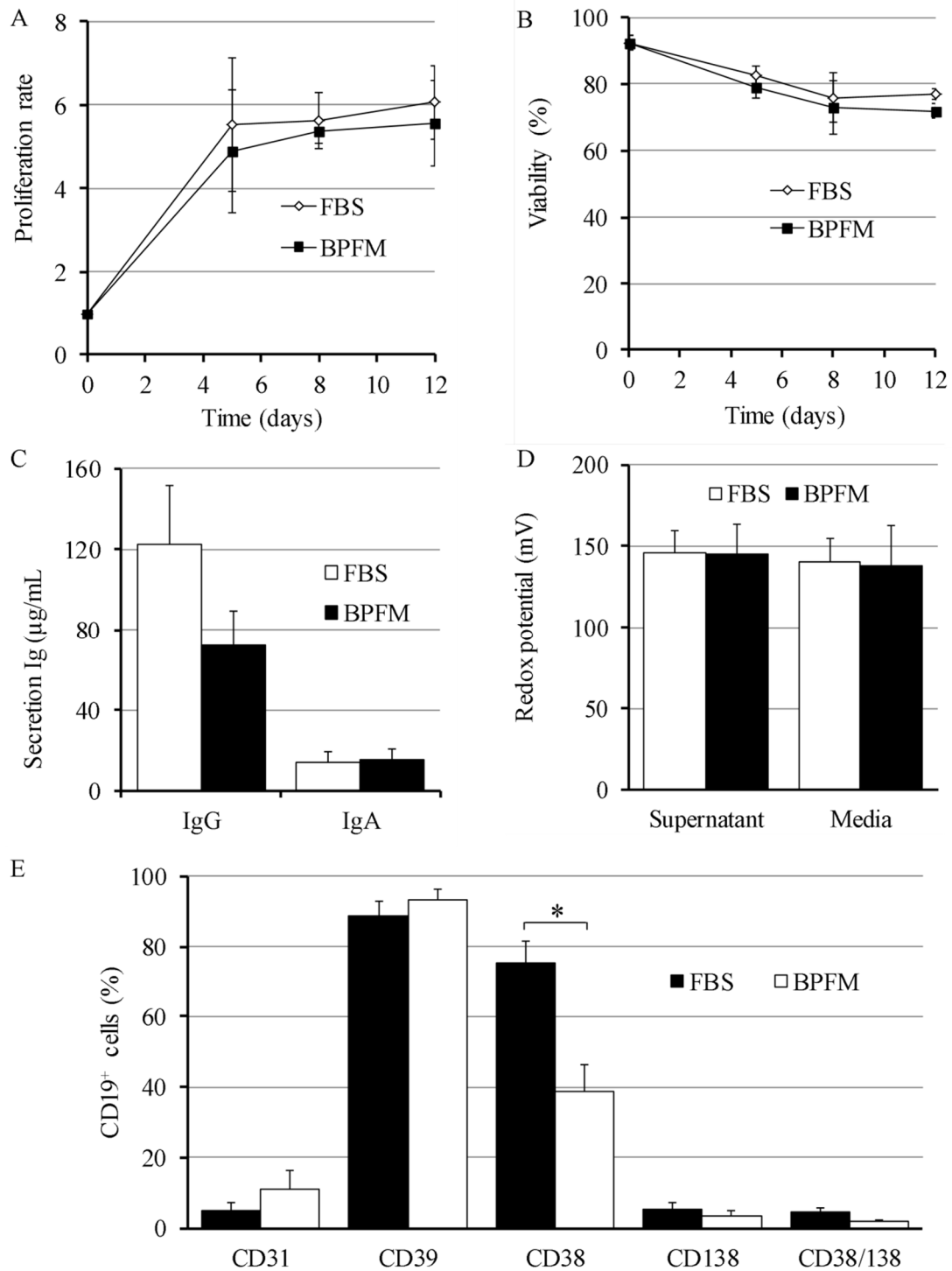


Figure 3.2 : Differentiation profile of switched memory B cells under atmospheric and physiologic O₂ in BPFM medium.

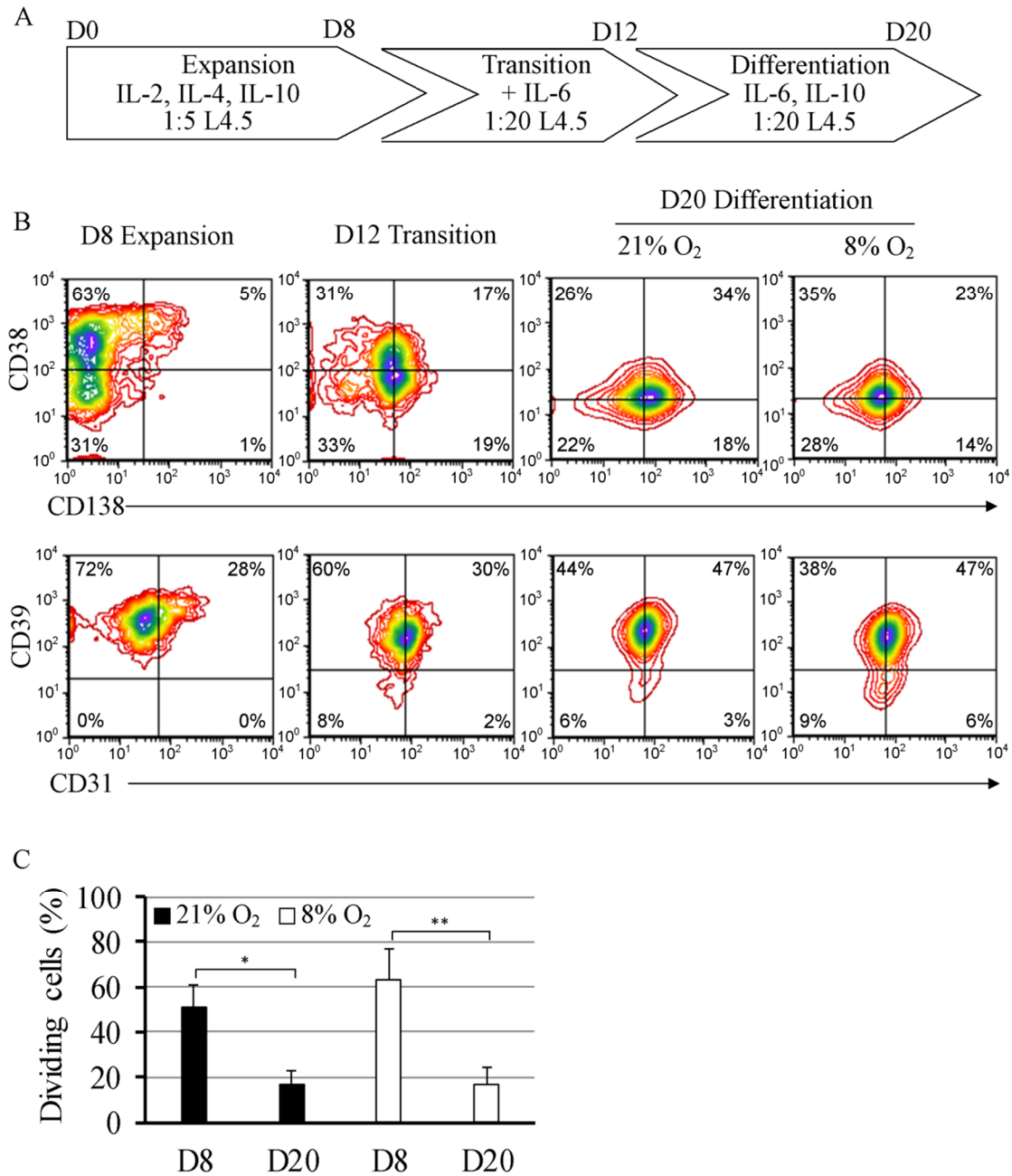


Figure 3.3 : Effects of eosinophil and mesenchymal stem cells on the differentiation of switched memory B lymphocytes.

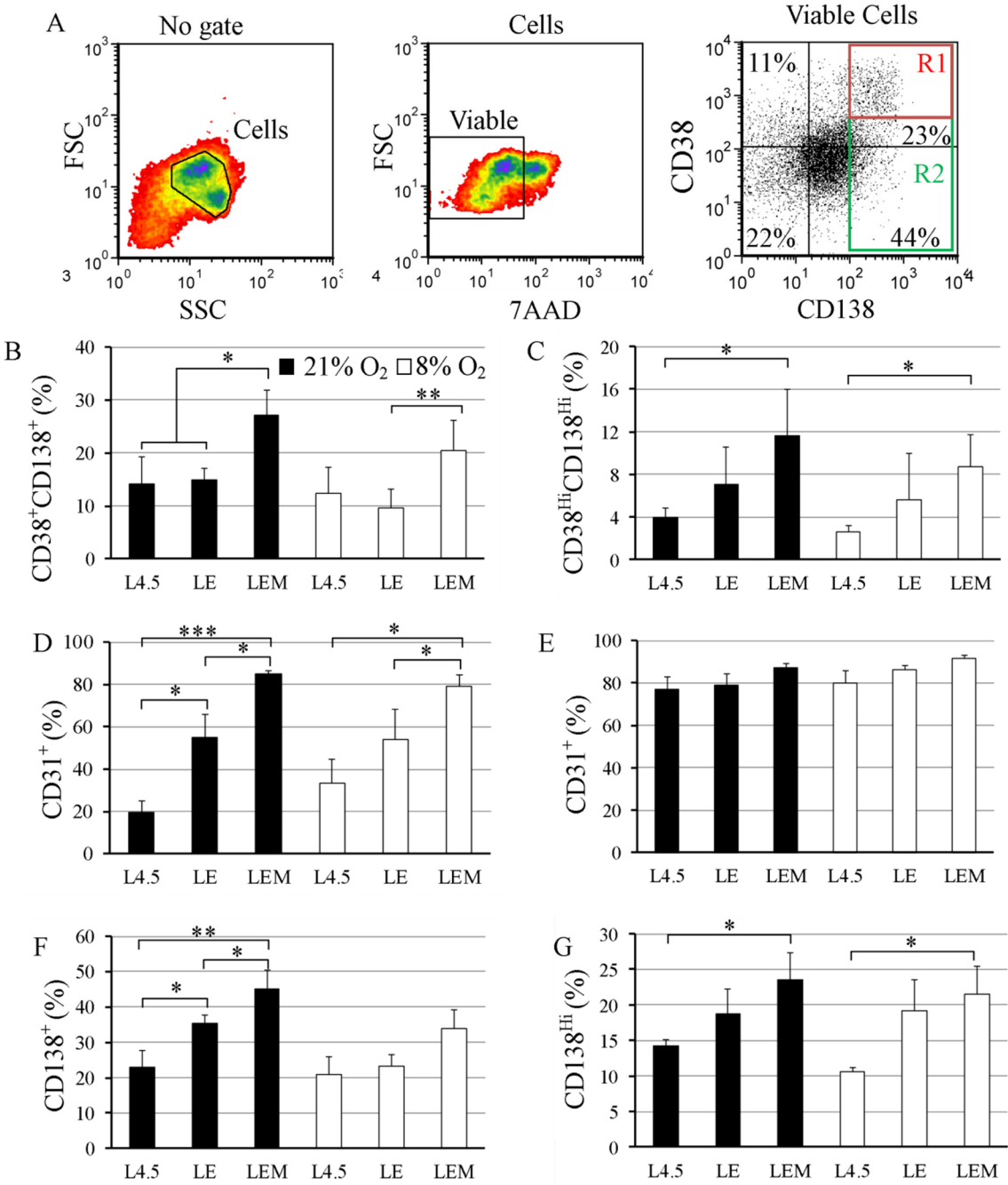


Figure 3.4 : Mesenchymal stem cells influence plasma cells formation with or without cellular contact.

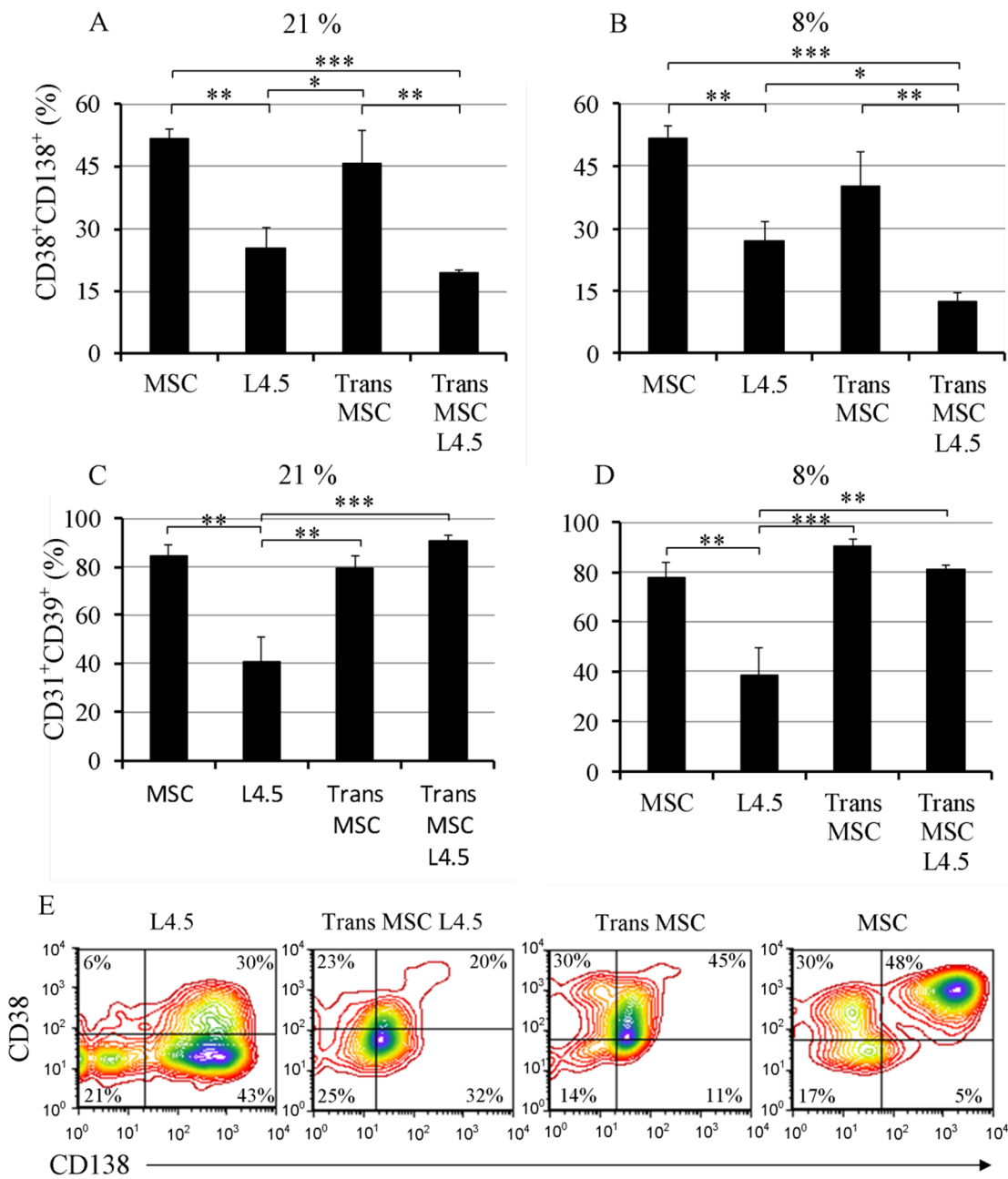


Figure 3.5 : Two subsets of differentiated B lymphocytes can be distinguished according to their size and granularity.

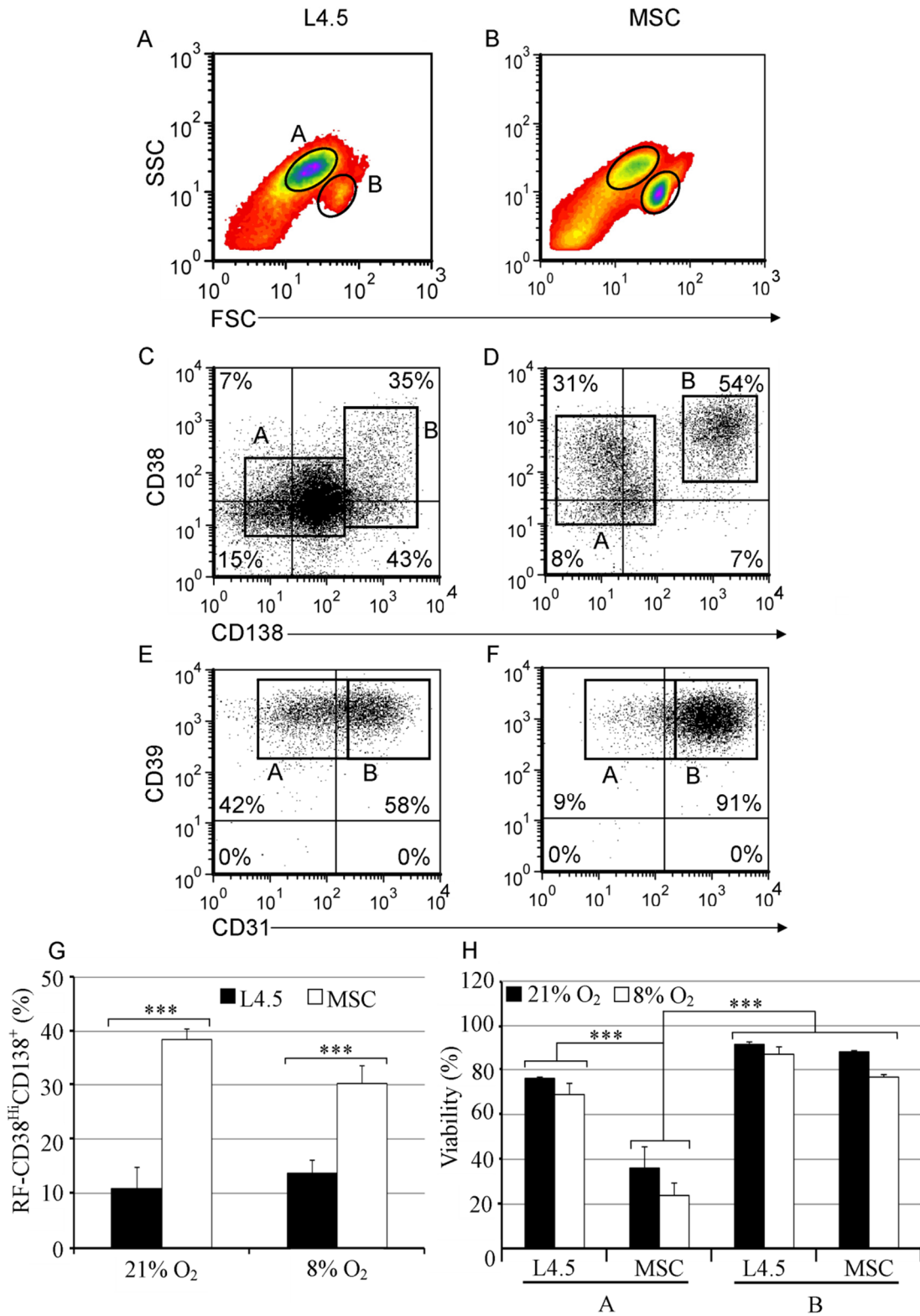


Figure 3.6 : Two-dimensional analysis of differentiated A and B populations

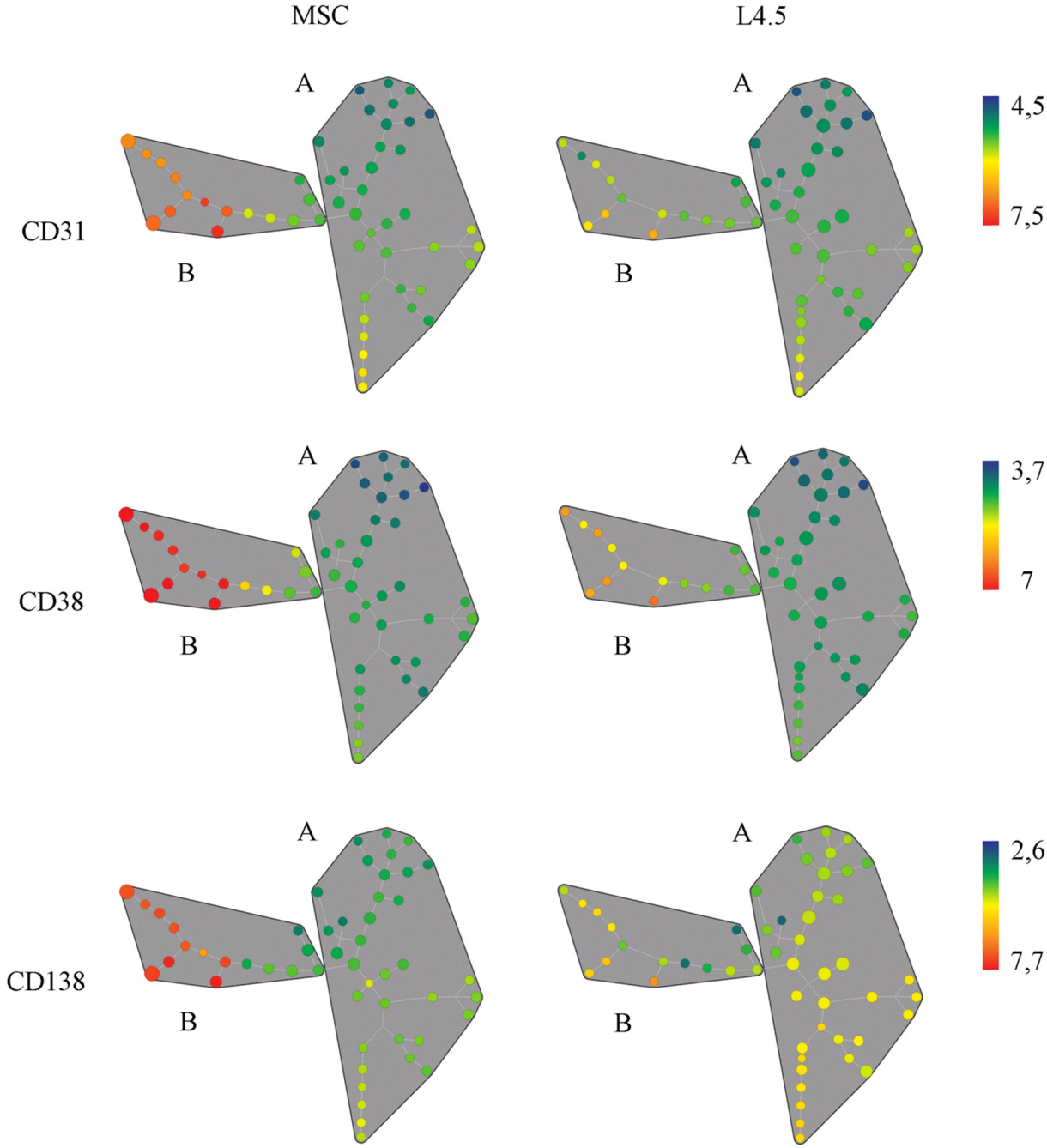
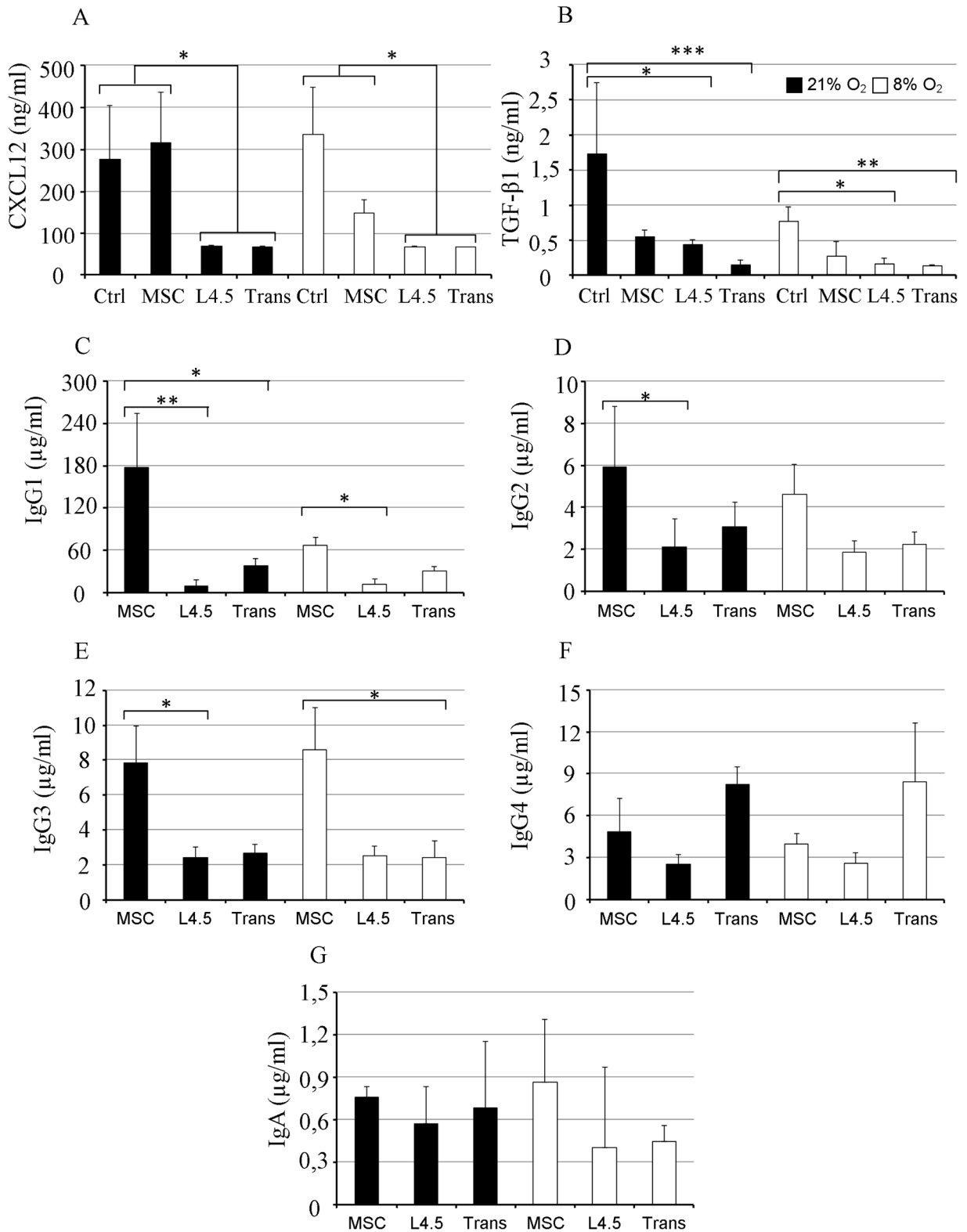


Figure 3.7 : Cytokines and immunoglobulins secretions



Supplemental Figures

Figure 3.S1 : Dividing profile measured by CellVue analysis

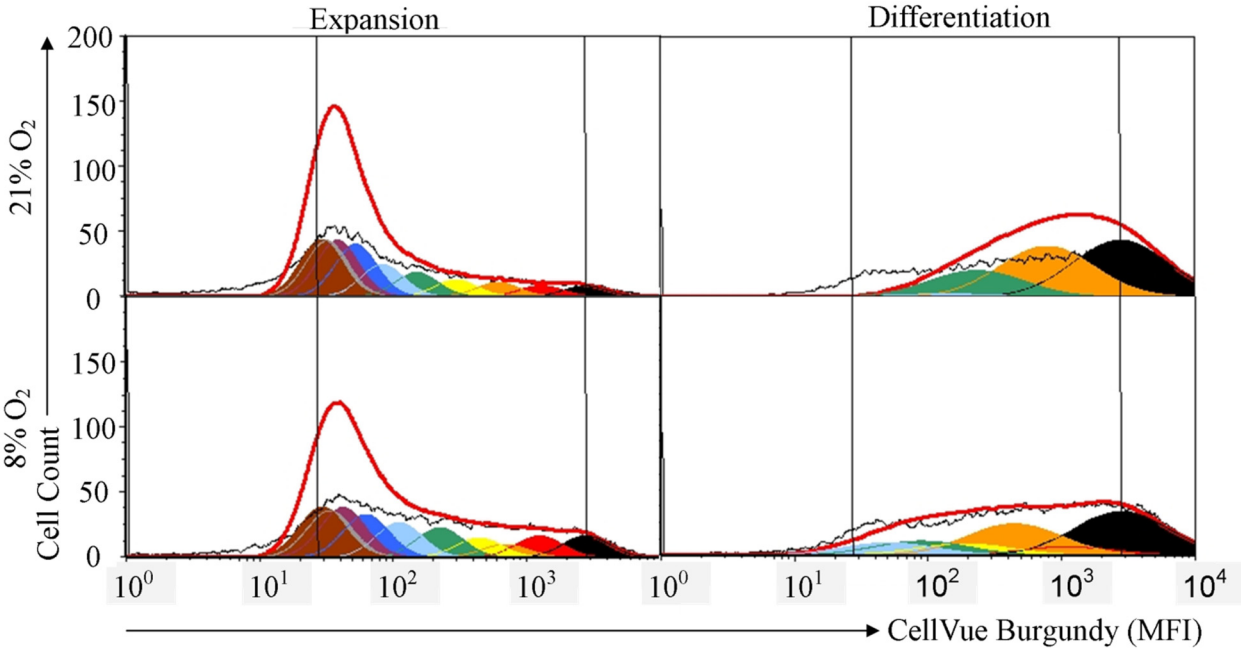
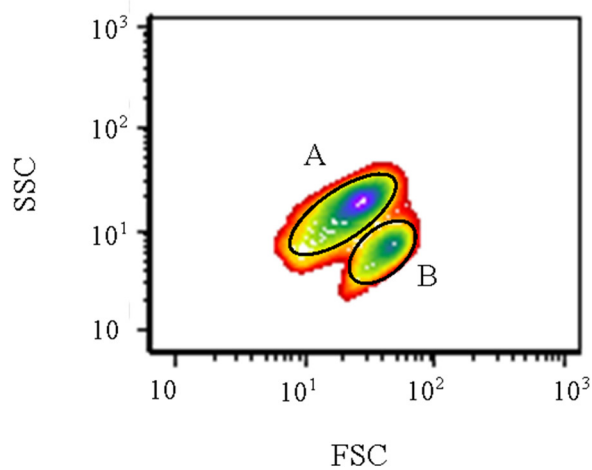


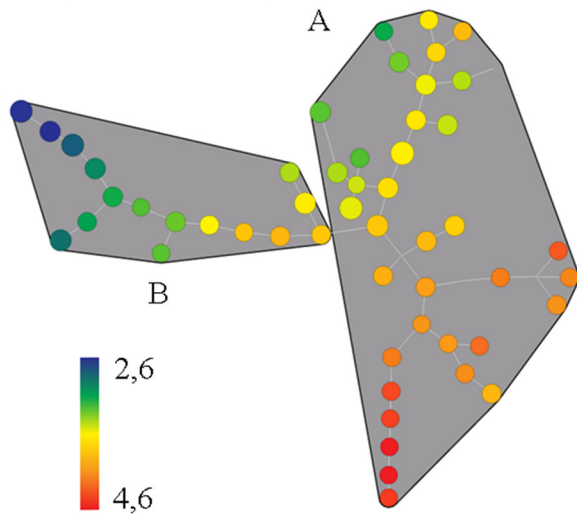
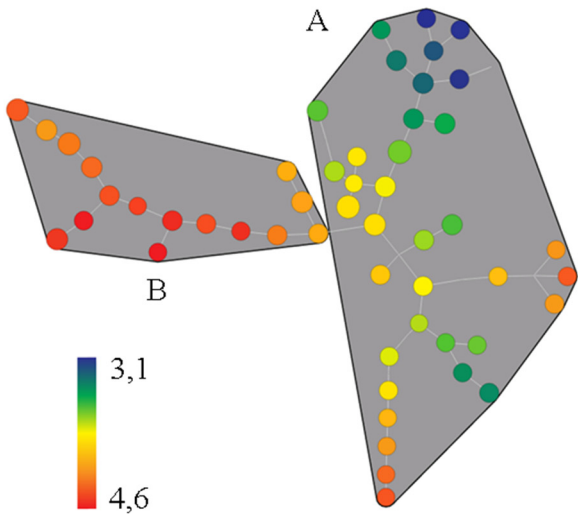
Figure 3.S2 : Summary of SPADE analyses for 5 independent experiments following the differentiation phase

A



FSC

SSC



B

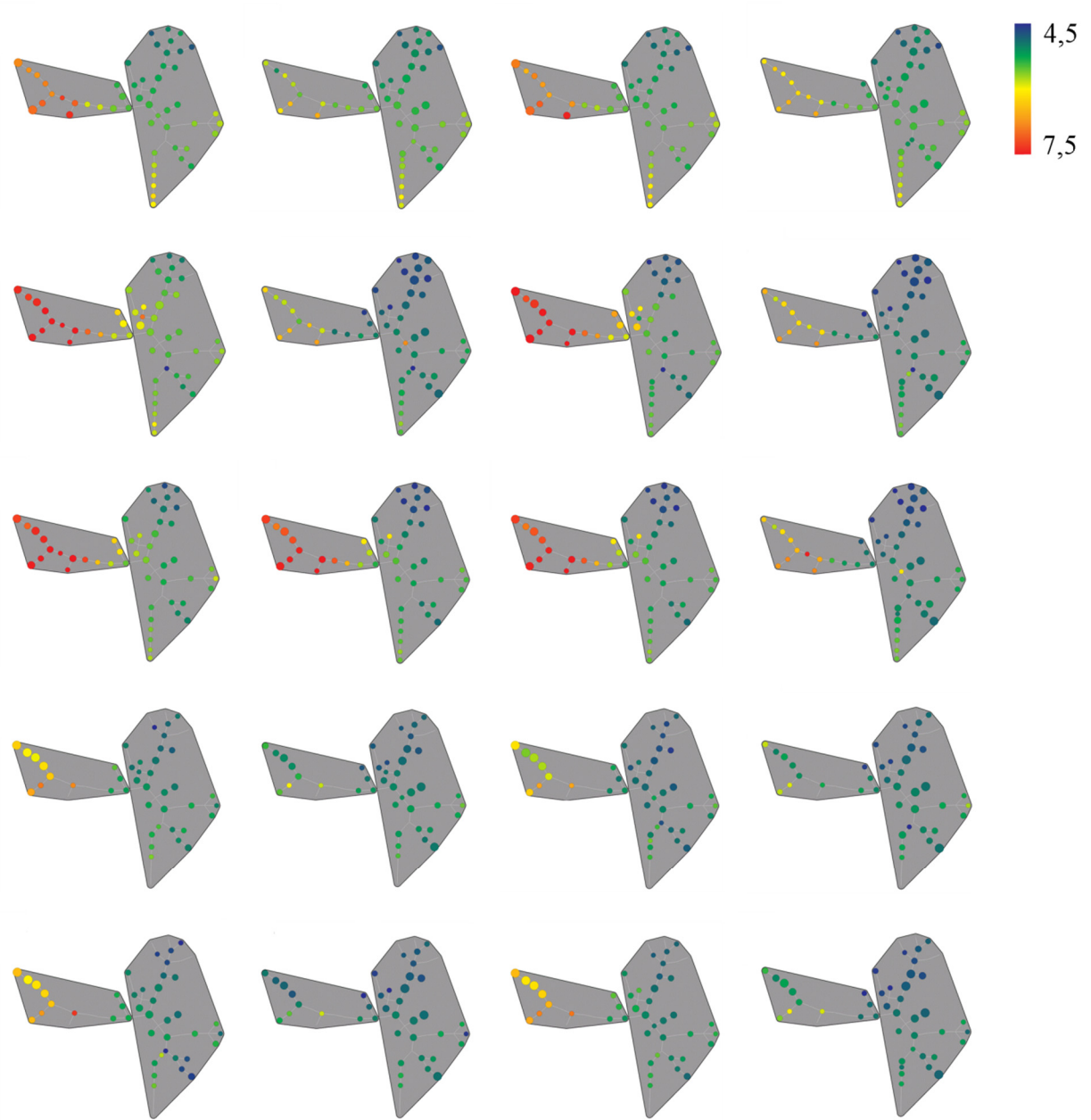
CD31

21% MSC

21% L4.5

8% MSC

8% L4.5



C

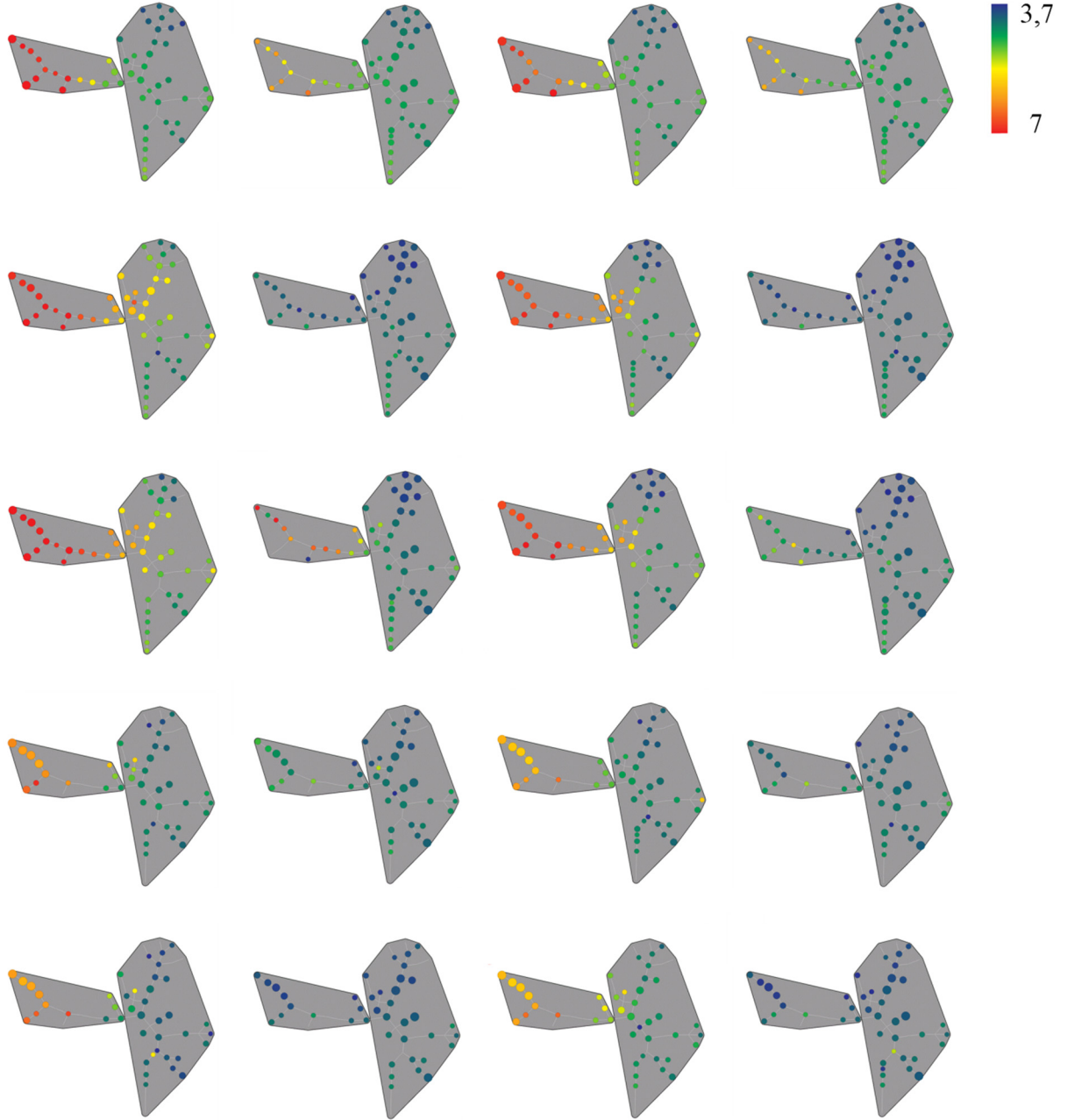
CD38

21% MSC

21% L4.5

8% MSC

8% L4.5



D

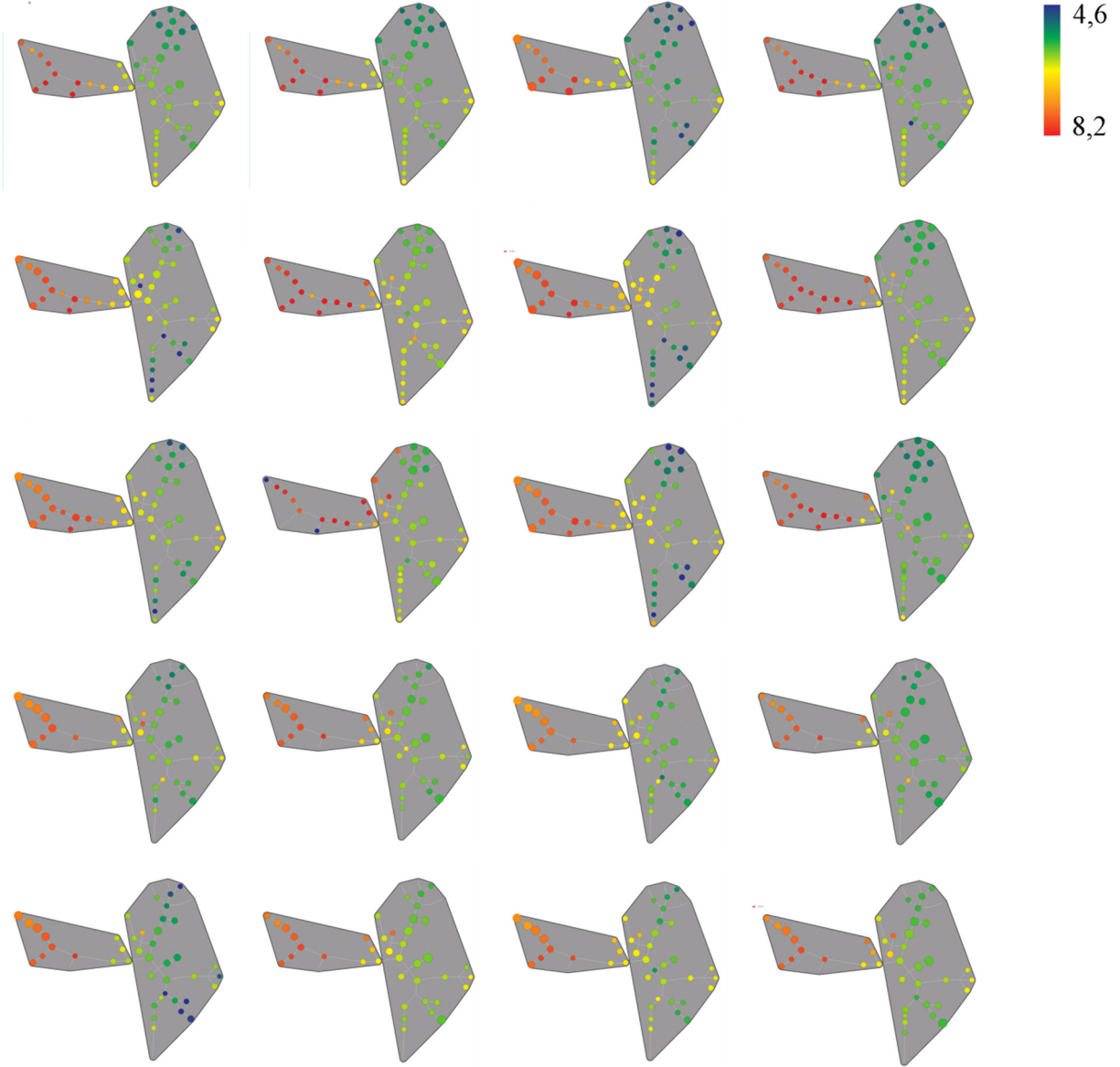
CD39

21% MSC

21% L4.5

8% MSC

8% L4.5



E

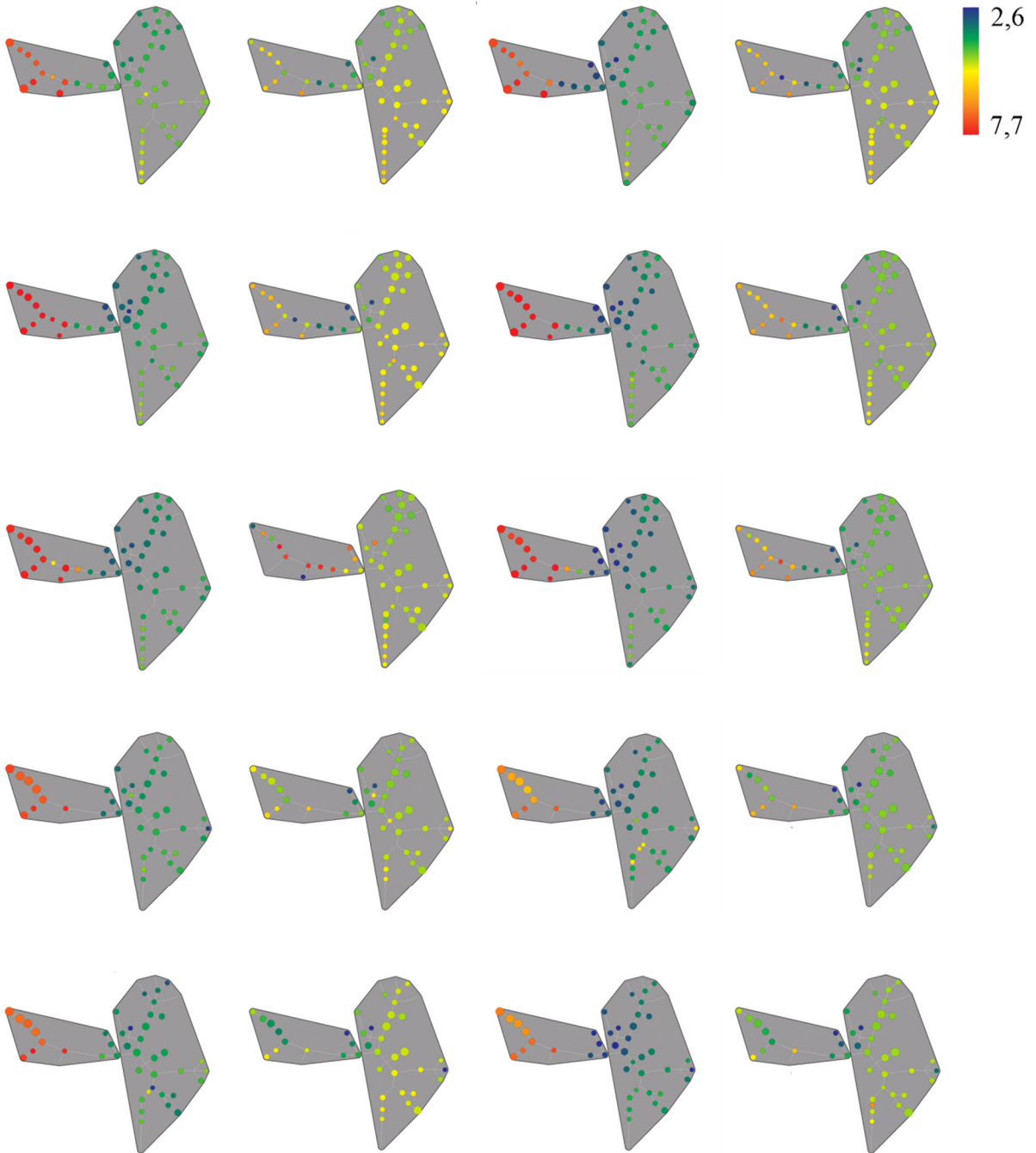
CD138

21% MSC

21% L4.5

8% MSC

8% L4.5



Discussion

Ces travaux de doctorat ont permis de mettre en évidence des éléments clés concernant des mécanismes impliqués dans la différenciation des plasmocytes humains. L'utilisation d'un système de culture capable de recréer in vitro un environnement simplifié des centres germinatifs, a permis de poser les bases d'un modèle favorisant l'émergence de cellules aux caractères plasmocytaires. De par la complexité d'un tel environnement, nous avons réalisé plusieurs études distinctes chargées d'analyser séparément des paramètres susceptibles d'influencer l'apparition de plasmocytes in vitro. Dans un premier temps, des cultures en présence de N-acétylcystéine (NAC) ont été effectuées afin d'évaluer l'importance de la balance redox sur le comportement des lymphocytes B mémoires [542]. En parallèle, alors que le niveau d'interaction CD40-CD154 est essentiel pour le devenir de la cellule [396], l'interaction CD70-CD27 a été testée et caractérisée dans le but d'améliorer la progression vers le stade de plasmocytes [286]. Globalement, ces deux premières étapes ont permis d'affiner notre compréhension du comportement des lymphocytes B mémoires activés dans un environnement reproduisant certaines conditions retrouvées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Afin de compléter notre évaluation des mécanismes de différenciation et dans le but d'optimiser notre modèle, la dernière étape visait un rapprochement avec le microenvironnement de la moelle osseuse. Cet objectif a été atteint par l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses et a permis de pallier les imperfections du précédent modèle, tout en orientant le procédé vers une optique thérapeutique.

Finalement, l'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence : l'effet du potentiel redox sur l'inhibition de la voie JAK-STAT3 sur des lymphocytes B mémoires en culture; la génération de plasmocytes in vitro à partir d'un milieu avec ou sans sérum et l'émergence de perspectives thérapeutiques.

1. Effets du NAC sur la culture de lymphocytes B mémoires activés

1.1 Le potentiel redox et son implication sur la voie JAK-STAT

Le premier volet a mis en évidence l'importance de la balance redox sur le comportement des lymphocytes B mémoires activés en démontrant l'effet inhibiteur du NAC sur la voie JAK-STAT [542]. La corrélation entre la physiologie des lymphocytes B et les espèces réactives à l'oxygène (ROS) est encore mal comprise de nos jours. Cependant, la synthèse de ces molécules instables apparaît nécessaire à plusieurs points critiques du développement des lymphocytes B. À titre d'exemple, la liaison CD40-CD154, à l'interface des lymphocytes B et des lymphocytes T folliculaires, est une source majeure de ROS à l'intérieur de la cellule [432]. In vitro, l'activation du CD40 chez les cellules mémoires induit une augmentation de leur prolifération, assure la survie et favorise la sécrétion d'Ig [63], et ce notamment en présence d'IL-2 et d'IL-10 [394]. Les études réalisées avec le NAC ont montré une diminution de la prolifération et de la sécrétion d'Ig [100, 542]. Ces diminutions sont attribuables notamment à une réduction de la phosphorylation des protéines JAK2 et JAK3 impliquées dans l'activation de STAT3. Étonnamment, nos travaux ont montré une diminution de l'expression d'une sous-unité du récepteur de l'IL-2 (CD25) qui était proportionnelle à la concentration de NAC présente dans le milieu (Fig. S1). Ces résultats s'alignent avec les connaissances relatives à l'IL-2, notamment au regard de son impact sur la prolifération [562], ainsi que la sécrétion d'Ig [563]. Les effets du NAC sur les cellules pourraient donc être le fruit d'une diminution de l'activation des voies de signalisation reliées à l'IL-2. L'IL-2 est en mesure d'activer la voie JAK-STAT [101], mais aussi des protéines kinases aux propriétés mitogènes appartenant à la famille des MAPK (Figure 13). Ainsi une inhibition partielle du signal associé à ces MAPK (ERK, p38) pourrait expliquer le ralentissement concomitant de la prolifération et de la sécrétion qui ont été observées dans cette étude. Cependant, dans notre modèle, le maintien de l'activation du CD40 et des récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-10 pourrait pallier dans une certaine mesure au déficit

attribuable au signal de l'IL-2. Ces possibilités sont par ailleurs appuyées par le maintien du niveau d'activation des voies MAPK, Akt et NF- κ B à la suite d'une longue induction au NAC [100].

1.2 Maintien d'un environnement proche des centres germinatifs par le NAC

In vivo, l'environnement des centres germinatifs est faible en oxygène et les cellules qui les composent sont caractérisées par une hypersensibilité aux perturbations du potentiel redox [564]. Il a été montré qu'une augmentation des ROS au sein de ces structures anatomiques était nécessaire à la génération des plasmablastes et des plasmocytes [333, 364]. La présence de NAC dans notre modèle a d'ailleurs eu pour effet de diminuer le niveau des ROS générés (résultats non présentés), ainsi qu'un ralentissement de la différenciation. Ces observations suggèrent que cet antioxydant favoriserait le maintien des lymphocytes B à un stade de centroblastes ou de centrocytes, tel qu'observé dans les centres germinatifs. Ce postulat s'appuie entre autres sur nos résultats montrant la diminution de l'expression du récepteur à l'IL-2. En effet, l'IL-2 est reconnue comme un initiateur de l'expression de gènes menant à la formation de plasmocytes [565]. Une inhibition de ce récepteur aurait donc comme conséquence un ralentissement de la génération de plasmocytes dans nos conditions de culture. De plus, une étude réalisée sur des cellules souches CD34⁺ a montré que le maintien du caractère pluripotent pouvait être favorisé par l'ajout de NAC dans le milieu de culture de ces cellules [566]. Ainsi, les propriétés antioxydantes du NAC joueraient un rôle d'inhibiteur des voies de signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire.

Pour appuyer notre hypothèse stipulant que le NAC puisse favoriser le maintien d'un environnement proche de celui des centres germinatifs in vitro, des analyses sur l'expression des marqueurs d'adhésion ont été réalisées. L'augmentation de l'expression des intégrines CD11a [100] et CD49d (résultats non présentés), dont la surexpression apparaît nécessaire pour le maintien des centres germinatifs in

vivo [567], a été observé en présence de NAC. Il a été reporté que le NAC avait des effets similaires sur des cultures de cellules endothéliales, induisant chez ces cellules une augmentation de la quantité de molécules d'adhésion I-CAM [568]. Ces observations permettraient donc d'expliquer la formation d'agrégats cellulaires observés in vitro sur des lymphocytes B cultivés en présence de l'antioxydant [100].

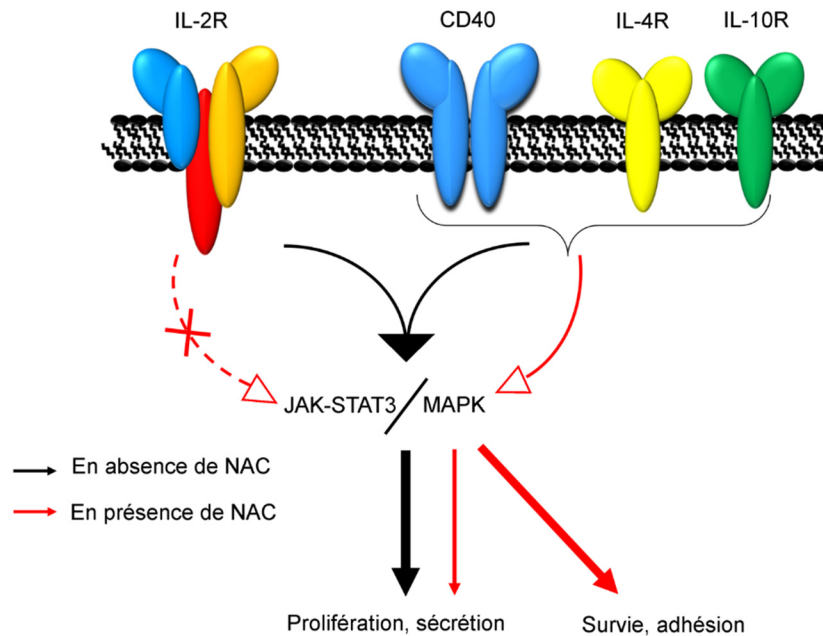


Figure 13 : Modèle proposé de l'effet du NAC sur les voies de signalisation activées par les récepteurs à l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et le CD40, ainsi que leurs répercussions sur le devenir de la cellule. Dans les conditions de culture, la stimulation du CD40, associée à celle des récepteurs de cytokines, jouerait de concert pour l'activation de la voie JAK-STAT3 et MAP kinase, pour favoriser la prolifération des cellules. L'inhibition du signal issu de l'IL-2 en présence de NAC aurait un effet sur l'activation de la voie JAK-STAT3, dont le relais serait supporté par les MAPK.

Finalement, l'ensemble de ces résultats reliant le NAC à l'inhibition de la différenciation concordent avec les observations relatives à l'hypersensibilité des lymphocytes B vis-à-vis des ROS présents dans les centres germinatifs [564]. Ainsi, outre les interactions cellule-cellule ou l'action des facteurs solubles présents dans les centres germinatifs, le niveau d'oxygène environnant doit jouer un rôle majeur sur le devenir des lymphocytes B activés.

2. Génération de plasmocytes in vitro à partir de lymphocytes B mémoires

2.1 Différence associée à l'interaction CD27 et CD40

Notre modèle permet de générer in vitro des cellules ayant un phénotype se rapprochant des plasmocytes à partir de lymphocytes B mémoires dits « *switchés* » IgG⁺ et IgA⁺. Nos conditions de culture, qui simulent une interaction T-dépendante au cours de la réponse secondaire, sont en mesure de générer des plasmocytes CD31⁺CD38⁺CD138⁺ qui expriment aussi le marqueur CD39. L'émergence de ces plasmocytes est plus rapide suivant l'activation des lymphocytes mémoires par la liaison de CD70 en comparaison avec le CD40. Cette distinction de réponse peut s'expliquer par une avancée en différenciation vers le stade plasmablaste des cellules exprimant le CD27, qui se traduit par un plus haut degré de maturation [127, 569]. D'autre part, le marqueur CD27 semble indispensable à l'émergence de populations plasmocytaires [570], et son expression apparaît reliée à une pré-activation par le CD40 [198]. Une stimulation par le ligand CD70 permettrait donc de sélectionner et activer plus rapidement les lymphocytes B mémoires CD27⁺ lors de la réponse secondaire, alors qu'une stimulation par le CD40 initierait autant une réponse primaire que secondaire. Une interaction élevée entre CD40 et CD154 favorise l'expansion des lymphocytes CD27⁻ [86] qui, dans nos conditions de culture, représentent 20% des cellules IgG⁺ [127]. Ainsi, une réduction de quatre fois du niveau de l'interaction CD40-CD154 permettrait donc d'une part de rehausser initialement la proportion de lymphocytes B CD27⁺, et par la suite d'en favoriser leur différenciation. L'atténuation de l'interaction entre CD40 et CD154 dans notre modèle pourrait donc expliquer le délai dans l'émergence des marqueurs CD38 et CD138, lorsque comparé à l'interaction entre CD27 et CD70. Ce retard est cependant transitoire, puisque la fréquence des cellules CD38⁺CD138⁺ est similaire dans les deux conditions après deux semaines de culture. Fait intéressant, cette période de deux semaines correspond au temps nécessaire à l'émergence de cellules pleinement

différenciées au cours de la réponse primaire [122]. Nos observations appuient que les deux types d'interactions CD40-CD154 et CD27-CD70 jouent des rôles distincts au niveau de la cinétique d'activation des lymphocytes B in vivo.

2.2 Hétérogénéité générée à la suite de la phase de différenciation

Au cours de la dernière étape de nos travaux, nous avons montré l'émergence d'une population hautement différenciée vers le stade plasmocyte à la suite de l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse. L'innovation marquante de ce modèle est que les cellules sont cultivées dans un milieu exempt de sérum et de protéines animales. Dans ce modèle, les trois types cellulaires utilisés en co-culture, à savoir les cellules L4.5, les éosinophiles ou les MSC, ont mené à l'émergence de deux populations de plasmocytes distinctes d'un point de vue phénotypique. En rétrospective, ces deux populations sont aussi détectables lors de la stimulation des cellules mémoires avec le CD40 ou le CD27 (chapitre II) et ce dans un milieu contenant du sérum bovin (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent qu'indépendamment du type d'interaction utilisée ou des composantes du milieu de culture, le devenir en plasmocytes des lymphocytes B mémoires activés serait déjà prédéterminé [175, 289]. Cette hypothèse est supportée par plusieurs études démontrant l'hétérogénéité des populations cellulaires générées à la suite d'une réaction au niveau des centres germinatifs [550, 551]. En contrepartie, il pourrait donc être possible, en tenant compte de la nature et de la durée de la stimulation, d'influencer le devenir des cellules en culture. Les conditions de différenciation basées sur une interaction CD40-CD154, même lorsque celle-ci est très faible, s'apparentent à un environnement proche de celui des centres germinatifs. Les cellules alors maintenues dans ces conditions tendent à se ressembler, puisque les chances pour une cellule de recevoir un signal différent de celui d'une autre se trouvent estompées dans le temps. Ceci pourrait expliquer la présence de plus de 80% de cellules ayant un phénotype $FSC^{faible}SSC^{fort}$ et d'une moins grande proportion de cellules $CD138^+$ à la fin de la phase de différenciation en présence des cellules $CD154^+$ (L4.5). Le changement d'environnement, à travers le transfert des cellules

en culture sur des MSC, favoriserait l'apparition d'évènements plus propices à la génération de plasmocytes CD138⁺. Ce résultat appuie notamment les observations de Duffy [550], montrant que chaque cellule possède un destin qui lui est propre. De plus nos analyses ont montré qu'il été possible de moduler le ratio des deux phénotypes FSC^{faible}SSC^{fort} et FSC^{fort}SSC^{faible}, ce qui suggère qu'il est possible d'influencer l'émergence des plasmocytes à longue vie. Ces résultats s'appuient également sur la nécessité de générer une quantité limitée de plasmocytes à longue vie en raison du nombre limité de niches capable de supporter leur survie au sein de la moelle osseuse [279].

2.3 Caractéristique et identification des populations générées

Nous avons vu que les cellules avec le profil FSC^{faible}SSC^{fort} détectées à la fin de la phase de différenciation apparaissent majoritaires lorsque placées en présence de cellules CD154⁺. Étant donné le niveau plus faible d'expression des marqueurs CD38 et CD138 au sein de cette population, il est possible de conclure que ces cellules sont moins avancées en différenciation que celles au profil FSC^{fort}SSC^{faible}. Ces cellules présentent un faible niveau d'expression de CD31 à leur surface, ce qui les associe aussi aux centrocytes générés à la fin de la réaction des centres germinatifs [571]. Des études réalisées chez des souris ont permis de mettre en évidence l'absence de division chez les centrocytes de la zone claire, qui sont naturellement associées à une faible sécrétion d'IgG [572]. Ces observations suggèrent que les cellules obtenues majoritairement à la fin de la phase de différenciation en présence de l'interaction CD154 pourraient correspondre à des centrocytes de centres germinatifs.

En parallèle, en se basant sur le phénotype CD31⁺CD38⁺CD138⁺ de la population FSC^{fort}SSC^{faible}, il est possible de relier ces cellules à des précurseurs de plasmocytes [553]. Cependant, il est surprenant de constater que le marqueur CD39 soit toujours détectable à la surface de ces plasmocytes CD31⁺CD38⁺CD138⁺ générés dans des conditions très proches de celles de la moelle osseuse. Nous savons que l'activité ectonucléotidase de CD39 est

reconnue pour son action anti-inflammatoire, notamment via la synthèse d'adénosine dans le milieu extracellulaire. Étant donné que les MSC de la moelle osseuse sécrètent des cytokines pro-inflammatoires [523], il est possible de postuler que les plasmocytes générés *in vitro* en présence des MSC maintiennent un niveau d'expression du CD39 afin de contrer cet effet. Cette conclusion est supportée par des résultats ayant montré que l'ajout de MSC de moelle osseuse à une culture de lymphocytes Th17 avait aussi pour effet l'augmentation l'expression de CD39 [573]. CD39 est normalement absent des populations de plasmocytes présentes dans la moelle osseuse [245, 427]. Ces travaux indiquent que cette interaction avec les MSC n'est pas suffisante pour recréer complètement le microenvironnement des plasmocytes à longue-vie.

2.4 Comparaison de notre modèle avec un environnement de moelle osseuse

Les travaux présentés dans le chapitre III ont montré que la génération de plasmocytes était optimale lorsqu'elle se faisait suivant un contact direct avec les MSC de la moelle osseuse. Bien que les niveaux de différenciation phénotypiques soient quasi similaires avec les conditions en absence de contact (*transwell*) entre les lymphocytes B et les MSC, les concentrations de cytokines et d'IgG détectées étaient plus faibles. Concernant le CXCL12, les diminutions de concentrations peuvent s'expliquer en raison de l'absence de contact cellules-cellules ainsi que de la densité cellulaire dont est dépendante la sécrétion de cette chimiokine par les MSC [524]. La présence de plasmocytes avec les MSC augmente la densité cellulaire globale et joue un rôle positif sur la sécrétion de CXCL12. Réciproquement, la sécrétion de CXCL12 diminuerait en raison d'une plus faible densité cellulaire en « *transwell* ». De plus, la porosité et le matériel du puit supérieur dans lequel sont placés les MSC peuvent avoir un impact sur le niveau d'adhérence de ces cellules et par conséquent sur leur capacité de sécrétion. D'un autre côté, la diminution de la sécrétion de CXCL12 par les MSC en « *transwell* » ou lors des cultures à 8% d'oxygène pourrait très bien s'expliquer par une

surexpression des récepteurs CXCR4 à la surface des plasmocytes, facilitant la captation de cette chimiokine [574].

Nos analyses ont également démontré que la sécrétion de TGF- β 1 était d'une part influencée par la présence de plasmocytes, mais était aussi indépendante du contact direct avec les MSC. Dans notre système de culture, cette cytokine permettrait d'expliquer l'arrêt de la prolifération des cellules et, probablement leur maintien en phase G1 [575] telle qu'il a été démontré chez des cellules souches CD34⁺ dans un contexte similaire [548]. D'autre part, le TGF- β 1 semble pouvoir aussi jouer un rôle de sélection au niveau des plasmocytes générés. En effet, en présence des MSC, le niveau de viabilité des cellules de la population FSC^{faible}SSC^{fort}, laquelle se rapprochent des centrocytes, est beaucoup plus faible comparativement aux cellules avec le phénotype de plasmocytes, soit les FSC^{fort}SSC^{faible} (fig. 5, Chapitre III). Les cellules centrocytes « like », moins avancées en différenciation, seraient donc plus sensibles à l'effet proapoptotique du TGF- β , tel que rapporté lorsqu'elles sont au sein des centres germinatifs et de la moelle osseuse [576]. Cette observation est de plus en accord avec la notion de sélection réalisée à l'entrée de la moelle osseuse, empêchant le maintien de plasmablastes au niveau des niches spécifiques au plasmocytes [304].

La présence de CXCL12 et TGF- β renforce d'autant plus la similarité de notre modèle d'étude avec un environnement proche de celui de la moelle osseuse (Fig. 14). Le CXCL12, au-delà de ses fonctions de chémoattractant, est impliqué dans l'expression de molécules d'adhésion tels les V-CAMs [577], qui protège entre autres les cellules souches hématopoïétiques contre leur relargage en circulation. En parallèle la sécrétion de TGF- β semble favoriser la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire au niveau de la moelle osseuse, tel le collagène (Fig. 14), par des MSC [578].

À l'appui de notre modèle d'étude *in vitro*, des études portant chez la souris ont montré qu'*in vivo*, les plasmocytes de la moelle osseuse étaient à plus de 80% en contact avec des MSC [312]. Ces observations confirment l'importance d'une telle interaction et justifient son utilisation dans notre modèle de culture.

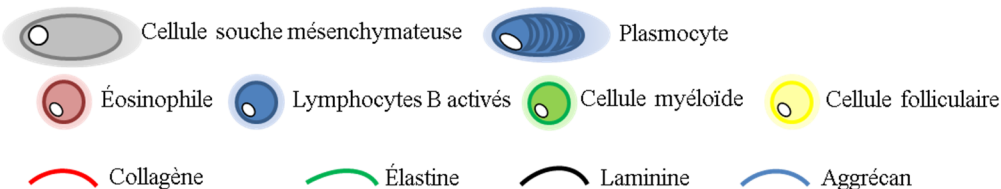
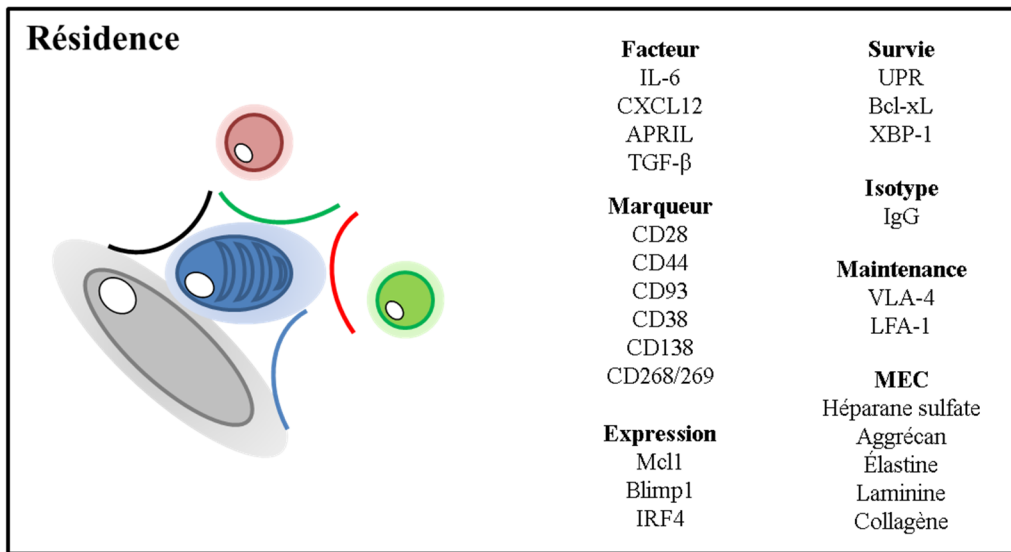
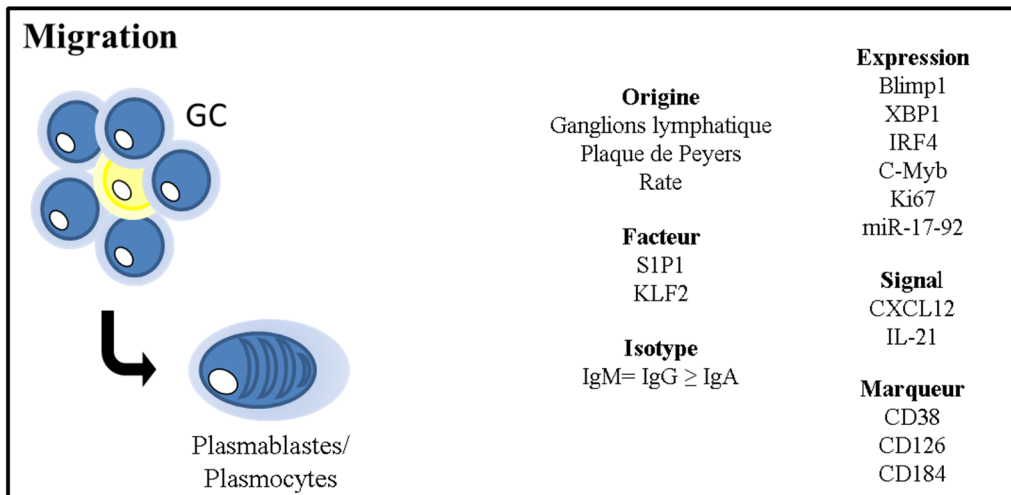


Figure 14 : Les principaux acteurs menant à la génération de plasmocytes in vivo : des centres germinatifs vers une niche de la moelle osseuse. Inspiré de Corcoran et coll. [579]. La phase de migration représente la somme des éléments impliqués dans l'émergence des plasmablastes et des plasmocytes à la sortie des centres germinatifs, à la suite d'une interaction avec une cellule folliculaire dendritique, ou un lymphocyte T folliculaire. La phase de résidence recoupe les acteurs nécessaires au maintien et à la survie des plasmocytes à longue vie au niveau des niches de la moelle osseuse.

3. Ouverture vers la thérapie cellulaire

De nos jours, la thérapie cellulaire et la médecine personnalisée sont de plus en plus considérées comme une avenue prometteuse pour les patients. La fonction de cellule présentatrice d'antigènes des lymphocytes B a déjà été proposée pour le traitement du cancer, dans l'optique d'activer une réponse des lymphocytes T contre des antigènes tumoraux [580]. De son côté, le modèle d'étude issu de nos travaux, permettant de produire de grandes quantités de plasmocytes, ouvre la porte vers leur utilisation comme une source potentielle de cellules thérapeutiques afin d'assurer une immunité passive.

Ce concept émerge directement des travaux présentés au chapitre III, dans lequel nous proposons que l'utilisation des plasmocytes générés *in vitro* puisse redonner une partie de la mémoire humorale à un individu ayant un système immunitaire affaibli (Fig. 15). Des études statistiques réalisées chez des patients ayant reçu une greffe de cellules souches montrent que 77% d'entre eux ont souffert d'au moins une infection majeure dans l'année suivant la greffe [414]. Celles-ci sont dues principalement à l'absence d'un système immunitaire capable de lutter contre des agents infectieux normalement inoffensifs. C'est pourquoi nous croyons que ce modèle de culture puisse ouvrir vers la possibilité de pallier ces infections en réalisant une greffe autologue de plasmocytes générés *ex vivo*.

3.1 Impact du milieu de culture sur le devenir des lymphocytes B

L'addition de sérum de bœuf fœtal, comme complément de facteurs de croissance, est couramment utilisée en culture cellulaire. Cependant, l'incertitude sur sa composition exacte, ainsi que les variations observables d'un lot à l'autre, tendent à remettre en question son utilisation pour un usage thérapeutique. L'origine animale de ce sérum est reliée aux risques de contamination par des mycoplasmes, des prions, des bactéries ou des virus [556], qui vont à l'encontre des critères qualité requis pour des applications cliniques. De plus, le caractère immunogène des protéines bovines rend son utilisation indésirable en thérapie

cellulaire. Par exemple, une glycoprotéine présente dans le sérum de bœuf fœtal, l'acide N-glycolylneuraminique, est recyclée par les cellules en culture sous forme d'une composante membranaire [581] susceptible d'engendrer d'importantes réactions immunitaire [582].

Au-delà des contre-indications relatives à la thérapie cellulaire, l'hétérogénéité de la composition du sérum bovin peut aussi entraîner un biais expérimental, notamment par l'activation aléatoire de voies de signalisation intracellulaires. Dans nos conditions de culture, la présence de sérum bovin provoque une augmentation de l'expression du marqueur CD38 comparativement au milieu sans sérum. Ces résultats sont de plus en accord avec l'observation tirée des connaissances sur les cellules souches, montrant que le niveau d'expression élevé de CD38 en culture semble relié à la présence d'acide rétinoïque provenant du sérum bovin [583, 584].

3.2 Prédiction et rendement du système de culture

En termes de rendement, nous avons montré qu'il est possible de générer, à partir de 1×10^6 lymphocytes B mémoires activés, environ 5×10^6 plasmocytes CD138⁺ sur une durée de 20 jours de culture (Fig. 15). Les chambres de leucoréduction, notre source de cellules mémoires, contiennent jusqu'à $1,4 \times 10^9$ cellules mononuclées [450], et entre 1 et 2% de lymphocytes B mémoires IgG⁺ et IgA⁺. Le contenu de ces chambres en cellules totales est d'un ordre de grandeur comparable à ce qui est attendu des procédures d'aphérèse pour récolter les CD34 provenant du sang de patients mobilisés [585]. En partant de près de 10×10^6 cellules mémoires, il serait alors possible de récupérer près de 70×10^6 plasmocytes CD138⁺ viables en passant par une phase d'expansion de 8 jours. En se basant sur les doses utilisées en thérapie cellulaire chez l'humain, notamment pour la greffe de cellules souches CD34⁺ issues de sang mobilisé, il est possible d'estimer nos besoins en plasmocytes. De nos jours, les ratios utilisés en clinique sont de l'ordre de $1,6$ à $3,9 \times 10^6$ cellules/kg [586] pour une prise de greffe efficace. Ces valeurs sont sensiblement supérieures à celles obtenues à la suite de nos cultures in vitro. Cependant il serait possible d'y remédier en allongeant de

quelques jours la phase de prolifération. Nous savons que les taux d'expansion totaux en BPFM atteignent $17 \pm 4,6$ fois au bout de 12 jours (résultats non présentés). Ce taux d'expansion pourrait permettre l'obtention de près de 500×10^6 plasmocytes CD138⁺, qu'il suffirait de purifier avant de les redonner au patient. Une prolongation de la période de prolifération pourrait également être envisagée, dans le cas où la quantité de PBMC récupérée suite au procédé d'aphérèse est plus faible qu'à l'accoutumée, notamment dans le cas d'un prélèvement chez un enfant. La prolongation de la première phase de culture n'aura pas d'impact sur la qualité et le répertoire des plasmocytes générés. En effet, le modèle de culture basé sur CD40-CD154 ne peut pas induire de mutations somatiques au niveau des régions variables des chaînes d'Igs [394], conservant ainsi le niveau de spécificité des Igs sécrétés par les cellules en culture.

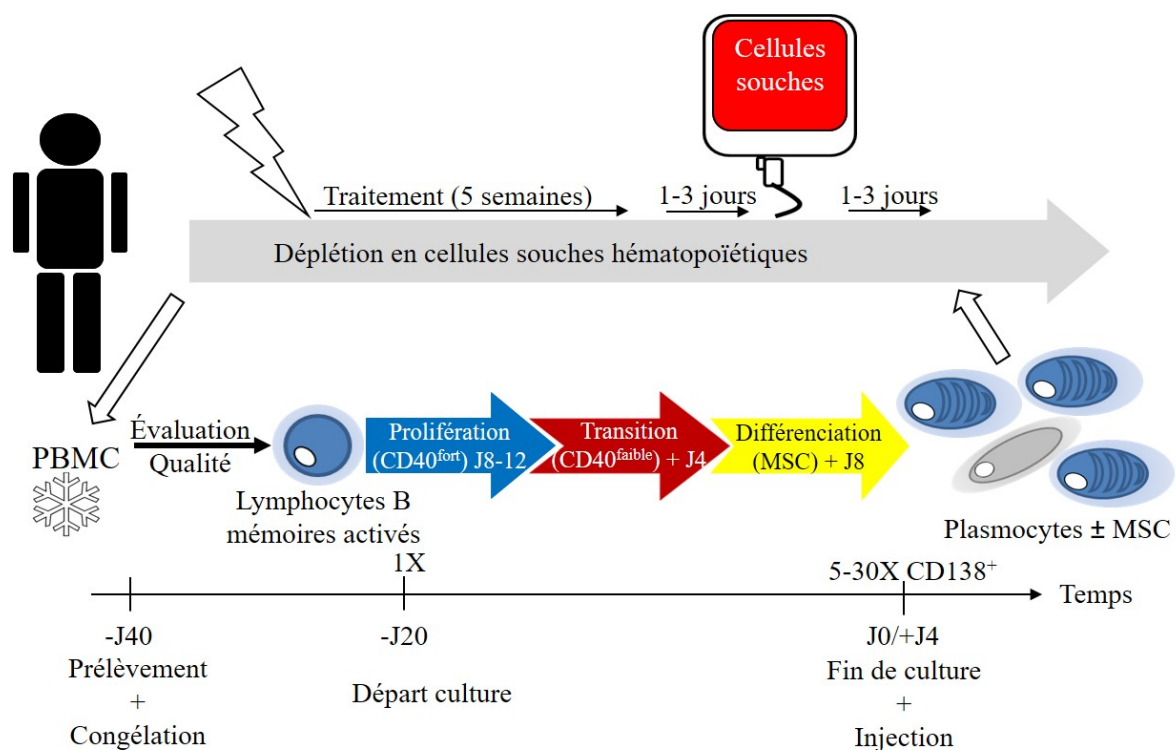


Figure 15 : Modèle thérapeutique proposée pour la greffe de plasmocytes autologues générés ex vivo pour des patients recevant une greffe de cellules souches à la suite d'un traitement de chimiothérapie. Les jours indiqués pour la durée de culture sont basés sur une période de traitement de 5 semaines.

Au point de vue efficacité, il est important de prendre en considération plusieurs éléments relatifs à la capacité des plasmocytes à migrer, survivre et reconstituer une sécrétion efficace d'anticorps protecteurs. C'est pourquoi il faut viser des quantités qui sont largement au-dessus des niveaux physiologiques, puisque ces cellules ne représentent que 0,1-1% du compartiment de la moelle osseuse [263]. Les raisons poussant à cette précaution sont les risques associés à une migration des cellules ailleurs que dans les sites de la moelle osseuse ou de la rate, pour être capturées au niveau des poumons ou du foie et éliminer par l'organisme [587]. De plus, il faut considérer l'inaptitude de ces cellules à proliférer, ce qui implique que les plasmocytes qui pourront se rendre au sein de la moelle osseuse devraient être capables de survivre pendant au moins plusieurs mois pour être efficaces.

3.3 Migration et résidence vers la moelle osseuse

Malgré l'absence d'information relative à la greffe autologue de plasmocytes, il est possible d'émettre des hypothèses quant au pouvoir migratoire des cellules obtenues, en se basant sur les observations réalisées avec les cellules souches. En effet, la greffe de cellules CD34⁺ à la suite de traitements de chimiothérapie est une pratique courante, qui permet de restaurer un système hématopoïétique fonctionnel. Des conditions favorisant la migration ainsi que la résidence de ces cellules au sein de la moelle osseuse sont connues [588]. Les principales caractéristiques favorisant la migration des cellules souches sont reliées à leur aptitude de réponse au gradient de CXCL12, ainsi que leur capacité à se lier à la molécule d'adhésion V-CAM1. Dans nos conditions de culture en présence de MSC, le CXCL12 est effectivement détecté et, d'autre part, nos cellules expriment à leur surface le marqueur CD49d, un ligand de V-CAM1.

Étant donné la capacité des MSC à résister aux radiations, il est possible de compter sur le maintien d'une portion de la niche spécifique aux plasmocytes à la suite d'une radiothérapie [589]. Ce point est extrêmement important, puisque l'état de ce microenvironnement pourra déterminer la possibilité de la reprise de greffe,

tant pour des cellules souches que pour des plasmocytes. Ainsi, le maintien de l'expression de facteurs chémoattractants, associés à l'expression de protéines formant la matrice extracellulaire, devrait favoriser la migration et le maintien des plasmocytes dans la moelle osseuse.

Conclusion

Ces travaux de doctorat ont principalement été menés dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation des lymphocytes B mémoires activés en plasmocytes. Plusieurs paramètres susceptibles d'influencer le devenir de ces cellules mémoires humaines en culture ont été étudiés afin d'évaluer leur implication dans la génération de plasmocytes. Dans un premier temps, les essais avec le NAC ont permis de valider l'importance du potentiel redox sur le comportement des cellules en culture. L'effet inhibiteur de cet antioxydant sur la voie JAK-STAT3 nous a de plus renseignés sur l'importance de cette voie de signalisation sur le devenir des lymphocytes B mémoires. Par la suite, l'utilisation d'un système de culture en trois phases nous a permis d'obtenir une confirmation phénotypique de l'état d'avancement des lymphocytes B mémoires in vitro. Ces conditions de culture en présence de sérum, basées sur une modulation de l'interaction CD40 et CD70, ont favorisé l'émergence de cellules au caractère plasmocyte CD38^{haut}CD138⁺. Cependant, le maintien de l'expression du marqueur CD39 suggère que les cellules obtenues n'ont pas encore atteint pleinement le stade plasmocyte, et en sont plutôt des précurseurs. Le développement à l'interne d'un milieu exempt de sérum, associé à l'obtention de ces cellules dans nos conditions in vitro, nous a amenés à considérer le potentiel thérapeutique d'un tel modèle de culture. Ainsi, afin d'obtenir des plasmocytes qui soient plus près des cellules à longue vie, nous nous sommes intéressés à leurs niches, telles que constituées in vivo au niveau de la moelle osseuse. La composition en MSC de cet environnement spécifique nous a poussée à utiliser ces cellules en co-culture avec nos plasmablastes générés in vitro. Ce modèle a permis une augmentation de la viabilité associée à l'émergence de populations cellulaires pleinement différenciées en plasmocytes. La détection de CXCL12 et de TGF- β 1 dans les surnageants de culture ont permis de valider que nos conditions de différenciation se rapprochaient d'un environnement de la moelle osseuse.

En conclusion, notre modèle de culture in vitro ouvre les portes vers de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des lymphocytes B mémoires activés pour la

génération de plasmocytes à des fins thérapeutiques. La démonstration de la faisabilité d'une greffe autologue de plasmocytes pourrait ouvrir une nouvelle avenue afin de protéger les patients greffés durant la fenêtre de vulnérabilité aux infections.

Perspectives

Les prochaines étapes de ce projet de doctorat s'inscrivent majoritairement dans l'optimisation du procédé de culture et le renforcement de la caractérisation des plasmocytes et de leur répertoire d'anticorps obtenus afin d'arriver ultimement au développement d'un modèle de thérapie cellulaire.

Dans un premier temps, l'analyse métagénomique de gènes caractéristiques des plasmocytes tels Mcl1, Blimp1 et IRF-4 (Fig. 14) permettrait de confirmer nos observations relatives à l'état de maturation finale des plasmocytes générés. Dans la continuité de l'approche phénotypique, il serait judicieux d'orienter notre analyse vers des marqueurs propres à l'environnement de la moelle osseuse, tels le CD44, ou des récepteurs tels CCR2 et CCR10, dont l'expression reflète la résidence au niveau des niches spécifiques. Toujours *in vitro*, une analyse en microscopie à fluorescence devrait permettre de visualiser l'agencement de la matrice extracellulaire générée par les MSC et les interactions réalisées avec les plasmocytes obtenus.

En parallèle, la portée d'un tel projet étant le transfert de ce modèle pour une application clinique, il s'avère indispensable d'optimiser le procédé de culture compatible avec des méthodes GMP. D'une part, il sera nécessaire de démontrer par des tests de génomique l'absence de tout matériel associée aux cellules murines L4.5 contaminantes dans le produit final. Il faudra s'assurer qu'aucune des étapes de préparations de ces cellules ou de leur supports cellulaires ne soient dépendantes de sérum bovin. D'autre part, une optimisation des conditions de croissance des cellules L4.5 et des MSC dans un milieu exempt de sérum sera incontournable, puisque présentement la préparation des banques maîtresses de cellules L4.5 et MSC nécessaires à la co-culture est un facteur limitant de notre modèle.

Finalement des essais avec un modèle de souris comme les NOD scid gamma (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) devraient permettre d'évaluer la faisabilité de nos hypothèses quant à l'aptitude des plasmocytes générés *in vitro* à

migrer et se greffer au niveau de la moelle osseuse. L'injection de plasmocytes CD138⁺ purifiés ou de l'ensemble des populations obtenues avec les MSC à la fin de la culture permettrait de vérifier s'il y a possibilité de reconstituer temporairement et rapidement une sécrétion d'anticorps dans ce modèle in vivo. L'ajout de MSC lors des injections de plasmocytes s'inspire de l'impact des MSC sur le potentiel de reprise de greffe des cellules CD34⁺ au niveau de la moelle osseuse réalisé chez des modèles murins [590, 591]. Selon les résultats de survie des plasmocytes et de prise de greffe, il serait alors possible de poursuivre des études précliniques avec un autre modèle animal humanisé ou immunodéficient, tel le chien ou le chimpanzé. Dans le cas d'une réponse positive des deux modèles précédents, une étude clinique de phase 1 pourrait alors être envisageable.

Annexe

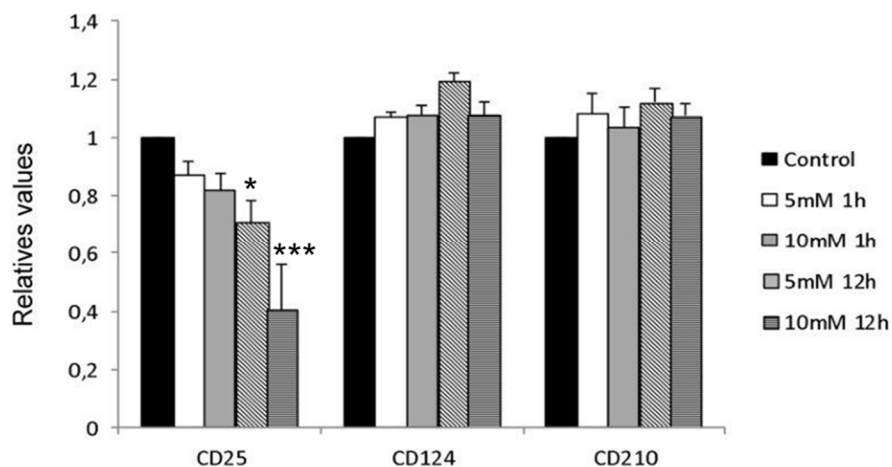


Figure S1 : Effet du NAC sur l'expression des récepteurs CD25, CD124 et CD210 exprimés à la surface des lymphocytes B mémoires activés. Mesure de l'intensité d'expression relative des récepteurs à l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-10, avec comme référence les conditions exemptes de NAC, réalisé par cytométrie. Le résultat présenté correspond à la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes. * $p \leq 0.05$ et *** $p \leq 0.001$ (Kruskal Wallis U test).

Bibliographie

1. Elias, P.M., *The skin barrier as an innate immune element*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(1): p. 3-14.
2. McDermott, A.J. and G.B. Huffnagle, *The microbiome and regulation of mucosal immunity*. Immunology, 2014. **142**(1): p. 24-31.
3. Cheng, M., et al., *NK cell-based immunotherapy for malignant diseases*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(3): p. 230-52.
4. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
5. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
6. Wencker, M., et al., *Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness*. Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 80-7.
7. Molne, L., et al., *Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by Staphylococcus aureus*. Clin Exp Immunol, 2003. **132**(2): p. 209-15.
8. Manz, R.A., et al., *Maintenance of serum antibody levels*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 367-86.
9. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
10. Vinuesa, C.G. and P.P. Chang, *Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 119-26.
11. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
12. Moser, M. and O. Leo, *Key concepts in immunology*. Vaccine, 2010. **28 Suppl 3**: p. C2-13.
13. Pape, K.A., et al., *The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 491-502.
14. Glenny, A.T. and H.J. Sudmersen, *Notes on the Production of Immunity to Diphtheria Toxin*. J Hyg (Lond), 1921. **20**(2): p. 176-220.
15. Landsteiner, K.a.C., W, *Experiments on transfert of cutaneous sensitivity to simple compounds*. Exp. Biolo. Med, 1942. **49**: p. 688-690.
16. Cooper, M.D., R.D. Peterson, and R.A. Good, *Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken*. Nature, 1965. **205**: p. 143-6.
17. Roitt, I.M., et al., *The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views*. Lancet, 1969. **2**(7616): p. 367-71.
18. Porter, R.R., *The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain*. Biochem J, 1959. **73**: p. 119-26.
19. Kincade, P.W., et al., *Suppression of immunoglobulin G synthesis as a result of antibody-mediated suppression of immunoglobulin M synthesis in chickens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **67**(4): p. 1918-25.

20. Lawton, A.R., 3rd, et al., *Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice. I. Effects of treatment with antibody to κ -chain.* J Exp Med, 1972. **135**(2): p. 277-97.
21. Hozumi, N. and S. Tonegawa, *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(10): p. 3628-32.
22. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching.* Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
23. Esser, C. and A. Radbruch, *Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis.* Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 717-35.
24. Hodgkin, P.D., J.H. Lee, and A.B. Lyons, *B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number.* J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 277-81.
25. Rogers, J., et al., *Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain.* Cell, 1980. **20**(2): p. 303-12.
26. Reth, M., et al., *The B-cell antigen receptor complex.* Immunol Today, 1991. **12**(6): p. 196-201.
27. Pone, E.J., et al., *Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses.* Crit Rev Immunol, 2010. **30**(1): p. 1-29.
28. Mosier, D.E., J.J. Mond, and E.A. Goldings, *The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect.* J Immunol, 1977. **119**(6): p. 1874-8.
29. Coutinho, A., et al., *Mechanism of thymus-independent immunocyte triggering. Mitogenic activation of B cells results in specific immune responses.* J Exp Med, 1974. **139**(1): p. 74-92.
30. Bekeredjian-Ding, I. and G. Jegu, *Toll-like receptors--sentries in the B-cell response.* Immunology, 2009. **128**(3): p. 311-23.
31. Vos, Q., et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms.* Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.
32. Poe, J.C. and T.F. Tedder, *CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance.* Trends Immunol, 2012. **33**(8): p. 413-20.
33. Miller, A.T. and L.J. Berg, *New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 331-40.
34. Ishida, H., et al., *Efficacy of IgM anti-blood type antibody monitoring by enzyme-linked immunosorbent assay after renal transplantation across the blood barrier: high-dose immunoglobulin administration blocks IgM rather than IgG anti-blood type antibodies.* Transplant Proc, 2004. **36**(7): p. 2178-81.
35. Hess, C., et al., *T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies.* J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3788-96.
36. Drayton, D.L., et al., *Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis.* Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 344-53.
37. Halin, C., et al., *In vivo imaging of lymphocyte trafficking.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 581-603.
38. Mond, J.J., et al., *T cell independent antigens.* Curr Opin Immunol, 1995. **7**(3): p. 349-54.

39. Carroll, M.C., *The role of complement in B cell activation and tolerance*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 61-88.
40. Chen, Z., S.B. Koralov, and G. Kelsoe, *Regulation of humoral immune responses by CD21/CD35*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 194-204.
41. Qi, H., et al., *Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1672-6.
42. Batista, F.D. and N.E. Harwood, *The who, how and where of antigen presentation to B cells*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(1): p. 15-27.
43. Batista, F.D., D. Iber, and M.S. Neuberger, *B cells acquire antigen from target cells after synapse formation*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 489-94.
44. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 375-96.
45. Suzuki, K., et al., *Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1485-93.
46. Stoddart, A., et al., *Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 451-62.
47. Tulp, A., et al., *Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 120-6.
48. Pierce, S.K., *Lipid rafts and B-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 96-105.
49. Barnett, L.G., et al., *B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation*. J Immunol, 2014. **192**(8): p. 3607-17.
50. Crawford, A., et al., *Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3498-506.
51. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
52. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
53. Nakanishi, K., et al., *IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 791-8.
54. Shibui, A., et al., *Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production*. Cytokine, 2012. **59**(1): p. 108-14.
55. Nishimura, H., et al., *Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1563-72.
56. Shekhar, S. and X. Yang, *The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(5): p. 380-5.
57. Thibult, M.L., et al., *PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation*. Int Immunol, 2013. **25**(2): p. 129-37.
58. Khan, A.R., et al., *PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 5997.
59. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.

60. Borriello, F., et al., *B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation*. *Immunity*, 1997. **6**(3): p. 303-13.
61. Lumsden, J.M., J.A. Williams, and R.J. Hodes, *Differential Requirements for Expression of CD80/86 and CD40 on B Cells for T-Dependent Antibody Responses In Vivo*. *J Immunol*, 2003. **170**(2): p. 781-7.
62. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, *The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(3-4): p. 297-309.
63. Neron, S., et al., *Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011. **59**(1): p. 25-40.
64. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. *Adv Exp Med Biol*, 1995. **378**: p. 79-83.
65. Kilinc, M.O., et al., *Generation of a multimeric form of CD40L with potent immunostimulatory activity using streptavidin as a chaperon*. *Exp Mol Pathol*, 2006. **80**(3): p. 252-61.
66. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 152-72.
67. Conley, M.E., et al., *Hyper IgM syndrome associated with defective CD40-mediated B cell activation*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(4): p. 1404-9.
68. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
69. MacDonald, K.P., et al., *Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2404-14.
70. Stewart, R., et al., *CD154 tone sets the signaling pathways and transcriptome generated in model CD40-pluricompetent L3055 Burkitt's lymphoma cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 2705-12.
71. Rozanski, C.H., et al., *Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells*. *J Exp Med*, 2011. **208**(7): p. 1435-46.
72. Naito, M., et al., *CD40L-Tri, a novel formulation of recombinant human CD40L that effectively activates B cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. **62**(2): p. 347-57.
73. Bishop, G.A., et al., *TRAF proteins in CD40 signaling*. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **597**: p. 131-51.
74. Craxton, A., et al., *Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes*. *Adv Immunol*, 1999. **73**: p. 79-152.
75. Haswell, L.E., M.J. Glennie, and A. Al-Shamkhani, *Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(10): p. 3094-100.
76. Dillon, S.R. and M.S. Schlissel, *Partial restoration of B cell development in Jak-3(-/-) mice achieved by co-expression of IgH and E(mu)-myc transgenes*. *Int Immunol*, 2002. **14**(8): p. 893-904.
77. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 2-17.
78. Gordon, J., et al., *Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling*. *J Immunol*, 1988. **140**(5): p. 1425-30.

79. Nagumo, H., et al., *CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6496-502.
80. Ducas, E., et al., *Estimation of the number of CD154 molecules in membrane extracts used as a source of CD40 stimulation of human B lymphocytes*. J Immunol Methods, 2009. **344**(2): p. 133-7.
81. Neron, S., et al., *Induction of LFA-1 independent human B cell proliferation and differentiation by binding of CD40 with its ligand*. Immunol Invest, 1996. **25**(1-2): p. 79-89.
82. Kuokkanen, E., V. Sustar, and P.K. Mattila, *Molecular control of B cell activation and immunological synapse formation*. Traffic, 2015. **16**(4): p. 311-26.
83. Yuseff, M.I., D. Lankar, and A.M. Lennon-Dumenil, *Dynamics of membrane trafficking downstream of B and T cell receptor engagement: impact on immune synapses*. Traffic, 2009. **10**(6): p. 629-36.
84. Mathur, R.K., et al., *Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 540-4.
85. Luft, T., et al., *Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1066-74.
86. Neron, S., et al., *Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction*. Immunology, 2005. **116**(4): p. 454-63.
87. Crotty, S., *A brief history of T cell help to B cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 185-9.
88. Bryant, V.L., et al., *Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8180-90.
89. Moens, L. and S.G. Tangye, *Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 65.
90. Conzelmann, M., et al., *IFN-gamma activated JAK1 shifts CD40-induced cytokine profiles in human antigen-presenting cells toward high IL-12p70 and low IL-10 production*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 2074-86.
91. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
92. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
93. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
94. Casanova, J.L., S.M. Holland, and L.D. Notarangelo, *Inborn errors of human JAKs and STATs*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 515-28.
95. Chen, E., L.M. Staudt, and A.R. Green, *Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma*. Immunity, 2012. **36**(4): p. 529-41.
96. O'Shea, J.J., S.M. Holland, and L.M. Staudt, *JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(2): p. 161-70.
97. Ding, B.B., et al., *Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1515-23.

98. Diehl, S.A., et al., *STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4805-15.
99. Avery, D.T., et al., *STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1784-93.
100. Nadeau, P.J., et al., *Modulation of CD40-activated B lymphocytes by N-acetylcysteine involves decreased phosphorylation of STAT3*. Mol Immunol, 2012. **49**(4): p. 582-92.
101. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.
102. Xu, D. and C.K. Qu, *Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4925-32.
103. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
104. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
105. Cunningham, A.F., et al., *Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6200-7.
106. Toellner, K.M., et al., *T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1193-204.
107. Anderson, S.M., et al., *New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets*. J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2103-14.
108. Kaji, T., et al., *Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory*. J Exp Med, 2012. **209**(11): p. 2079-97.
109. Tierens, A., et al., *Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion*. Blood, 1999. **93**(1): p. 226-34.
110. Tangye, S.G. and K.L. Good, *Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?* J Immunol, 2007. **179**(1): p. 13-9.
111. Toyama, H., et al., *Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 329-39.
112. Weill, J.C., S. Weller, and C.A. Reynaud, *Human marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 267-85.
113. Dorshkind, K. and E. Montecino-Rodriguez, *Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 213-9.
114. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *B-1 B cell development in the fetus and adult*. Immunity, 2012. **36**(1): p. 13-21.
115. Haas, K.M., et al., *B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 7-18.
116. Alugupalli, K.R., et al., *B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 379-90.
117. Fairfax, K.A., et al., *Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches*. Semin Immunol, 2008. **20**(1): p. 49-58.

118. Luther, S.A., et al., *Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B cell differentiation leading to virus-specific antibody production*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 551-62.
119. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
120. Griffin, D.O., N.E. Holodick, and T.L. Rothstein, *Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70*. J Exp Med, 2011. **208**(1): p. 67-80.
121. Qi, H., et al., *SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 764-9.
122. Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise, *Memory B cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 149-59.
123. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.
124. Taylor, J.J., K.A. Pape, and M.K. Jenkins, *A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 597-606.
125. McHeyzer-Williams, M., et al., *Molecular programming of B cell memory*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(1): p. 24-34.
126. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
127. Fecteau, J.F., G. Cote, and S. Neron, *A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3728-36.
128. Tomayko, M.M., et al., *Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7146-50.
129. Weller, S., et al., *CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1166-70.
130. Chan, T.D., et al., *Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3139-49.
131. Smith, K.G., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-8.
132. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Germinal centres and B cell lymphomagenesis*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 172-84.
133. Blink, E.J., et al., *Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 545-54.
134. Kerfoot, S.M., et al., *Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone*. Immunity, 2011. **34**(6): p. 947-60.
135. Kitano, M., et al., *Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity*. Immunity, 2011. **34**(6): p. 961-72.
136. Dominguez-Sola, D., et al., *The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1083-91.

137. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
138. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
139. Bannard, O., et al., *Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 912-24.
140. Victora, G.D., et al., *Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter*. Cell, 2010. **143**(4): p. 592-605.
141. Allen, C.D., et al., *Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 943-52.
142. Suh, W.K., *Life of T follicular helper cells*. Mol Cells, 2015. **38**(3): p. 195-201.
143. Shulman, Z., et al., *Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection*. Science, 2014. **345**(6200): p. 1058-62.
144. Hostager, B.S. and G.A. Bishop, *CD40-Mediated Activation of the NF-kappaB2 Pathway*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 376.
145. Yu, D. and C.G. Vinuesa, *The elusive identity of T follicular helper cells*. Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 377-83.
146. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
147. Liu, D., et al., *T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction*. Nature, 2015. **517**(7533): p. 214-8.
148. Calado, D.P., et al., *The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1092-100.
149. Saito, M., et al., *A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma*. Cancer Cell, 2007. **12**(3): p. 280-92.
150. Ochiai, K., et al., *Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 918-29.
151. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 160-71.
152. Nutt, S.L. and D.M. Tarlinton, *Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 472-7.
153. Zotos, D., et al., *IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 365-78.
154. Huang, C., et al., *Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation*. Blood, 2014. **123**(7): p. 1012-20.
155. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 172-83.
156. Ochiai, K., et al., *Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6*. Int Immunol, 2008. **20**(3): p. 453-60.
157. Kometani, K., et al., *Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 136-47.
158. Muto, A., et al., *Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch*. EMBO J, 2010. **29**(23): p. 4048-61.

159. Nutt, S.L., et al., *Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 556-62.
160. Medvedovic, J., et al., *Pax5: a master regulator of B cell development and leukemogenesis*. *Adv Immunol*, 2011. **111**: p. 179-206.
161. Cobaleda, C., W. Jochum, and M. Busslinger, *Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors*. *Nature*, 2007. **449**(7161): p. 473-7.
162. Nera, K.P., et al., *Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation*. *Immunity*, 2006. **24**(3): p. 283-93.
163. Maestre, L., et al., *Expression pattern of XBP1(S) in human B-cell lymphomas*. *Haematologica*, 2009. **94**(3): p. 419-22.
164. Carotta, S., et al., *The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation*. *J Exp Med*, 2014. **211**(11): p. 2169-81.
165. Todd, D.J., et al., *XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development*. *J Exp Med*, 2009. **206**(10): p. 2151-9.
166. Matthias, P. and A.G. Rolink, *Transcriptional networks in developing and mature B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(6): p. 497-508.
167. Lu, R., et al., *IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(14): p. 1703-8.
168. Willis, S.N., et al., *Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism*. *J Immunol*, 2014. **192**(7): p. 3200-6.
169. Sciammas, R., et al., *Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 225-36.
170. Klein, U., et al., *Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(7): p. 773-82.
171. Peperzak, V., et al., *Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(3): p. 290-7.
172. Gass, J.N., N.M. Gifford, and J.W. Brewer, *Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 49047-54.
173. Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1*. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
174. Taubenheim, N., et al., *High rate of antibody secretion is not integral to plasma cell differentiation as revealed by XBP-1 deficiency*. *J Immunol*, 2012. **189**(7): p. 3328-38.
175. Kallies, A., et al., *Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression*. *J Exp Med*, 2004. **200**(8): p. 967-77.
176. Soro, P.G., et al., *Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 611-7.
177. Shaffer, A.L., et al., *Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program*. *Immunity*, 2002. **17**(1): p. 51-62.

178. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 607-20.
179. Tellier, J., et al., *Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(3): p. 323-30.
180. Minnich, M., et al., *Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(3): p. 331-43.
181. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 1-22.
182. North, B., A. Lehmann, and R.L. Dunbrack, Jr., *A new clustering of antibody CDR loop conformations*. *J Mol Biol*, 2011. **406**(2): p. 228-56.
183. Nikoloudis, D., J.E. Pitts, and J.W. Saldanha, *A complete, multi-level conformational clustering of antibody complementarity-determining regions*. *PeerJ*, 2014. **2**: p. e456.
184. Chaudhuri, J. and F.W. Alt, *Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(7): p. 541-52.
185. Keim, C., et al., *Regulation of AID, the B-cell genome mutator*. *Genes Dev*, 2013. **27**(1): p. 1-17.
186. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation*. *Immunity*, 1996. **4**(3): p. 241-50.
187. Cattoretti, G., et al., *Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3967-75.
188. Smith, K.G., et al., *The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response*. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 2996-3006.
189. Shlomchik, M.J. and F. Weisel, *Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells*. *Immunol Rev*, 2012. **247**(1): p. 52-63.
190. Dorner, T. and A. Radbruch, *Selecting B cells and plasma cells to memory*. *J Exp Med*, 2005. **201**(4): p. 497-9.
191. Phan, T.G., et al., *High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment*. *J Exp Med*, 2006. **203**(11): p. 2419-24.
192. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 137-48.
193. Takahashi, Y., H. Ohta, and T. Takemori, *Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire*. *Immunity*, 2001. **14**(2): p. 181-92.
194. Good-Jacobson, K.L., et al., *PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(6): p. 535-42.
195. Ademokun A.A., D.-W.D., *Immune Responses: Primary and Secondary*, in *Encyclopedia of Life Sciences*. 2010, John Wiley & Sons.
196. Klein, U., et al., *Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2639-44.
197. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 54-60.

198. Berkowska, M.A., et al., *Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways*. *Blood*, 2011. **118**(8): p. 2150-8.
199. Tarlinton, D. and K. Good-Jacobson, *Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility*. *Science*, 2013. **341**(6151): p. 1205-11.
200. Tarlinton, D., *B-cell memory: are subsets necessary?* *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 785-90.
201. Kuo, T.C., et al., *Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 819-30.
202. Zotos, D. and D.M. Tarlinton, *Determining germinal centre B cell fate*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(6): p. 281-8.
203. Clybouw, C., et al., *Regulation of memory B-cell survival by the BH3-only protein Puma*. *Blood*, 2011. **118**(15): p. 4120-8.
204. Fischer, S.F., et al., *Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 3978-84.
205. Chen, M., et al., *Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection*. *Nat Med*, 2014. **20**(5): p. 503-10.
206. Agematsu, K., et al., *CD27: a memory B-cell marker*. *Immunol Today*, 2000. **21**(5): p. 204-6.
207. Bar-Or, A., et al., *Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state*. *J Immunol*, 2001. **167**(10): p. 5669-77.
208. Good, K.L., D.T. Avery, and S.G. Tangye, *Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 890-901.
209. Yamada, K., et al., *Expression of cytokine receptors on follicular dendritic cells*. *Blood*, 1997. **90**(12): p. 4832-41.
210. Dogan, I., et al., *Multiple layers of B cell memory with different effector functions*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1292-9.
211. Wang, N.S., et al., *Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and RORalpha*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(6): p. 604-11.
212. Mohr, E., et al., *IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(40): p. 17292-7.
213. Coutelier, J.P., et al., *IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections*. *J Exp Med*, 1987. **165**(1): p. 64-9.
214. Pape, K.A., et al., *Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response*. *Science*, 2011. **331**(6021): p. 1203-7.
215. Engels, N., et al., *Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(9): p. 1018-25.
216. Liu, W., et al., *Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling*. *Immunity*, 2010. **32**(6): p. 778-89.

217. Zuccarino-Catania, G.V., et al., *CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype*. Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 631-7.
218. Maruyama, M., K.P. Lam, and K. Rajewsky, *Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen*. Nature, 2000. **407**(6804): p. 636-42.
219. Vieira, P. and K. Rajewsky, *Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help*. Int Immunol, 1990. **2**(6): p. 487-94.
220. Amanna, I.J. and M.K. Slifka, *Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 125-38.
221. Aiba, Y., et al., *Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12192-7.
222. Onodera, T., et al., *Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2485-90.
223. Liu, Y.J., S. Oldfield, and I.C. MacLennan, *Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones*. Eur J Immunol, 1988. **18**(3): p. 355-62.
224. Ehrhardt, G.R., et al., *Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 783-91.
225. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
226. Hibi, T. and H.M. Dosch, *Limiting dilution analysis of the B cell compartment in human bone marrow*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 139-45.
227. Cenci, S. and R. Sitia, *Managing and exploiting stress in the antibody factory*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3652-7.
228. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
229. Yu, X., et al., *Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 532-6.
230. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Increased survival is a selective feature of human circulating antigen-induced plasma cells synthesizing high-affinity antibodies*. Blood, 2008. **111**(2): p. 741-9.
231. Fink, K., *Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 78.
232. Jourdan, M., 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): p. 5173-81.
233. Engel, P., et al., *Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 39-50.
234. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao, *CD27 and CD70 in T cell and B cell activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 275-81.
235. Qian, Y., 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**: p. S69-82.
236. Trowbridge, I.S. and M.L. Thomas, *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 85-116.
237. Malavasi, F., et al., *Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology.* Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 841-86.
238. Partida-Sanchez, S., et al., *Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo.* Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1209-16.
239. O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus, *CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms.* Am J Clin Pathol, 2004. **121**(2): p. 254-63.
240. Caraux, A., et al., *Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells.* Haematologica, 2010. **95**(6): p. 1016-20.
241. Kharabi Masouleh, B., et al., *Role of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) in delayed-type hypersensitivity.* J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4985-93.
242. Arpin, C., et al., *Human peripheral B cell development. IgM-IgD+CD38+ hypermutated germinal center centroblasts preferentially express Ig lambda light chain and have undergone mu-to-delta switch.* Ann N Y Acad Sci, 1997. **815**: p. 193-8.
243. Jacobi, A.M. and T. Dorner, *Current aspects of anti-CD20 therapy in rheumatoid arthritis.* Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(3): p. 316-21.
244. Mei, H.E., et al., *Phenotypic analysis of B-cells and plasma cells.* Methods Mol Med, 2007. **136**: p. 3-18.
245. De Vos, J., et al., *Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells.* Immunol Rev, 2006. **210**: p. 86-104.
246. Dwyer, K.M., et al., *CD39 and control of cellular immune responses.* Purinergic Signal, 2007. **3**(1-2): p. 171-80.
247. Perez-Andres, M., et al., *The nature of circulating CD27+CD43+ B cells.* J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2565-6.
248. Wrammert, J., et al., *Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus.* Nature, 2008. **453**(7195): p. 667-71.
249. Muehlinghaus, G., et al., *Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells.* Blood, 2005. **105**(10): p. 3965-71.
250. Pereira, J.P., et al., *EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle.* Nature, 2009. **460**(7259): p. 1122-6.
251. Liu, C., et al., *Oxysterols direct B-cell migration through EBI2.* Nature, 2011. **475**(7357): p. 519-23.
252. Kabashima, K., et al., *Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism.* J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2683-90.
253. Kometani, K. and T. Kurosaki, *Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells.* Curr Opin Immunol, 2015. **33**: p. 64-9.

254. Levy, M., et al., *The majority of "natural" immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes*. Eur J Immunol, 1987. **17**(6): p. 849-54.
255. Benckert, J., et al., *The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific*. J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1946-55.
256. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
257. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *The stressful road to antibody secretion*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 310-1.
258. Pelletier, N., et al., *The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1340-7.
259. Szegezdi, E., et al., *ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(4): p. 1406-11.
260. Cenci, S., et al., *Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1104-13.
261. Auner, H.W., et al., *The life span of short-lived plasma cells is partly determined by a block on activation of apoptotic caspases acting in combination with endoplasmic reticulum stress*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3445-55.
262. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
263. Terstappen, L.W., et al., *Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry*. Blood, 1990. **76**(9): p. 1739-47.
264. Slifka, M.K., M. Matloubian, and R. Ahmed, *Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1895-902.
265. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
266. Bortnick, A. and D. Allman, *What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens*. J Immunol, 2013. **190**(12): p. 5913-8.
267. Mahtouk, K., et al., *Growth factors in multiple myeloma: a comprehensive analysis of their expression in tumor cells and bone marrow environment using Affymetrix microarrays*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 198.
268. Tangye, S.G., *Staying alive: regulation of plasma cell survival*. Trends Immunol, 2011. **32**(12): p. 595-602.
269. Jourdan, M., et al., *IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors*. Leukemia, 2014. **28**(8): p. 1647-56.
270. Evans, S.S., E.A. Repasky, and D.T. Fisher, *Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 335-49.
271. Belnoue, E., et al., *Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1283-91.

272. Mesin, L., et al., *Long-lived plasma cells from human small intestine biopsies secrete immunoglobulins for many weeks in vitro*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 2867-74.
273. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 91-8.
274. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
275. Cortes, M. and K. Georgopoulos, *Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 209-19.
276. Hart, G.T., et al., *Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 716-21.
277. Good-Jacobson, K.L., et al., *c-Myb is required for plasma cell migration to bone marrow after immunization or infection*. J Exp Med, 2015. **212**(7): p. 1001-9.
278. Nie, Y., et al., *The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity*. J Exp Med, 2004. **200**(9): p. 1145-56.
279. Sze, D.M., et al., *Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival*. J Exp Med, 2000. **192**(6): p. 813-21.
280. Chu, V.T. and C. Berek, *The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow*. Immunol Rev, 2013. **251**(1): p. 177-88.
281. Tarte, K., et al., *Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1113-22.
282. Medina, F., C. Segundo, and J.A. Brieva, *Purification of human tonsil plasma cells: pre-enrichment step by immunomagnetic selection of CD31(+) cells*. Cytometry, 2000. **39**(3): p. 231-4.
283. Nutt, S.L., et al., *The genetic network controlling plasma cell differentiation*. Semin Immunol, 2011. **23**(5): p. 341-9.
284. Shi, W., et al., *Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 663-73.
285. Nojima, T., et al., *In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 465.
286. Maiga, R.I., et al., *Human CD38^{hi}CD138(+) plasma cells can be generated in vitro from CD40-activated switched-memory B lymphocytes*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 635108.
287. Matsuda, Y., et al., *A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naive (CD27(-)) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen*. Cell Immunol, 2015. **295**(2): p. 127-36.
288. Avery, D.T., et al., *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 286-97.
289. Cocco, M., et al., *In Vitro Generation of Long-lived Human Plasma Cells*. J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5773-5785.

290. Lord, B.I., N.G. Testa, and J.H. Hendry, *The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur*. Blood, 1975. **46**(1): p. 65-72.
291. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
292. Narva, E., et al., *Continuous hypoxic culturing of human embryonic stem cells enhances SSEA-3 and MYC levels*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78847.
293. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
294. Smith, J.N. and L.M. Calvi, *Concise review: Current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells*. Stem Cells, 2013. **31**(6): p. 1044-50.
295. Tokoyoda, K., et al., *Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2095-9.
296. Tokoyoda, K., et al., *Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 721-30.
297. Tokoyoda, K., et al., *Organization of immunological memory by bone marrow stroma*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 193-200.
298. Minges Wols, H.A., et al., *The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4213-21.
299. Van Driel, M., et al., *CD44 variant isoforms are involved in plasma cell adhesion to bone marrow stromal cells*. Leukemia, 2002. **16**(1): p. 135-43.
300. Weekes, C.D., C.A. Kuszynski, and J.G. Sharp, *VLA-4 mediated adhesion to bone marrow stromal cells confers chemoresistance to adherent lymphoma cells*. Leuk Lymphoma, 2001. **40**(5-6): p. 631-45.
301. Sackstein, R., *The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm*. Curr Opin Hematol, 2005. **12**(6): p. 444-50.
302. Mythreye, K. and G.C. Blobe, *Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion*. Cell Signal, 2009. **21**(11): p. 1548-58.
303. DiLillo, D.J., et al., *Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 361-71.
304. Hauser, A.E., et al., *Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1277-82.
305. Cassese, G., et al., *Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1684-90.
306. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 45-56.
307. Chu, V.T., et al., *Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 151-9.
308. Kimura, K., et al., *The basal plasma histamine level and eosinophil count in allergic and non-allergic patients*. Fukuoka Igaku Zasshi, 1999. **90**(12): p. 457-63.
309. Sampson, A.P., *The role of eosinophils and neutrophils in inflammation*. Clin Exp Allergy, 2000. **30 Suppl 1**: p. 22-7.
310. Ohnmacht, C., et al., *Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4766-74.

311. Chu, V.T., et al., *Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis*. *Immunity*, 2014. **40**(4): p. 582-93.
312. Zehentmeier, S., et al., *Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(8): p. 2306-17.
313. Winter, O., et al., *Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow*. *Blood*, 2010. **116**(11): p. 1867-75.
314. Rodriguez Gomez, M., et al., *Basophils support the survival of plasma cells in mice*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7180-5.
315. Jez, M., et al., *Concise review: the role of oxygen in hematopoietic stem cell physiology*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(9): p. 1999-2005.
316. Eliasson, P. and J.I. Jonsson, *The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be*. *J Cell Physiol*, 2010. **222**(1): p. 17-22.
317. Sugiyama, T. and T. Nagasawa, *Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012. **11**(3): p. 201-6.
318. Parmar, K., et al., *Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(13): p. 5431-6.
319. Gnaiger, E., *Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **543**: p. 39-55.
320. Ivanovic, Z., *Respect the anaerobic nature of stem cells to exploit their potential in regenerative medicine*. *Regen Med*, 2013. **8**(6): p. 677-80.
321. Brahim-Horn, M.C. and J. Pouyssegur, *Oxygen, a source of life and stress*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(19): p. 3582-91.
322. Roy, S., et al., *Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1)*. *Circ Res*, 2003. **92**(3): p. 264-71.
323. Steeg, R., *Understanding Dissolved Oxygen in Cell Culture*. 2014.
324. Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi, and A. Quinones-Hinojosa, *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(2): p. 150-61.
325. Nombela-Arrieta, C., et al., *Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(5): p. 533-43.
326. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. *J Cell Physiol*, 2009. **219**(2): p. 271-5.
327. Spencer, J.A., et al., *Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals*. *Nature*, 2014. **508**(7495): p. 269-73.
328. Ivanovic, Z., et al., *Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%)*. *Stem Cells*, 2004. **22**(5): p. 716-24.
329. Eliasson, P., et al., *Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture*. *Exp Hematol*, 2010. **38**(4): p. 301-310 e2.
330. Guitart, A.V., et al., *Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen*. *Exp Hematol*, 2010. **38**(10): p. 847-51.

331. Packer, L. and K. Fuehr, *Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells*. *Nature*, 1977. **267**(5610): p. 423-5.
332. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
333. Bertolotti, M., R. Sitia, and A. Rubartelli, *On the redox control of B lymphocyte differentiation and function*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **16**(10): p. 1139-49.
334. Goda, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 359-69.
335. Ziello, J.E., I.S. Jovin, and Y. Huang, *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia*. *Yale J Biol Med*, 2007. **80**(2): p. 51-60.
336. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
337. Cavadas, M.A., L.K. Nguyen, and A. Cheong, *Hypoxia-inducible factor (HIF) network: insights from mathematical models*. *Cell Commun Signal*, 2013. **11**(1): p. 42.
338. Benita, Y., et al., *An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(14): p. 4587-602.
339. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
340. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(5): p. 343-54.
341. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. *Cell Metab*, 2006. **3**(3): p. 177-85.
342. Michiels, C., *Physiological and pathological responses to hypoxia*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(6): p. 1875-82.
343. Cho, Y.S., et al., *HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1)*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(2): p. 323-33.
344. Buttgerit, F. and M.D. Brand, *A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells*. *Biochem J*, 1995. **312 (Pt 1)**: p. 163-7.
345. Kertesz, N., et al., *The role of erythropoietin in regulating angiogenesis*. *Dev Biol*, 2004. **276**(1): p. 101-10.
346. Patel, J., et al., *Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development*. *Placenta*, 2010. **31**(11): p. 951-7.
347. Trachootham, D., et al., *Redox regulation of cell survival*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(8): p. 1343-74.
348. Bayne, A.C., et al., *Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic Drosophila*. *Biochem J*, 2005. **391**(Pt 2): p. 277-84.
349. Held, P., *An introduction to Reactive Oxygen Species*. White Paper, 2015.
350. Bleier, L. and S. Drose, *Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1827**(11-12): p. 1320-31.

351. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
352. Quinlan, C.L., et al., *Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions*. J Biol Chem, 2012. **287**(32): p. 27255-64.
353. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
354. Fransen, M., et al., *Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9): p. 1363-73.
355. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
356. Gross, E., et al., *Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(2): p. 299-304.
357. Masciarelli, S. and R. Sitia, *Building and operating an antibody factory: redox control during B to plasma cell terminal differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 578-88.
358. Pillai, S., C. Oresajo, and J. Hayward, *Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review*. Int J Cosmet Sci, 2005. **27**(1): p. 17-34.
359. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang, *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(7): p. 579-91.
360. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *Redox signaling in hypertension*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 247-58.
361. Shukla, V., S.K. Mishra, and H.C. Pant, *Oxidative stress in neurodegeneration*. Adv Pharmacol Sci, 2011. **2011**: p. 572634.
362. Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 333-44.
363. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
364. Vene, R., et al., *Redox remodeling allows and controls B-cell activation and differentiation*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(8): p. 1145-55.
365. Bulaj, G., T. Kortemme, and D.P. Goldenberg, *Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides*. Biochemistry, 1998. **37**(25): p. 8965-72.
366. Groeger, G., C. Quiney, and T.G. Cotter, *Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2655-71.
367. Reddie, K.G. and K.S. Carroll, *Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation*. Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(6): p. 746-54.
368. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
369. Sonntag, v., *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, 1987.
370. Mylonas, C. and D. Kouretas, *Lipid peroxidation and tissue damage*. In Vivo, 1999. **13**(3): p. 295-309.
371. Finkel, T., *Oxidant signals and oxidative stress*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 247-54.

372. Kohchi, C., et al., *ROS and innate immunity*. Anticancer Res, 2009. **29**(3): p. 817-21.
373. Ameyar, M., M. Wisniewska, and J.B. Weitzman, *A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against*. Biochimie, 2003. **85**(8): p. 747-52.
374. Gerondakis, S. and U. Siebenlist, *Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000182.
375. Capasso, M., et al., *HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species*. Nat Immunol, 2010. **11**(3): p. 265-72.
376. Tasuku Honjo, F.W.A.M.L., *Molecular Biology of B cells*, ed. M.R.a.A. Radbruch. 2004: Elsevier Academic press.
377. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
378. Bertolotti, M., et al., *B- to plasma-cell terminal differentiation entails oxidative stress and profound reshaping of the antioxidant responses*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(8): p. 1133-44.
379. Conrad, M. and H. Sato, *The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond*. Amino Acids, 2012. **42**(1): p. 231-46.
380. Ottaviano, F.G., D.E. Handy, and J. Loscalzo, *Redox regulation in the extracellular environment*. Circ J, 2008. **72**(1): p. 1-16.
381. Pekmezci, D., *Vitamin E and immunity*. Vitam Horm, 2011. **86**: p. 179-215.
382. Crump, K.E., et al., *The reversible formation of cysteine sulfenic acid promotes B-cell activation and proliferation*. Eur J Immunol, 2012. **42**(8): p. 2152-64.
383. Fedyk, E.R., et al., *Regulation of B cell tolerance and triggering by immune complexes*. Chem Immunol, 1994. **58**: p. 67-91.
384. Lee, J.R., *Reactive oxygen species play roles on B cell surface receptor CD40-mediated proximal and distal signaling events: effects of an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine treatment*. Mol Cell Biochem, 2003. **252**(1-2): p. 1-7.
385. Castellani, P., et al., *The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2419-25.
386. Carta, S., et al., *DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 549-55.
387. van Anken, E., et al., *Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 243-253.
388. Polikowsky, H.G., et al., *Cutting Edge: Redox Signaling Hypersensitivity Distinguishes Human Germinal Center B Cells*. J Immunol, 2015.
389. Jang, K.J., et al., *Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6750.
390. Banchereau, J. and F. Rousset, *Growing human B lymphocytes in the CD40 system*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 678-9.
391. Kehry, M.R., L.C. Yamashita, and P.D. Hodgkin, *B-cell proliferation and differentiation mediated by Th-cell membranes and lymphokines*. Res Immunol, 1990. **141**(4-5): p. 421-3.

392. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
393. Garcia-Marquez, M.A., et al., *A multimerized form of recombinant human CD40 ligand supports long-term activation and proliferation of B cells*. Cytotherapy, 2014. **16**(11): p. 1537-44.
394. Fecteau, J.F. and S. Neron, *CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4621-9.
395. Néron, S., A. Roy, and N. Dumont, *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human switched-memory B lymphocytes*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51946.
396. Neron, S., et al., *Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium*. J Immunol Methods, 2011. **371**(1-2): p. 61-9.
397. Néron S., C.G., Dumont N., Roy A., Fecteau J.F. and McNeil ME., *Contribution of CD40-activated Naïve B lymphocytes in the Modulation of CD27⁺ Memory B Cell Growth and Differentiation*, in *Advances in Medicine and Biology*, L.V. Berhardt, Editor. 2011. p. 143-167.
398. Fecteau, J.F., A. Roy, and S. Neron, *Peripheral blood CD27⁺ IgG⁺ B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e353-65.
399. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. Blood, 2011. **117**(2): p. 530-41.
400. Yang, X., et al., *T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88441.
401. Peng, Y., et al., *Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5⁺ regulatory B cells producing interleukin 10*. Leukemia, 2015. **29**(3): p. 636-46.
402. Fremd, C., et al., *B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients*. Oncoimmunology, 2013. **2**(7): p. e25443.
403. Erdag, G., et al., *Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma*. Cancer Res, 2012. **72**(5): p. 1070-80.
404. Berntsson, J., et al., *Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2016. **139**(5): p. 1129-39.
405. Nielsen, J.S., et al., *CD20⁺ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27-memory phenotype and together with CD8⁺ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3281-92.
406. Linnebacher, M., *Tumor-infiltrating B cells come into vogue*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(1): p. 8-11.
407. DiLillo, D.J., K. Yanaba, and T.F. Tedder, *B cells are required for optimal CD4⁺ and CD8⁺ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 4006-16.
408. Garbe, Y., U. Klier, and M. Linnebacher, *Semiallogenic fusions of MSI(+) tumor cells and activated B cells induce MSI-specific T cell responses*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 410.

409. Lapointe, R., et al., *CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(11): p. 2836-43.
410. Nelson, A.L., E. Dhimolea, and J.M. Reichert, *Development trends for human monoclonal antibody therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(10): p. 767-74.
411. Reichert, J.M., *Monoclonal antibodies as innovative therapeutics*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008. **9**(6): p. 423-30.
412. Foltz, I.N., M. Karow, and S.M. Wasserman, *Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know*. *Circulation*, 2013. **127**(22): p. 2222-30.
413. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*. *MAbs*, 2015. **7**(1): p. 9-14.
414. Young, J.A., et al., *Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016. **22**(2): p. 359-70.
415. van Burik, J.A., et al., *Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(12): p. 1487-98.
416. Wheeler, M.L. and A.L. Defranco, *Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation*. *J Immunol*, 2012. **189**(9): p. 4405-16.
417. Halliwell, B., *Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls*. *Biomed J*, 2014. **37**(3): p. 99-105.
418. Neron, S., A. Roy, and N. Dumont, *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human switched-memory B lymphocytes*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51946.
419. Fecteau, J.F., A. Roy, and S. Neron, *Peripheral blood CD27(+) IgG(+) B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction*. *Immunol*, 2009. **128**(1pt2): p. e353-e365.
420. Stewart, M., et al., *Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma*. *Histopathology*, 2002. **40**(3): p. 253-60.
421. Deenick, E.K., et al., *Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells*. *J Exp Med*, 2013. **210**(12): p. 2739-53.
422. Rodriguez-Bayona, B., et al., *STAT-3 activation by differential cytokines is critical for human in vivo-generated plasma cell survival and Ig secretion*. *J Immunol*, 2013. **191**(10): p. 4996-5004.
423. Papin, J.A. and B.O. Palsson, *The JAK-STAT signaling network in the human B-cell: an extreme signaling pathway analysis*. *Biophys J*, 2004. **87**(1): p. 37-46.
424. Arens, R., et al., *Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production*. *J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3901-8.
425. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. *Int Immunol*, 2010. **22**(5): p. 347-52.

426. Maeda, K., et al., *IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production*. *Blood*, 2010. **115**(23): p. 4699-706.
427. Medina, F., et al., *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**(6): p. 2154-61.
428. Davey, A.M. and S.K. Pierce, *Intrinsic differences in the initiation of B cell receptor signaling favor responses of human IgG(+) memory B cells over IgM(+) naive B cells*. *J Immunol*, 2012. **188**(7): p. 3332-41.
429. Werneburg, B.G., et al., *Molecular characterization of CD40 signaling intermediates*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(46): p. 43334-42.
430. Deregibus, M.C., et al., *CD40-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates endothelial cell survival and in vitro angiogenesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18008-14.
431. Gelbmann, C.M., et al., *Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts*. *Gut*, 2003. **52**(10): p. 1448-56.
432. Ha, Y.J., H.J. Seul, and J.R. Lee, *Ligation of CD40 receptor in human B lymphocytes triggers the 5-lipoxygenase pathway to produce reactive oxygen species and activate p38 MAPK*. *Exp Mol Med*, 2011. **43**(2): p. 101-10.
433. Lee, R.L., J. Westendorf, and M.R. Gold, *Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4*. *J Cell Commun Signal*, 2007. **1**(1): p. 33-43.
434. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species*. *J Cell Biol*, 2011. **194**(1): p. 7-15.
435. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(10): p. 813-24.
436. Banerjee, R., *Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(7): p. 4397-402.
437. Tohyama, Y., T. Takano, and H. Yamamura, *B cell responses to oxidative stress*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(8): p. 835-9.
438. Francois E. Mercier, C.R., David T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. *Nature immunology*, 2012. **12**: p. 49
439. Gough, D.R. and T.G. Cotter, *Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e213.
440. Cai, Z. and L.J. Yan, *Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health*. *J Biochem Pharmacol Res*, 2013. **1**(1): p. 15-26.
441. Truong, T.H. and K.S. Carroll, *Redox regulation of protein kinases*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013. **48**(4): p. 332-56.
442. Shimojo, Y., et al., *Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2013. **30**(2): p. 143-54.
443. Ahmad, N. and H. Mukhtar, *Antioxidants meet molecular targets for cancer prevention and therapeutics*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(2): p. 85-8.

444. Rosati, E., et al., *Apoptosis of human primary B lymphocytes is inhibited by N-acetyl-L-cysteine*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 152-61.
445. Fornek, J.L., et al., *Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells*. Blood, 2006. **107**(3): p. 1085-91.
446. Hutchins, A.P., et al., *Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2155-70.
447. Li, L. and P.E. Shaw, *A STAT3 dimer formed by inter-chain disulphide bridging during oxidative stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(3): p. 1005-11.
448. Thomis, D.C., et al., *Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3*. Science, 1995. **270**(5237): p. 794-7.
449. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.
450. Neron, S., et al., *Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells*. Transfusion, 2007. **47**(6): p. 1042-9.
451. Krutzik, P.O., et al., *Fluorescent cell barcoding for multiplex flow cytometry*. Curr Protoc Cytom, 2011. **Chapter 6**: p. Unit 6 31.
452. Simard, C., M. Cloutier, and S. Neron, *Feasibility study: Phosphospecific flow cytometry enabling rapid functional analysis of bone marrow samples from patients with multiple myeloma*. Cytometry B Clin Cytom, 2013.
453. Sasaki, Y., et al., *Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells*. EMBO J, 2013. **32**(18): p. 2463-76.
454. Alexander, W.S., *Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 410-6.
455. Ng, I.H., et al., *Oxidative stress impairs multiple regulatory events to drive persistent cytokine-stimulated STAT3 phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1843**(3): p. 483-494.
456. Haan, S., et al., *Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31972-9.
457. Simon, A.R., et al., *Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. C1640-52.
458. Berglund, L.J., et al., *IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts*. Blood, 2013. **122**(24): p. 3940-50.
459. Raftos, J.E., et al., *Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(9): p. 1698-706.
460. Kojer, K., et al., *Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state*. EMBO J, 2012. **31**(14): p. 3169-82.
461. Xie, Y., et al., *S-glutathionylation impairs signal transducer and activator of transcription 3 activation and signaling*. Endocrinology, 2009. **150**(3): p. 1122-31.
462. Smith, J.K., et al., *Identification of a redox-sensitive switch within the JAK2 catalytic domain*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(6): p. 1101-10.

463. Ullian, M.E., et al., *N-acetylcysteine decreases angiotensin II receptor binding in vascular smooth muscle cells*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(8): p. 2346-53.
464. Metcalfe, C., P. Cresswell, and A.N. Barclay, *Interleukin-2 signalling is modulated by a labile disulfide bond in the CD132 chain of its receptor*. Open Biol, 2012. **2**(1): p. 110036.
465. Curbo, S., et al., *Regulation of interleukin-4 signaling by extracellular reduction of intramolecular disulfides*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1272-7.
466. Baker, S.J., S.G. Rane, and E.P. Reddy, *Hematopoietic cytokine receptor signaling*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6724-37.
467. Shaw, M.H., et al., *Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN-gamma-dependent IL-10 reactivation*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7263-71.
468. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.
469. Ding, B.B., et al., *IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1827-36.
470. Hanissian, S.H. and R.S. Geha, *Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 379-87.
471. Iijima, N., et al., *Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants*. Immunology, 2003. **110**(2): p. 197-205.
472. Duechting, A., et al., *Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7942-52.
473. Siveen, K.S., et al., *Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2014.
474. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 140-59.
475. Tarlinton, D., et al., *Plasma cell differentiation and survival*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 162-9.
476. Lacotte, S., et al., *Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58140.
477. Kawano, M.M., et al., *Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis*. Blood, 1995. **85**(2): p. 487-94.
478. Wang, L.D. and A.J. Wagers, *Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(10): p. 643-55.
479. Jego, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.
480. Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Ann Rev Immunol, 2003. **21**: p. 205-30.
481. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu. Rev. Immunol., 1994. **12**: p. 881-922.

482. Néron, S., et al., *Differential responses of human B-lymphocyte subpopulations to graded levels of CD40-CD154 interaction*. Immunol, 2005. **116**(4): p. 454-463.
483. Takubo, K., et al., *Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 391-402.
484. Nolte, M.A., et al., *Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology*. Immunological Reviews, 2009. **229**: p. 216-231.
485. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao, *CD27 and CD70 in T cell and B cell activation*. Curr. Opin. Immunol., 2005. **17**(3): p. 275-81.
486. Agematsu, K., et al., *Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction*. Leuk Lymphoma, 1999. **35**(3-4): p. 219-25.
487. Kobata, T., et al., *CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1995. **92**(24): p. 11249-53.
488. Nagumo, H. and K. Agematsu, *Synergistic augmentative effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interactions on B-cell immunoglobulin synthesis*. Immunol., 1998. **94**(3): p. 388-94.
489. Morimoto, S., et al., *CD134L engagement enhances human B cell Ig production: CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L interactions coordinately regulate T cell-dependent B cell responses*. Journal of Immunology, 2000. **164**(8): p. 4097-4104.
490. Pelletier, N., et al., *The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway*. Journal of Immunology, 2006. **176**(3): p. 1340-1347.
491. Chu, V., et al., *The long-term survival of plasma cells*. Scand J Immunol, 2011.
492. Avery, D.T., et al., *Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage*. Journal of Immunology, 2005. **174**(7): p. 4034-4042.
493. Huggins, J., et al., *CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27-naive human B cells*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1611-9.
494. De Vos, J., et al., *Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells*. Immunological Reviews, 2006. **210**: p. 86-104.
495. Elgueta, R., V.C. de Vries, and R.J. Noelle, *The immortality of humoral immunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 139-50.
496. Simsek, T., et al., *The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 380-90.
497. Joo, H., et al., *Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation*. J Exp Med, 2012. **209**(7): p. 1335-48.
498. Suyani, E., et al., *Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma*. Ann Hematol, 2013. **92**(5): p. 669-77.
499. Gelfand, E.W., H.D. Ochs, and W.T. Shearer, *Controversies in IgG replacement therapy in patients with antibody deficiency diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 1001-5.
500. Hiepe, F., et al., *Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(3): p. 170-8.
501. Néron, S., et al., *Induction of LFA-1 independent human B cell proliferation and differentiation by binding of CD40 with its ligand*. Immunol Invest, 1996. **25**(1-2): p. 79-89.

502. Néron, S., et al., *B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase*. *Int Immunol*, 2006. **18**(2): p. 375-87.
503. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
504. Jacquot, S., et al., *CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling*. *J Immunol*, 1997. **159**(6): p. 2652-7.
505. Maecker, H.T., J.P. McCoy, and R. Nussenblatt, *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 191-200.
506. van de Veen, W., et al., *IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **131**(4): p. 1204-12.
507. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31 interactions activate genetic pathways leading to proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells*. *Mol Med*, 2010. **16**(3-4): p. 87-91.
508. Omana-Zapata, I., et al., *Performance of a novel BD Stem Cell Enumeration Kit on two flow cytometry systems*. *Int J Lab Hematol*, 2013. **35**(4): p. 393-9.
509. Vestheim, A.C., et al., *Different glycosylation pattern of human IgG1 and IgG3 antibodies isolated from transiently as well as permanently transfected cell lines*. *Scand J Immunol*, 2013. **77**(5): p. 419-28.
510. Shima, T., et al., *A novel filtration method for cord blood processing using a polyester fabric filter*. *Int J Lab Hematol*, 2013. **35**(4): p. 436-46.
511. Mainou-Fowler, T., et al., *CD31 density is a novel risk factor for patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Int J Oncol*, 2008. **33**(1): p. 169-74.
512. Hong, S., et al., *Antibody-Secreting Cells with a Phenotype of Ki-67low, CD138high, CD31high, and CD38high Secrete Nonspecific IgM during Primary Hepatitis A Virus Infection*. *J Immunol*, 2013. **191**(1): p. 127-34.
513. Lanio, N., et al., *Alterations of naive and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients*. *Transpl Int*, 2013. **26**(8): p. 800-12.
514. Gonzalez-Garcia, I., et al., *Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 4042-50.
515. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes*. *Chem Immunol*, 2000. **75**: p. 99-120.
516. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(9): p. 880-5.
517. Belnoue, E., et al., *APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2755-64.
518. Benson, M.J., et al., *Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL*. *J Immunol*, 2008. **180**(6): p. 3655-9.

519. Nagasawa, T., *The chemokine CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte development in the bone marrow niche*. Adv Exp Med Biol, 2007. **602**: p. 69-75.
520. Winkler, I.G., et al., *Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches*. Blood, 2010. **116**(3): p. 375-85.
521. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
522. Chu, V.T. and C. Berek, *Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival*. Eur J Immunol, 2012. **42**(1): p. 130-7.
523. Amable, P.R., et al., *Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(2): p. 53.
524. Schajnovitz, A., et al., *CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 391-8.
525. Calvi, L.M. and D.C. Link, *The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease*. Blood, 2015. **126**(22): p. 2443-51.
526. Cazac, B.B. and J. Roes, *TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 443-51.
527. Gros, M.J., P. Naquet, and R.R. Guinamard, *Cell intrinsic TGF-beta 1 regulation of B cells*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 8153-8.
528. Harvey, A., et al., *Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79283.
529. De Grandis, M., et al., *Adhesion receptors involved in HSC and early-B cell interactions with bone marrow microenvironment*. Cell Mol Life Sci, 2015.
530. Franquesa, M., et al., *Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 212.
531. Budoni, M., et al., *The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles*. Cell Transplant, 2013. **22**(2): p. 369-79.
532. Krampera, M., et al., *Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 386-98.
533. Conforti, A., et al., *Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(21): p. 2591-9.
534. Rasmusson, I., et al., *Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells*. Scand J Immunol, 2007. **65**(4): p. 336-43.
535. Sousa, B.R., et al., *Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 43-77.
536. Roy, A., et al., *Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(6): p. 873-80.

537. Qiu, P., et al., *Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(10): p. 886-91.
538. Muench, M.O., et al., *Requirement of retinoids for the expression of CD38 on human hematopoietic progenitors in vitro*. Cytotherapy, 1999. **1**(6): p. 455-68.
539. Ramirez, P., et al., *BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2009. **114**(7): p. 1340-3.
540. Traggiai, E., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 562-9.
541. Bagnara, D., et al., *A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans*. J Immunol, 2015. **195**(8): p. 3716-24.
542. Bonnaure, G. and S. Neron, *N-acetyl cysteine regulates the phosphorylation of JAK proteins following CD40-activation of human memory B cells*. Mol Immunol, 2014. **62**(1): p. 209-18.
543. Kyurkchiev, D., et al., *Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(5): p. 552-70.
544. Pricola, K.L., et al., *Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism*. J Cell Biochem, 2009. **108**(3): p. 577-88.
545. Liu, X., et al., *SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion*. Protein Cell, 2011. **2**(10): p. 845-54.
546. Konala, V.B., et al., *The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration*. Cytotherapy, 2016. **18**(1): p. 13-24.
547. Santiago, B., et al., *CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts*. Cytokine, 2011. **53**(2): p. 184-90.
548. Yamazaki, S., et al., *TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1250-6.
549. Youd, M., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cells do not protect NZBxNZW F1 mice from developing lupus disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(1): p. 176-86.
550. Duffy, K.R., et al., *Activation-induced B cell fates are selected by intracellular stochastic competition*. Science, 2012. **335**(6066): p. 338-41.
551. Barnett, B.E., et al., *Asymmetric B cell division in the germinal center reaction*. Science, 2012. **335**(6066): p. 342-4.
552. Halliley, J.L., et al., *Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow*. Immunity, 2015. **43**(1): p. 132-45.
553. Kassambara, A., et al., *GenomicScape: an easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells*. PLoS Comput Biol, 2015. **11**(1): p. e1004077.
554. Mannello, F. and G.A. Tonti, *Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma;*

- serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!* Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1603-9.
555. Napoletano, C., et al., *A comparative analysis of serum and serum-free media for generation of clinical grade DCs.* J Immunother, 2007. **30**(5): p. 567-76.
556. Brunner, D., et al., *Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database.* ALTEX, 2010. **27**(1): p. 53-62.
557. Mackall, C., et al., *Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery.* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(8): p. 457-62.
558. Wei, L., et al., *Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats.* Neurobiol Dis, 2012. **46**(3): p. 635-45.
559. Haque, N., et al., *Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy.* ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 632972.
560. Mantel, C.R., et al., *Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock.* Cell, 2015. **161**(7): p. 1553-65.
561. Scholbach, J., et al., *Comparison of hematopoietic stem cells derived from fresh and cryopreserved whole cord blood in the generation of humanized mice.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46772.
562. Gearing, A., et al., *Human B cell proliferation is stimulated by interleukin 2.* Immunol Lett, 1985. **9**(2-3): p. 105-8.
563. Franz, A., A. Bryant, and J. Farrant, *Interleukin-2-induced DNA synthesis and immunoglobulin secretion by resting human tonsillar B cells: effects of protein kinase C activation.* Immunology, 1991. **73**(3): p. 322-6.
564. Polikowsky, H.G., et al., *Cutting Edge: Redox Signaling Hypersensitivity Distinguishes Human Germinal Center B Cells.* J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1364-7.
565. Le Gallou, S., et al., *IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling.* J Immunol, 2012. **189**(1): p. 161-73.
566. Fan, J., et al., *Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(2): p. 153-8.
567. Wang, X., et al., *Integrin-mediated interactions between B cells and follicular dendritic cells influence germinal center B cell fitness.* J Immunol, 2014. **192**(10): p. 4601-9.
568. Mukherjee, T.K., et al., *High concentration of antioxidants N-acetylcysteine and mitoquinone-Q induces intercellular adhesion molecule 1 and oxidative stress by increasing intracellular glutathione.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1835-44.
569. Wu, Y.C., D. Kipling, and D.K. Dunn-Walters, *The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood.* Front Immunol, 2011. **2**: p. 81.
570. Jung, J., et al., *Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10.* Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2437-43.

571. Lampert, I.A., S. Van Noorden, and A.C. Wotherspoon, *Centrocytoid plasma cells of the germinal center*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2005. **13**(2): p. 124-31.
572. Caron, G., et al., *CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(12): p. 7595-602.
573. Lee, J.J., et al., *CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function*. *Purinergic Signal*, 2014. **10**(2): p. 357-65.
574. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. *J Exp Med*, 2003. **198**(9): p. 1391-402.
575. Hocevar, B.A. and P.H. Howe, *Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest*. *Miner Electrolyte Metab*, 1998. **24**(2-3): p. 131-5.
576. Spender, L.C., et al., *TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(4): p. 593-602.
577. Weeks, S., et al., *The effects of chemokine, adhesion and extracellular matrix molecules on binding of mesenchymal stromal cells to poly(L-lactic acid)*. *Cytotherapy*, 2012. **14**(9): p. 1080-8.
578. Verrecchia, F. and A. Mauviel, *Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation*. *J Invest Dermatol*, 2002. **118**(2): p. 211-5.
579. Corcoran, L.M. and D.M. Tarlinton, *Regulation of germinal center responses, memory B cells and plasma cell formation-an update*. *Curr Opin Immunol*, 2016. **39**: p. 59-67.
580. Schultze, J.L., S. Grabbe, and M.S. von Bergwelt-Baildon, *DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 659-64.
581. Martin, M.J., et al., *Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid*. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 228-32.
582. Mackensen, A., et al., *Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. **49**(3): p. 152-6.
583. Kishimoto, H., et al., *Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(25): p. 15429-34.
584. Prus, E. and E. Fibach, *Retinoic acid induction of CD38 antigen expression on normal and leukemic human myeloid cells: relationship with cell differentiation*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(4): p. 691-8.
585. Croop, J.M., et al., *Large-scale mobilization and isolation of CD34+ cells from normal donors*. *Bone Marrow Transplant*, 2000. **26**(12): p. 1271-9.
586. D'Rozario, J., et al., *Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation*. *Transfus Apher Sci*, 2014. **50**(3): p. 443-50.
587. Acosta, S.A., et al., *Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke*. *Stroke*, 2015. **46**(9): p. 2616-27.

588. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, *How do stem cells find their way home?* Blood, 2005. **106**(6): p. 1901-10.
589. Yuichi Michikawa, M., Ai Saotome-Nakamura, Takeshi Yasuda, Takaya Gotoh and Katsushi Tajima, *Clinical Impact of Radiation-Resistant Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow Deduced from Preclinical Studies.* Journal of Bone Marrow Research, 2013. **1**(1): p. 5.
590. Park, S.K., et al., *Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34+ cells engraftment in a dose-dependent fashion in NOD/SCID mice.* J Korean Med Sci, 2007. **22**(3): p. 412-9.
591. Noort, W.A., et al., *Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice.* Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 870-8.