

La cytokine BAFF et les cellules T CD4+ sont des facteurs de survie majeurs pour les plasmocytes spléniques dans le contexte de déplétion B chez la souris : implications thérapeutiques pour les maladies auto-immunes

Lan-Huong Thai

▶ To cite this version:

Lan-Huong Thai. La cytokine BAFF et les cellules T CD4+ sont des facteurs de survie majeurs pour les plasmocytes spléniques dans le contexte de déplétion B chez la souris : implications thérapeutiques pour les maladies auto-immunes. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB069 . tel-02143023

HAL Id: tel-02143023 https://theses.hal.science/tel-02143023

Submitted on 29 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio SPC

Spécialité : Immunologie

Institut Necker Enfants Malades/Inserm U1151 Equipe 12 « Développement du système immunitaire »

La cytokine BAFF et les cellules T CD4⁺ sont des facteurs de survie majeurs pour les plasmocytes spléniques dans le contexte de déplétion B chez la souris. Implications thérapeutiques pour les maladies auto-immunes

Présentée et soutenue publiquement par Lan-Huong THAI

le 24 octobre 2016

Dirigée par Jean-Claude WEILL et Matthieu MAHEVAS

Devant un jury composé de :

Mr Luc MOUTHON, Professeur, Président du jury Mr Thierry DEFRANCE, Directeur de recherche, Rapporteur Mr David SAADOUN, Professeur, Rapporteur Mr Simon FILLATREAU, Professeur, Examinateur Mme Marion ESPELI, Chargée de recherche, Examinateur Mr Jean-Claude WEILL, Professeur, Directeur de thèse

Résumé

L'anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) est largement utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes. L'analyse de la rate des patients souffrant d'un purpura thrombopénique (PTI) ou d'une anémie hémolytique auto-immune traités par anti-CD20 a mis en évidence que la déplétion lymphocytaire B favorisait la différenciation des plasmocytes (PC) normaux en plasmocytes à longue durée de vie (PLDV) auto-réactifs, expliquant en partie l'absence de réponse à ce traitement. L'enjeu de ce projet a été de savoir si la déplétion lymphocytaire B induit l'émergence de PLDV spléniques et de comprendre les processus impliqués dans la survie plasmocytaire. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de souris transgénique AID-Cre-ERT2xRosa26-loxP-EYFP qui permet de marquer irréversiblement par la protéine EYFP les cellules B lors de leur passage dans un centre germinatif au cours d'une réponse immune après ingestion de tamoxifène, puis de les suivre in vivo. Les PC EYFP⁺ ont été générés suite à 2 immunisations avec des globules rouges de mouton. Après avoir sélectionné un set de gènes permettant d'établir les signatures plasmablastiques et plasmocytaires, nous avons comparé par RT-PCR multiplex sur cellules uniques le profil d'expression des PC EYFP⁺ de la rate de souris traitées ou non par anti-CD20. Nous avons ainsi caractérisé dans le contexte de déplétion B une population plasmocytaire dans la rate homogène et mature, proche des PLDV de la moelle osseuse. Ce profil était différent de celui retrouvé dans la rate des souris contrôles, plus hétérogène, comprenant une majorité de PC intermédiaires entre plasmablastes et PC matures. Nous avons observé le même processus de différenciation paradoxale plasmocytaire dans la rate sous anti-CD20 dans le modèle murin lupique NZB/W, signifiant probablement un mécanisme général, que ce soit en contexte auto-immun ou non, chez l'homme et chez la souris.

Nous avons identifié le BAFF (B-cell activating factor) comme un facteur essentiel dans le processus de survie des PC de la rate dans le contexte de déplétion B. En effet, le taux de BAFF augmente dans le sérum et le tissu splénique après traitement par anti-CD20, la combinaison in vivo des traitements anti-CD20 et anti-BAFF induit une diminution drastique des PLDV de la rate, sans générer d'hypogammaglobulinémie IgG. Les granuleux Gr1⁺ et en particulier les neutrophiles Ly6G⁺ semblent être la principale source de production de BAFF dans le contexte de déplétion B. Nous avons observé un effet similaire de la combinaison anti-CD20 et anti-BAFF sur les PLDV de la rate dans le modèle lupique NZB/W. Enfin, les LT CD4⁺ sont un autre composant important de la niche splénique dans le contexte de déplétion B. En effet, le nombre de PC EYFP⁺ diminue significativement avec l'association anti-CD20 et anti-CD4. Ces résultats suggèrent donc que l'association du traitement anti-CD20 à un inhibiteur de facteur de survie plasmocytaire spécifique

de la rate, en particulier BAFF, pourrait avoir un bénéfice clinique au cours des maladies autoimmunes en interférant sur le processus paradoxal de maturation des PC. Un essai clinique associant les traitements anti-CD20 et anti-BAFF au cours du PTI débutera prochainement.

Remerciements

Aux membres du jury,

Professeur Luc Mouthon, j'ai eu la chance de profiter de votre savoir clinique durant mon externat et mon internat à l'hôpital Cochin. Vous avez été membre de mon jury de thèse de médecine il y a quelques années déjà. Merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse de sciences.

Professeur David Saadoun, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Docteur Thierry Defrance, merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Professeur Simon Fillatreau, merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Docteur Marion Espeli, votre expertise scientifique et vos remarques ont contribué à améliorer l'article. Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Professeur Jean-Claude Weill, vous incarnez la passion de la science. D'une curiosité insatiable, vous avez aussi la rigueur et la profondeur de la pensée indispensables à la recherche. Votre don pour rendre intelligible les notions les plus complexes, allié à votre humour et l'extraordinaire étendue de vos connaissances me rendent admirative. Merci d'avoir dirigé ma thèse.

Docteur Claude-Agnès Reynaud, je profite de ces quelques lignes pour vous exprimer toute ma gratitude et mon admiration. Avoir travaillé dans votre équipe durant ces 3 années a été un plaisir et un honneur. Vous incarnez la finesse d'esprit et l'honnêteté intellectuelle. Votre exigence scientifique, votre bienveillance, votre disponibilité et votre sang-froid en toutes circonstances sont autant de qualités que je n'oublierai pas. Merci pour tout cela.

Docteur Matthieu Mahévas, tu as été mon pilier ces 3 dernières années. Sans toi, ce projet n'aurait pas existé. Depuis le jour où tu m'as convaincue de travailler avec toi jusqu'à l'aboutissement du projet, tu n'as pas changé. Ton enthousiasme et ton énergie sont intarissables ! Ce n'est pas toujours facile de suivre ton rythme d'ailleurs ! Mais tu n'as jamais lâché, tu m'as toujours encouragée, surtout dans les moments de doute, je t'en suis reconnaissante. Ton optimisme, ta rapidité, tes idées,

ta capacité à dialoguer et à encadrer sont autant de raisons au plaisir que j'ai pris à travailler à tes côtés. Notre aventure commune n'est pas terminée ! Merci.

Professeur Bertrand Godeau, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance. Vous avez cru en moi. D'avoir travaillé dans votre service m'a confortée dans le choix de la médecine interne. Vous êtes un modèle de rigueur et de compétence médicales alliées à la bienveillance. Votre service en est le reflet. Vous m'avez montré que l'ambition n'occulte pas nécessairement l'humanité et l'honnêteté. J'aurai plaisir à reprendre l'exercice médical à vos côtés.

Professeur Marc Michel, tu as également cru en moi et investi de l'énergie pour que ce projet prenne forme. Je tiens à t'en remercier.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 12 qui m'ont accompagnée durant ces 3 dernières années.

Un merci particulier à Simon qui m'a tout appris à mon arrivée, sans qui je n'aurais pu mener à bien ce projet. Merci pour ta générosité et ta patience. Tu n'as jamais ménagé tes efforts, toujours disponible pour me prodiguer des conseils avisés et m'aider. Tu es une personne rare. J'ai conscience de la chance que j'ai eue d'apprendre à tes côtés. Un grand merci à Ailsa qui m'a beaucoup aidée sur la fin du projet. Ta rapidité d'apprentissage m'a impressionnée. Surtout, au-delà du cadre de ton master, tu n'as jamais hésité à en faire plus, ta générosité et ta promptitude à m'aider le plus possible pour me soulager les derniers mois m'ont beaucoup touchée. Sébastien, comment pouvais-tu penser que je t'oublierais dans les remerciements ?!! Tu as été mon camarade de bureau durant ces 3 années, ça crée forcément des liens !! Ma venue dans le labo m'a permis de te rencontrer, j'espère que nos liens perdureront après mon départ. Ton humour, ta gentillesse, ton intelligence et ta modestie rares me manqueront beaucoup. Un grand merci à Lucie pour ton aide précieuse durant les manips sur les souris NZB. Mais surtout un merci général pour ta gentillesse et ta constance durant toutes ces années, ca a été un plaisir de travailler (et de papoter) ensemble dans le même bureau ! Merci aussi à Annie, qui m'a couvée et protégée, toujours à s'enquérir de mon état physique, de mon moral. Tu as réussi un tour de force, je crois bien que tu m'as convertie à la cuisine faite maison, finis les surgelés ! Merci à Damiana pour ton aide, tu as dû me maudire plus d'une fois en me voyant arriver avec tous mes sacs de queues de souris

à génotyper! Merci à Giulia, ma camarade de thèse, pour ton sourire, ton dynamisme, ta joie de vivre, notre solidarité. Merci à Marie-Alix pour toutes nos discussions, professionnelle et personnelle, c'est toujours plaisant et instructif de discuter avec toi ! Merci à Rémi pour ton aide et ta disponibilité, ton départ a malheureusement révélé (ou plutôt confirmé) mes grosses lacunes en informatique ! Merci à François, qui a toujours été là pour me dire un mot déplaisant ⁽²⁾, une fois n'est pas coutume, je vais être agréable et te dire comme je t'ai trouvé sympathique. Merci à Sandra, j'ai eu l'impression de mieux de te connaitre ces derniers mois, j'ai trouvé très plaisant de travailler et de discuter avec toi. Merci à Barbara pour les conseils avisés que tu m'as donnés durant ces années.

Je tiens à remercier Jérôme et Corinne de la plateforme de cytométrie. Un merci particulier à Jérôme avec qui j'ai passé tellement d'heures à trier sur l'aria ! Ca a été un vrai plaisir de travailler avec toi, ta compétence, ta disponibilité et ton implication dans mon projet ont beaucoup contribué à sa réussite. Je remercie également Nicolas qui m'a beaucoup aidée au confocal, Rachid et Amandine à l'animalerie. Merci aussi à Nicolas de la plateforme biostatistique, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci aux amis de la danse, Benoît, Maryse, Anne-Lise, pour nos fous rires et nos supers soirées.

Merci aux amies de toujours Nanor, Vanessa, Florence, Sandrine, mon quatuor gagnant.

Enfin je dédie cette thèse à mes plus proches. A mes parents dont le soutien inconditionnel m'a permis d'arriver là où je suis. Et à toi Manu qui me rends la vie plus belle et plus douce.

Une pensée émue et affectueuse pour ma tante, partie récemment.

SOMMAIRE

I-INTRODUCTION

A-Développement lymphocytaire B, génération et régulation des plasmocytes

1-Ontogénie des plasmocytes	12
1a- Sous-populations B dont dérivent les plasmocytes chez la souris	12
1b- Réponses antigéniques extra-folliculaires et folliculaire, et processus de	
différenciation plasmocytaire	16
1b1 La réponse extrafolliculaire T-indépendante	
1b2 La réponse extrafolliculaire T-dépendante	19
1b3 La réponse GC	19
1b4 La réponse mémoire, apport du modèle murin AID-Cre-ERT2-EYFP dans la compréhension de sa diversité	21
1b5 L'importance des T follicular helper au cours de la réponse GC	22
1b6 La réponse antigénique dans les tissus muqueux digestifs	24
1c- Régulation génique de la différenciation plasmocytaire	26
1d- Processus de migration et de maturation plasmocytaire	29
2- Plasmocytes à longue durée de vie	33
2a- Naissance du concept deplasmocytes à longue durée de vie	33
2b- Programme intrinsèque des plasmocytes à longue durée de vie	35
2c- Facteurs de survie et niches plasmocytaires	37
2c1 Niche médullaire	37
2c2 Autres niches	43

B-Dysrégulation des lymphocytes B au cours des maladies autoimmunes et conséquences thérapeutiques

1-Implication des lymphocytes B au cours des maladies auto-immunes	45
1a- Mécanismes de rupture de la tolérance des cellules B	45
1a1- Mécanismes de rupture de la tolérance centrale	46
1a2- Mécanismes de rupture de la tolérance périphérique	46
1b- Importance et caractéristiques des plasmocytes auto-réactifs	50
1b1 Localisation et production in situ dans les tissus inflammatoires	51
1b2 Plasmocytes auto-réactifs de longue durée de vie	52
1b3 Niche de survie plasmocytaire dans les tissus inflammatoires	53
2- Conséquences : avènement des biothérapies ciblant les lymphocytes B dans le traitement	des
maladies auto-immunes	56

	ιιu
 Ac monoclonal anti-CD20	
 Autres biothérapies ciblant les lymphocytes B	

C-Causes d'échec du Rituximab, perspectives thérapeutiques

1- Qualité de la déplétion B62
2- Absence de restauration de la tolérance B
4- Différenciation paradoxale des plasmocytes auto-réactifs en plasmocytes à longue durée de
vie
II-KESULIAIS
III-DISCUSSION
A-Programme transcriptionnel des plasmocytes de la rate à l'état
normal et lors de la déplétion lymphocytaire B chez la souris
1- Identification et tri des plasmocytes dans le modèle AID-Cre-EVEP 108
2- Programme transcriptionnel des plasmocytes chez la souris AID-Cre-EYFP
3- Analyse en cellule unique des plasmocytes de la rate et de la moelle sans et après
traitement par anti-CD20 dans le modèle NZB/NZW113
B-Niche plasmocytaire splénique dans le contexte de déplétion B
1- Le role majeur de la cytokine BAFF
2- Les neutrophiles, principale source de production de BAFF dans la niche splénique
3- Le rôle des 1 CD4 dans le maintien des plasmocytes dans la rate
C-Confrontations aux données chez l'homme et perspectives de
recherche
1- Le processus de différenciation plasmocytaire dans le contexte de déplétion B119
2- La combinaison anti-CD20 + anti-BAFF en application clinique
IV-ANNEXES
V-BIBLIOGRAPHIE 124

ABREVIATIONS

-Ac = anticorps

-ADCC = effet cytotoxique cellulaire Ac-dépendant

-AHAI = anémie hémolytique auto-immune

-AID = activation-induced cytidine deaminase

-Ag = antigène

-AMM = autorisation de mise sur le marché

-ANA = Ac anti-nucléaires

- -ANCA = Ac anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
- -APRIL= a proliferation-inducing ligand

-ARNm = ARN messager

-BAFF = B-cell activating factor

-Blimp-1 = B-lymphocyte-induced maturation protein 1

-BrdU = bromodeoxyuridine

-BZM = B de la zone marginale

-CMH II = complexe majeur d'histocompatibilité de type II

-DC = cellules dendritiques

-FDC = follicular dendritic cells

- -FR = facteur rhumatoïde
- -GC = germinal center
- -Ig = immunoglobuline
- -LB = lymphocytes B
- -LES = lupus érythémateux systémique

-MAI = maladies auto-immunes

- -OLS = organes lymphoïdes secondaires
- -PALS = manchon lymphoïde péri-artériolaire
- -PC = plasmocyte

-PR = polyarthrite rhumatoïde

-PTI = purpura thrombopénique immunologique

- -SGS = syndrome de Gougerot-Sjogren
- -SHM = hypermutation somatique
- -S1PR1=sphingosine 1-phosphate receptor 1
- -TACI = transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor

-TD = T-dépendants

-TFH = TCD4 follicular helper

-TI = T-indépendant

- -TLR = Toll-like receptor
- -Xbp1 = X-box binding protein 1

I-INTRODUCTION

A-Développement lymphocytaire B, génération et régulation des plasmocytes

1- Ontogénie des plasmocytes

Pour faire face et répondre au mieux à la multitude d'agents pathogènes rencontrés tout au long d'une vie, qu'ils soient bactériens, viraux, parasitaires ou autres, le système immunitaire a dû mettre au point une réponse humorale sophistiquée, complexe, capable d'allier rapidité, efficacité et durabilité. Cette réponse humorale est assurée par les lymphocytes B (LB), dont les plasmocytes (PCs) représentent le stade terminal de différenciation. Les PCs ne se divisent donc plus et se définissent par leur capacité à sécréter des anticorps (Ac). Les Ac neutralisants ont une importance capitale dans la défense anti-infectieuse. La population plasmocytaire couvre une grande hétérogénéité, selon la stimulation antigénique initiale, la population B dont elle dérive, l'environnement cellulaire et cytokinique dans lequel elle est générée et qui la régule. La diversité des populations plasmocytaires va permettre d'apporter une réponse synchronisée et complémentaire. Aussi, on peut schématiquement distinguer 3 lignes de défense au cours de la réponse humorale : 1) la sécrétion « naturelle » d'Ac qui contribue à la réponse immédiate contre l'infection 2) une réponse de faible affinité rapide dans les jours suivants l'infection 3) la réponse spécifique développée dans les 6 jours après la première rencontre avec l'antigène (Ag), permettant la production d'Ac de meilleure affinité donc plus efficaces, pouvant être produits pour certains d'entre eux, des années durant voire toute la vie. Ainsi, bien qu'étant une population rare dans les organes lymphoïdes (<0,5%), les PCs n'en sont pas moins un composant essentiel.

1a- Sous-populations lymphocytaire B dont dérivent les plasmocytes chez la souris

Les cellules B nouvellement formées sont générées au niveau de la moelle osseuse puis maturent dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), composés de la rate, des ganglions et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, principalement digestives (GALT, gut-associated lymphoid tissue). Dans la rate, les B immatures correspondent aux B transitionnels, initialement divisés en deux populations T1 et T2, puis en 3 catégories (Loder F, *et al* 1999, Allman D, *et al* 2001). Contrairement aux B matures, les 3 catégories de B transitionnels expriment le marqueur phénotypique de précurseur B CD93/AA4. Les B transitionnels se différencient selon le niveau

d'expression de IgM et CD23 : IgM^{high}CD23⁻ (T1), IgM^{high}CD23⁺ (T2) et IgMI^{ow}CD23⁺ (T3). Cependant, chez la souris adulte, une large majorité des B de la moelle osseuse ne parvient pas vers un compartiment lymphoïde secondaire pour effectuer la suite de la maturation. En effet, à partir des 2.10^7 B immatures IgM+ produits quotidiennement dans la moelle osseuse, seuls 10% atteignent la rate et 1 à 3% deviennent des B matures. Cette sélection des B matures provient de plusieurs niveaux de contrôle, central et périphérique. De cette sélection, négative pour éliminer les clones auto-réactifs et positive pour la maturation des B, dépend la diversité du répertoire B tout en maintenant une tolérance au soi. Deux récepteurs sont essentiels à la maturation et la survie des B immatures, le BCR et le BAFF-R (également appelé BR3), un des récepteurs de BAFF (Bcell activating factor). BAFF est un membre de la famille du TNF α et est aussi appelé BLyS, TALL-1, THANK, Ztnf-4 ou TNFSF-13B (Ng LG, *et al* 2005). En effet, une délétion complète de la signalisation BCR induit la perte totale des cellules B de la rate (Kraus M, *et al* 2004). De même, les souris déficientes pour BAFF-R ou BAFF présentent un arrêt de la maturation des B au stade transitionnel (Gross JA, *et al* 2001).

Les B matures naïfs se différencient des B immatures par une up-régulation des marqueurs de surface IgD et CD23 et une down-régulation de CD93. De plus, contrairement aux B immatures, ils forment un pool stable et sont capables de proliférer en réponse à une activation par le BCR. Les B matures naïfs se divisent en 3 catégories: les B1 et les B2 dits conventionnels, comprenant les B de la zone marginale (BZM) et les B folliculaires (Figure 1).

Les B folliculaires composent la principale population B naïve, résident dans les follicules des OLS et sont capables de recirculer en permanence dans le sang et les vaisseaux lymphatiques. Ces propriétés sont essentielles pour générer une réponse humorale efficace. Les B folliculaires contribuent à la grande majorité de la réponse antigénique T-dépendante, essentiellement par la voie folliculaire. Ils représentent la population B la plus efficace pour initier une réponse dans le centre germinatif d'où proviennent les Ac spécifiques de haute affinité capables de persister des années durant (Phan TG, *et al* 2005).

Les BZM forment une population B non circulante, localisée au niveau de la zone marginale de la rate. Les BZM se caractérisent par le phénotype IgM^{hi}IgD^{low}CD21^{hi}CD23^{low}. Le phénotype des B folliculaires se différencie par une expression plus forte de IgD et CD23, et plus faible de CD21 et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Le développement des BZM requiert, outre BCR et BAFF-R, un autre récepteur clé: Notch2. En effet, les souris KO pour Notch2 ou son ligand Delta like-1 (DL1) sont déficientes en BZM. Les cellules exprimant DL1 correspondraient

à une population rare de cellules stromales dérivées des cellules souches hématopoïétiques, et n'ont été retrouvées que dans la rate, sans équivalent identifié dans les autres organes lymphoïdes, constituant une possible clé de la régulation et du maintien de la population BZM (Hozumi K, et al 2004). Les BZM sont capables de se différencier en PCs sans passer par la collaboration T. Une fois activés, les BZM sortent de la zone marginale vers la pulpe rouge pour se différencier en PCs sécréteurs d'IgM à courte durée de vie (Martin F, et al 2002). La vitesse de leur réponse les rapproche des B mémoires, beaucoup plus rapides à générer des cellules sécrétrices d'Ac que les B naïfs. Les BZM sont considérés comme des cellules mémoires « naturelles ». Les BZM contribuent aussi à la réponse folliculaire. En effet, le haut niveau d'expression de CD21 sur les BZM et leur localisation dans les sinus marginaux près de la circulation sanguine leur permet de capturer des complexes immuns puis de les transporter dans les follicules spléniques aux cellules dendritiques folliculaires(FDC), cellules essentielles à la présentation antigénique mais localisées uniquement au niveau des follicules. Les BZM se déplacent continuellement entre la zone marginale et les follicules grâce à un gradient d'expression des récepteurs CXCR5 pour aller vers les follicules et S1PR1 (sphingosine 1-phosphate receptor 1) pour en sortir et revenir dans la zone marginale (Cinamon G, et al 2007).

Chez la souris, les B1 sont divisées en deux sous-populations B1-a (CD5⁺) et B1-b (CD5⁻). Les B1 se distinguent des B2 par leur précurseur, leur localisation, et leur répertoire. De plus, à la différence des B2, BAFF-R n'est pas indispensable à la survie des B1 (Ng LG, et al 2005). Les B1 dérivent d'un progéniteur présent en plus grande abondance durant la période fœtale mais qui persiste quelques temps après la naissance. Ensuite, à la différence des B2 dont les progéniteurs sont continuellement générés à partir de la moelle osseuse, les B1 ont la capacité de s'autorenouveler (Montecino-Rodriguez E, et al 2006). Elles sont minoritaires dans la rate et prédominent dans les cavités péritonéale et pleurale. Les B1 ont un répertoire plus restreint que celui des B2, mais ont la particularité d'être enrichis en clones auto-réactifs au sein des B1 CD5⁺ (Hayakawa K, et al 1999). Les B1 contribuent à la réponse humorale à la fois innée et adaptative. En effet, les B1 CD5⁺ produisent des Ac naturels IgM en l'absence d'immunisation (Hayakawa K, et al 1999). Les souris germ-free, c'est-à-dire des souris maintenues dans un environnement dénué de toute stimulation antigénique extérieure, ont un taux d'Ac IgM relativement normal dans le serum tandis que les taux d'IgA et d'IgG chutent (Bos NA, et al 1989). Ces Ac IgM préexistants sont polyréactifs et donc capables de se lier à plusieurs Ags, notamment la phosphorylcholine et certains polysaccharides pneumococciques. Ils ont démontré leur rôle dans la réponse anti-infectieuse en phase précoce. En effet, des études menées dans différents modèles d'infections bactériennes et virales ont montré que ces Ac naturels, bien que n'augmentant pas

quantitativement, participaient à la neutralisation et l'élimination de ces immunogènes (Baumgarth N, et al 1999, Ochsenbein AF, et al 1999). Un défaut d'Ac naturels expose à une plus grande susceptibilité aux infections, notamment à leur dissémination systémique, et à une moins bonne réponse spécifique assurée par les B2 par la suite dans les OLS (Ochsenbein AF, et al 1999). Les cellules B produisant ces Ac naturels IgM ne prolifèrent ni ne switchent en IgG suite à l'exposition antigénique, ils diffèrent donc des cellules B qui vont générer des Ac spécifiques en réponse à l'infection. Les B1a et les B2 ne sont donc pas redondants, chacun correspondant aux deux bras de la réponse humorale innée et adaptative respectivement (Baumgarth N, et al 2000). Alors que les B1a sécrètent des Ac naturels IgM, les B1b génèrent une réponse de type IgM Tindépendante après stimulation par des agents pathogènes tels que Borrelia Hermssi ou des polysaccharides pneumococciques (Alugupalli KR, et al 2004, Haas KM, et al 2005). Bien que la réponse soit T-indépendante, les B1b peuvent générer une réponse mémoire capable de se différencier en PCs de courte durée de vie sécréteurs d'IgM spécifiques en cas de ré-infection (Alugupalli KR, et al 2004). Les B1 participent également à la réponse mucosale digestive dirigée contre la flore intestinale commensale avec capacité de switch isotypique vers des PCs sécréteurs d'IgA de façon T-indépendante (Fagarasan S, et al 2003). Alors qu'il existe une littérature relativement riche sur les B1 chez la souris, les B1 constituent une population non clairement définie chez l'Homme, et leur origine reste controversée.

Au final, les B matures naïfs se distinguent en plusieurs sous-populations, mais toutes sont capables de se différencier en PCs. Les réponses Ac sont quantitativement et qualitativement différentes selon le compartiment B dont elles sont issues. Tandis que les BZM et les B1 contribuent à une sorte de ligne de défense innée grâce à une réponse humorale rapide, les B folliculaires assurent une réponse plus spécifique et de plus forte affinité mais qui sera plus tardive.



Figure 1 : Sous-populations B dont dérivent les PC (Schéma issu de Shapiro-Shelef M, *et al* 2005)

1b- Réponses antigéniques extra-folliculaire et folliculaire, et processus de différenciation plasmocytaire

La réponse immune antigénique se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). En effet, ils possèdent l'architecture et l'environnement cellulaire nécessaires pour répondre aux différents Ags. La rate et les ganglions sont constitués de follicules B entourés de zones riches en lymphocytes T, appelées para-cortex dans le ganglion et manchon lymphoide péri-artériolaire (PALS) dans la rate. Ces zones T comprennent des cellules stromales sécrétrices de CCL19 et de CCL21 reconnues par le CCR7 des T naïfs. Les follicules B sont riches en cellules folliculaires dendritiques (follicular dendritic cells: FDC) qui vont capter et présenter l'Ag aux B folliculaires sans l'apprêter. Cet ensemble composé des follicules B et des zones T forme la pulpe blanche de la rate. Autour de cette pulpe blanche, la rate comprend une pulpe rouge riche en globules rouges,

leucocytes, cellules dendritiques (DC) et cellules stromales où peuvent résider des PCs à longue vie. Entre les pulpes blanche et rouge, se trouve la zone marginale, composée de BZM, des macrophages et des DC. Les OLS sont très vascularisés, permettant une connexion permanente avec la circulation sanguine et le système lymphatique. Cette vascularisation permet à la fois aux B folliculaires, via leur continuel va et vient entre la rate et la circulation, et aux BZM de la rate, situés dans une zone propice à la rencontre antigénique grâce à la proximité de vaisseaux sinusaux, de rencontrer l'Ag pour lequel ils sont spécifiques, de s'y lier puis d'initier la réponse immune.

Après stimulation antigénique, deux types de réponse humorale co-existent et se complètent via les voies folliculaire et extra-folliculaire dans la rate et le ganglion (Figure 2) (McLennan IC, *et al* 2003, Batista FD, *et al* 2009). La réponse extra-folliculaire est une voie de différenciation rapide capable d'assurer une sécrétion précoce d'Ac efficaces. Elle est la voie de différenciation exclusive de certains Ags, appelés Ags T-indépendants (TI), parmi lesquels les Ags TI de type 2 (TI-2). Les Ags TI-2 correspondent typiquement aux polysaccharides des bactéries encapsulées telles que le *Streptococcus pneumoniae ou Nesseiria meningitidis*. Ils sont essentiellement reconnus par les BZM et les B1 (Vinuesa CG, *et al* 2003). En revanche, les Ags T-dépendants (TD) activent quasi-exclusivement les B folliculaires et peuvent générer des réponses à la fois extra-folliculaire et folliculaire.



Figure 2: Réponses extrafolliculaires T-indépendante et T-dépendante et réponse GC (Schéma issu de Giltiay N, *et al* 2012)

1b1 La réponse extrafolliculaire T-indépendante

Dans la rate, la réponse extra-folliculaire est assurée préférentiellement par les BZM (Martin F, *et al* 2002, MacLennan IC, *et al* 2003). En effet, en réponse à une stimulation antigénique, les BZM sont les cellules B qui s'activent le plus rapidement. Elles ont un seuil de stimulation plus faible que les B folliculaires, notamment grâce à la forte expression de CD21 et des molécules CD80 et CD86, d'où leur capacité à être activées même par un Ag de faible affinité, sans nécessité de collaboration T (Fagarasan S, *et al* 2000). Au cours de la réponse extra-folliculaire TI, les DC Cd11c^{lo} issues de la circulation qui ont migré dans la rate après capture de l'Ag pour le présenter aux cellules B jouent un rôle capital. Cette interaction DC-B est essentielle à la fois pour assurer la survie des cellules B et pour promouvoir la différenciation en plasmablastes (Balazs M, *et al* 2002). Plus récemment, les neutrophiles spléniques ont montré aussi leur importance dans la réponse Ag TI. En effet, une équipe a suggéré que des neutrophiles localisés en permanence près de la zone marginale étaient capables, même en l'absence de contexte inflammatoire, et à la différence des neutrophiles en circulation, d'induire l'expression de la protéine activation-induced cytidine deaminase (AID) dans les BZM, classiquement exprimée dans les centres germinatifs (GC), et d'induire la production d'Ac par les BZM (Puga I, *et al* 2011).

La réponse humorale TI est sous le contrôle de TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), un récepteur exprimé de façon constitutive sur les cellules B matures et particulièrement les BZM, qui a pour ligands BAFF et APRIL (a proliferation-inducing ligand), un autre membre de la famille du TNFa (Balazs M, et al 2002). En effet, les souris knock-out pour TACI présentent une abolition spécifique de la réponse aux Ags TI-2, malgré une préservation de l'architecture splénique et des composants cellulaires B et DC nécessaires à cette réponse (Von Bulow GU, et al 2001). D'autres études ont montré que BAFF et APRIL étaient capables de générer une production d'Ac et un switch isotypique sans collaboration T (Litinskiy MB, et al 2002, MacLennan I, et al 2002, Bergamin F, et al 2007). Les souris APRIL^{-/-} n'ayant pas de défaut dans la réponse Ag TI-2, BAFF est donc capable d'assurer seul cette réponse immune (Varfolomeev E, et al 2004). TACI jouerait donc un rôle équivalent à la molécule de co-stimulation CD40 exprimée sur les B, élément central lors de la réponse TD. Au lieu d'interagir avec CD40L, le ligand de CD40 exprimé par les T helper, TACI interagit avec BAFF et APRIL qui sont produits par les DC et les neutrophiles spléniques (Litinskiy MB, et al 2002, Puga I, et al 2012). Aussi, les DC et les neutrophiles peuvent être considérés comme des Bhelpers de la réponse TI, au même titre que les T CD4 helpers lors de la réponse TD. En effet, outre leur capacité à produire BAFF et APRIL, les DC et les neutrophiles peuvent aussi activer les BZM par contact cellulaire direct (Puga I, et al 2012). Suite aux interactions avec les DC et les neutrophiles spléniques, les cellules B subissent des modifications morphologiques et

transcriptomiques nécessaires à la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac (ASC). Les ASC nouvellement générés (plasmablastes, PB), majoritairement IgM, migrent dans la pulpe rouge. La plupart des ASC générés lors de la réponse extra-folliculaire survivent environ 3 jours avant de mourir par apoptose in situ (Smith KG, *et al* 1996). Cependant, il peut exister une sécrétion d'Ac prolongée, par le biais d'une génération continue de plasmablastes sécréteurs d'Ac (Hsu MC, *et al* 2006). De plus, des plasmocytes de longue durée de vie ont été décrits dans le cadre d'immunisations par des antigènes T-indépendants (Taillardet M, et *al* 2009, Foote JB, et *al* 2012). Par exemple, une équipe a rapporté des plasmocytes spécifiques persistants plus de 180 jours dans la moelle osseuse suite à une immunisation par un antigène pneumococcique couplé à un adjuvant (Taillardet M, et *al* 2009).

1b2 La réponse extrafolliculaire T-dépendante

La reconnaissance d'un Ag TD induit à la fois l'activation des cellules B folliculaires et des T CD4 naïfs situés dans la zone T, grâce aux DC venues de la circulation. Les B folliculaires et les T spécifiques du même Ag interagissent ensuite ensemble, grâce à la surexpression de chémorécepteurs leur permettant de migrer vers la zone d'interface B-T, via CCR7 pour les B, et CXCR5 pour les T CD4⁺. Suite à cette interaction médiée par le CD40L exprimé sur les T CD4⁺ activés et CD40 sur les cellules B, les LB prolifèrent et opèrent une première bifurcation, vers les voies extra-folliculaire ou folliculaire. La réponse extra-folliculaire donne lieu à la formation de foci, correspondant à la prolifération de plasmablastes, à la jonction des pulpes blanche et rouge dans la rate et aux alentours des zones paracorticales T dans le ganglion. Au bout de quelques jours, les plasmablastes arrêtent de proliférer et se différencient en PCs, avec possible switch isotypique, mais de faible affinité pour l'Ag et de courte durée de vie (McLennan IC, *et al* 2003). Parallèlement, d'autres cellules B ré-entrent dans les follicules pour former des GC, correspondant à des follicules secondaires (Allen CD, *et al* 2007 b).

1b3 La réponse GC

La formation des GC apparait généralement 6 jours après la première stimulation antigénique pour atteindre un pic au 10^e jour avant d'involuer vers le 30^e jour. Cette réponse GC implique une phase précoce d'intense prolifération des cellules B spécifiques de l'Ag, puis une phase de GC mature, qui se définissent histologiquement par une zone dense et une zone claire. Chacune de ces zones a ses propres fonctions. La zone dense, proche de la zone T, contient la majorité des cellules B en prolifération, les centroblastes. Les centroblastes y effectuent le processus d'hypermutation somatique (SHM) au niveau des régions variables des chaines lourdes de leurs immunoglobulines (Ig), sous le contrôle de la protéine AID, spécifiquement exprimée au niveau des GC. Ce

processus de SHM est nécessaire à la maturation d'affinité pour l'Ag, de même que le switch de classe isotypique au niveau des chaines lourdes des Ig, toujours sous le contrôle de l'AID (Berek C, et al 1991, Muramatsu M, et al 2000). Une fois sortis du cycle cellulaire, les centroblastes deviennent des centrocytes ré-exprimant à leur surface des Ig de diverses affinités pour l'Ag, down-régulent CXCR4 et migrent vers la zone claire, où se localisent 2 composants cellulaires essentiels à la suite des mécanismes de sélection et de différenciation des cellules B, les FDC et les T CD4⁺ follicular helper (TFH). En l'absence de FDC chez les souris déficientes pour la lymphotoxin-α, il n'y a pas de formation possible de GC (Matsumoto M, et al 1996). La zone claire des GC est située à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques, notamment près de la zone marginale dans la rate, afin que les FDC puissent capter les Ags en circulation. Les FDC peuvent présenter des complexes immuns aux centrocytes nouvellement formés qui vont tester leur affinité pour l'Ag. A ce stade, la majorité des cellules B meurent in situ, phagocytés par des macrophages, en raison d'un réarrangement inadéquat sur le BCR ou d'une interaction insuffisante avec l'Ag. Cette sélection négative est essentielle pour éliminer les clones devenus auto-réactifs suite au processus d'hypermutation. En revanche, les cellules B ayant reçu un signal BCR suffisamment fort survivent et peuvent continuer le processus de sélection et de différenciation (Victora GD, et al 2012). Le degré d'affinité du BCR pour l'Ag détermine le devenir de ces cellules, celles ayant le plus haut degré d'affinité se différencient en plasmablastes, tandis que celles de moindre affinité deviennent des B mémoires ou ré-entrent dans le GC (Phan TG, et al 2006). Ainsi, le processus de différenciation plasmablastique est issu d'un mécanisme de sélection qualitatif. En effet, chez les souris transgéniques sur-exprimant Bcl2, malgré une sélection moins stringente des B mémoires du fait d'une plus grande capacité de survie, celle des PCs de haute affinité persistants à distance de l'immunisation reste inchangée (Smith KG, et al 2000). A l'inverse, des souris avant un défaut de GC et donc un défaut dans le processus de SHM présentent un profond déficit de PCs spécifiques persistants à distance de l'immunisation (Toyama H, et al 2002, Zotos D, et al 2010). Le résultat final est donc la sélection de variants plasmocytaires de haute affinité dans le GC. Concernant le choix d'une ré-entrée dans le GC pour continuer le processus de SHM ou d'une différenciation en B mémoires, les mécanismes sous-jacents sont moins clairs. Au cours d'une réponse immune classique, le nombre de B mémoires reste stable dans le temps. En revanche, le profil d'hypermutation varie, les B mémoires étant beaucoup plus mutés en fin de réponse GC que ceux générés initialement. Ceci suggère que les B mémoires ne s'accumulent pas au cours du temps mais recirculent dans le GC et donc procèdent plusieurs fois à l'hypermutation somatique, ceux de haute affinité étant les derniers générés et qui persistent au final. Cependant, à la différence des PCs de longue vie, la génération de B mémoires n'est pas absolument dépendante des GC puisque les B1b sont capables de produire des B mémoires au

cours d'une réponse Ag TI (Alugupalli KR, *et al* 2004). De plus, les souris ayant un défaut dans le développement ou le maintien des GC peuvent produire des B mémoires switchés qui n'ont pas eu ou peu de maturation d'affinité (Toyama H, *et al* 2002, Tarlington D, *et al* 2006). Grâce à l'expression de molécules de survie et non du fait de l'affinité pour l'Ag, les B mémoires peuvent se maintenir et rester à l'état quiescent des mois durant en l'absence de stimulation antigénique (Rajewsky K, *et al* 2000).

1b4 La réponse B mémoire, apport du modèle murin AID-Cre-ERT2-EYFP dans la compréhension de sa diversité

Population minoritaire parmi les B, les B mémoires se distinguent classiquement des B naïfs par leur phénotype IgD⁻ et leur isotype switché. En cas de ré-exposition antigénique, les B mémoires peuvent présenter rapidement l'Ag aux LT CD4⁺ et générer des cellules sécrétrices d'Ac sans nécessité de nouvelle réponse GC. Il en résulte une différenciation et une expansion de plasmablastes de haute affinité pour l'Ag à partir de ces B mémoires qui seront beaucoup plus rapides et plus efficaces qu'au cours de la réponse primaire. Ceci vaut surtout pour la population mémoire IgG. Une étude, conduite dans le laboratoire, sur le modèle murin transgénique AID-Cre-ERT2 x Rosa26-loxP-EYFP a montré que la population B mémoire générée après une réponse TD couvrait en fait plusieurs sous-populations (Dogan I, et al 2009). Ce modèle murin est basé sur un système doublement inductible, impliquant d'une part la stimulation par un Ag TD (classiquement des globules rouges de mouton) induisant l'entrée des cellules B dans le germinal center (GC) et l'activation du promoteur AID, d'autre part l'ingestion de Tamoxifène afin d'activer la Cre-ERT2 et de permettra sa localisation depuis le cytosol vers le noyau. Une fois dans le noyau, la Cre activée peut couper les séquences LoxP qui flanquent la protéine EYFP (yellow fluorescent protein) (Figure 3). Celle-ci marque alors de façon irréversible les cellules B qui viennent d'entrer dans le GC, permettant leur identification et leur suivi in vivo, même après leur différenciation en B mémoires ou ASC. Basé sur ce modèle, Dogan et al ont montré que, de façon surprenante, les B mémoires IgM sont ceux qui persistent en majorité à distance de l'immunisation en comparaison avec les IgG1. Après re-stimulation antigénique, les B mémoires IgG1 se différencient d'emblée en plasmablastes sécréteurs d'IgG1 dans la pulpe rouge tandis que les IgM rentrent de nouveau dans les GC pour devenir des centrocytes IgM ou IgG1 avant de se différencier, pour certains, en plasmablastes sécréteurs d'IgM ou IgG1. Les IgM génèrent donc une réponse mémoire plus lente que les IgG1 (Dogan I, et al 2009).



ROSA26-loxP-EYFP reporter line

Figure 3 : Schéma du modèle murin transgénique AID-Cre-ERT2 x Rosa26-loxP EYFP (Schéma de J.C Weill et C.A Reynaud)

1b5 L'importance des T follicular helper dans la réponse centre germinatif

La réponse germinal center (GC) est dite T-dépendante, à la fois pour l'initiation et le maintien du GC, et pour les processus de sélection et de différenciation des B. En effet, l'initiation de la réponse GC requiert l'interaction CD40/CD40L. Une inhibition de cette interaction CD40/CD40L inhibe la formation des GC (Kawabe T, et al 1994, Victora GD, et al 2012). Les TFH, une souspopulation spécifique de TCD4, possèdent, outre une forte expression de CD40L, des caractéristiques qui les rendent essentiels à la réponse GC. Les TFH se caractérisent par le phénotype CXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺ et sont sous le contrôle du facteur de transcription Bcl6 (B cell lymphoma 6), similaire à celui des cellules B du GC (Ye BH, et al 1997). Leur maintien est étroitement et mutuellement lié à celui des cellules B GC, constituant une boucle de rétrocontrôle positive. De même que l'interaction CD40/CD40L, l'interaction ICOS/ICOSL est également requise pour l'initiation de la réponse du GC et le switch isotypique (Tafuri A, et al 2001). De plus, de par leur nombre très minoritaire comparé aux cellules B au niveau de la zone claire des GC, les TFH vont imposer une sélection aux cellules B de meilleur affinité capables de leur présenter l'Ag couplé au CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de type II). Cette interaction T-B, impliquant de nouveau l'interaction CD40/CD40L, est extrêmement brève dans les GC mais déterminante pour la sélection des LB puisque les LB ayant pu interagir avec les TFH vont recevoir d'autres signaux nécessaires à leur survie et différenciation (Victora GD, et al 2012, Allen CD, et al 2007a). En effet, si CD40L et ICOS sont essentiels à l'initiation de la réponse GC, d'autres molécules sont nécessaires au maintien de la réponse GC et à l'induction de la réponse mémoire. L'expression de SAP (cytoplasmic adaptor protein signalling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein) à la surface des TFH est essentielle au maintien de l'interaction T-B. Un défaut d'expression de SAP induit un défaut de production de réponse

mémoire humorale, portant à la fois sur les B mémoires et les PCs à longue vie, malgré une réponse initiale GC normale et un switch isotypique (Crotty S, et al 2003). Les TFH se caractérisent également par la production de l'IL4 et l'IL21. Indépendamment des autres fonctions des TFH, l'IL21 constitue un élément fondamental pour les GC (Linterman MA, et al 2010). Si l'IL21 n'est pas indispensable comme le CD40L à l'initiation des GC, elle l'est pour leur maintien. En effet, les souris déficientes pour l'IL21 ont des GC initialement normaux mais qui vont involuer plus précocément, via une diminution de l'expression de Bcl6 (Linterman MA, et al 2010, Zotos D, et al 2010). Or le maintien des GC est nécessaire à la formation des PCs de haute affinité, du fait d'une formation séquentielle de la mémoire humorale dans le temps, débutant par celle des B mémoires, puis celle des PCs de haute affinité en fin de réponse GC (Weisel FJ, et al 2016). D'autre part, l'IL21 est capable d'induire directement la différenciation plasmocytaire in vitro et in vivo (Tarlington D, et al 2006, Ding BB, et al 2013, Ozaki K, et al 2004). Si CD40L ne suffit pas à induire l'expression de facteur de transcription plasmocytaire, il permet de potentialiser l'effet de l'IL21 sur la différenciation plasmocytaire (Ding BB, et al 2013). Ainsi, de façon indirecte en raison d'une involution précoce des GC et de façon directe sur la différenciation plasmocytaire, un défaut d'IL21 ou de son récepteur IL21R entraine une altération quantitative et qualitative des PCs de haute affinité. Les souris déficientes pour l'IL21 ou son récepteur IL21R présentent un profond déficit en IgG spécifique de l'Ag (Ozaki K, et al 2002). En revanche, IL21 n'est pas requise pour la réponse mémoire (Linterman MA, et al 2010). Une délétion de PD-1, autre molécule fortement exprimée à la surface des TFH, ou de ses ligands PD-L1 ou PD-L2 exprimés sur les B des GC, affecte également le maintien des GC en favorisant leur apoptose, et donc impacte sur le nombre de PCs de haute affinité. Les B mémoires ne sont pas altérés (Good-Jacobson KL, et al 2010) (Figure 4).



Figure 4 : Expression des molécules d'interaction et sécrétion des cytokines par les TFH nécessaires à la réponse GC (Schéma issu de Craft J, *et al* 2012)

Enfin, récemment, les TFH ont été identifiés comme une source locale de BAFF (Goenka R, et al 2014). Plusieurs études ont fait le lien entre un déficit en BAFF et un défaut de maturation des FDC, induisant un défaut de signalisation permettant une interaction optimale entre les FDC et les cellules B (Rahman ZS, et al 2003, Hase H, et al 2004). De plus, BAFF participe au maintien du GC puisque des souris déficientes pour BAFF ou BAFF-R, bien qu'avant un nombre très restreint de cellules B matures, sont capables d'initier une réponse GC mais qui va décliner très rapidement (Rahman ZS, et al 2003, Vora KA, et al 2003). Outre le BAFF systémique, le BAFF local produit par les TFH exerce un rôle direct sur les GC, là aussi lors de la phase tardive (Goenka R, et al 2014). En effet, un défaut de BAFF local n'affecte pas la formation des GC ni la réponse précoce mais impacte la sélection des clones B de haute affinité en phase tardive. Cette sélection implique l'interaction de BAFF avec TACI, dont l'expression sur les cellules B au niveau de la zone claire des GC est sous le contrôle de l'IL21 produite par les TFH. Un défaut de TACI, malgré la présence de GC, entraine une diminution des PCs de haute affinité persistants à distance de l'immunisation. (Goenka R, et al 2014). Par sa participation indirecte via les FDC et son rôle direct sur la sélection des clones de haute affinité sous le contrôle des TFH, BAFF joue un rôle déterminant dans la réponse GC.

De façon intéressante, Pelletier *et al* ont montré que les PCs nouvellement générés étaient capables d'exercer un effet de rétrocontrôle négatif sur les TFH, via l'inhibition de Bcl6 et de la production d'IL21. Chez les souris déficientes en PCs, il est observé une accumulation de TFH dans les OLS. Les PCs ne font donc pas que sécréter des Ig et gardent la capacité de présenter des Ags, d'interagir avec les T CD4⁺. Cette boucle de rétrocontôle négative est sans doute importante pour réguler la réponse immune (Pelletier N, *et al* 2010).

1b6 La réponse antigénique dans les tissus muqueux digestifs

La réponse immune systémique se déroule généralement dans la rate et les ganglions. Cependant, les OLS comprennent aussi le tissu lymphoïde mucosal, le plus important se situant au niveau de la muqueuse digestive (tissus lymphoides associés à l'intestin : GALT). Les GALT tiennent leur importance dans leur capacité à produire localement des PCs sécréteurs d'IgA dirigés contre les germes de la flore commensale, élément clé dans le maintien d'une homéostasie entre le système immunitaire et le microbiote intestinal (Fagarasan S, *et al* 2003). Les GALT sont constitués de 2 sites fonctionnels, le site inducteur correspondant majoritairement aux plaques de Peyer, et le site effecteur, situé dans la lamina propria intestinale. Les plaques de Peyer ont la particularité de contenir des GC en constante stimulation antigénique induite par les bactéries commensales. Ces GC ont la même architecture que les GC « classiques » des autres OLS,

comprennent les mêmes composants FDC et TFH nécessaires à la réponse GC, mais ont la particularité de produire des B mémoires switchés IgA, toujours sous la dépendance de l'AID. La réponse immune et le switch isotypique IgA ont donc lieu principalement depuis les plaques de Peyer mais la lamina propria contient aussi des cellules B IgM⁺ capables de switcher vers des cellules B IgA⁺. Ainsi, soit les cellules B IgA⁺ migrent depuis les plaques de Peyer vers les ganglions mésentériques où ils se différencient en plasmablastes avant de gagner la lamina propria, soit la stimulation antigénique, le switch et la différenciation plasmablastique se déroulent sur le site effecteur même. La migration depuis les plaques de Peyer vers la lamina propria requiert l'interaction de CCR9 exprimé par les PCs IgA⁺ avec CCL25 sécrétée par les cellules épithéliales de l'intestin (Pabst O, et al 2004). Les PCs IgA⁺ se dirigent ensuite vers la surface apicale de la muqueuse intestinale et servent de barrière locale pour empêcher une réponse immune systémique dirigée contre la flore digestive. Les B2 issus de la moelle osseuse et les B1 peuvent donner lieu à ces PCs sécréteurs d'IgA. La réponse à partir des B2 est TD, médiée par l'interaction CD40-CD40L. La réponse B1 est TI et nécessite l'interaction avec les DC. De même que pour la réponse TI par les BZM dans la rate, APRIL sécrétée par les cellules épithéliales intestinales et les DC locales activées permet le switch isotypique des LB mucosaux stimulés par la voie TI, avec in fine des PCs sécréteurs d'IgA2 plus résistants et efficaces que les IgA1 au niveau de la muqueuse intestinale (He B, et al 2007). L'importance d'APRIL dans le switch IgA et la défense mucosale a été confirmée par des études sur des souris déficientes pour APRIL (Castigli E, et al 2004). A la différence des Ac naturels IgM, les IgA produits par les B1 dépendent d'une stimulation antigénique et requièrent la présence d'une flore intestinale. Les souris germ-free sont donc dépourvues de ces IgA mucosales (Macpherson AJ, et al 2000). La constitution du pool de B mémoires IgA intestinaux à partir desquels sont générés les PCs sécréteurs d'IgA, a lieu durant les premières années de vie, le répertoire est extrêmement dynamique avec un recrutement permanent de nouveaux clones B. Une fois constitué, ce répertoire va persister durablement à l'âge adulte. En revanche, bien que le répertoire clonal soit stable, le nombre d'hypermutations somatiques augmente avec l'âge, traduisant une diversification permanente des B mémoires. Cependant, en cas d'infection intestinale par un nouveau germe pathogène non reconnu par le pool de B mémoires, le système immunitaire est capable de recruter un nouveau clone spécifique à partir des B naïfs et de l'intégrer de façon durable dans son répertoire. Le répertoire intestinal IgA s'adapte constamment aux modifications du microbiote, essentiellement par une diversification de son pool de B mémoires par hypermutation somatique, tout en étant capable de générer de nouveaux clones et de les intégrer durablement si besoin. Cette adaptation constante du répertoire IgA intestinal à la flore digestive est essentielle au maintien de l'homéostasie avec l'hôte (Lindner C, et al 2015).

Au final, les PCs proviennent de diverses réponses, selon la stimulation antigénique, le site de production, la population B impliquée, le mécanisme extra ou intra-folliculaire, le mode de régulation. Pourtant, malgré cette diversité, quelque soit le mode de génération, les facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des PCs restent similaires.

1c-Régulation génique de la différenciation plasmocytaire

L'extinction du programme des gènes B est un pré-requis à la différenciation plasmocytaire. Il est courant d'opposer deux groupes de facteurs de transcription antagonistes pour expliquer la différenciation plasmocytaire: ceux qui gouvernent le programme de maturation des cellules B (*Pax 5, Bcl6, Mitf*) et ceux qui gouvernent celui des PCs (*Prdm1, Xbp1, Irf4*). Ces groupes de gènes sont capables de se réprimer mutuellement, celui qui prend l'ascendant permet la différenciation de la population qu'il gouverne (Shapiro-Shelef M, *et al* 2005 a) (Figure 5).



Figure 5: Principaux gènes de régulations positive et négative de la différenciation plasmocytaire (schéma issu de Shapiro-Shelef M, *et al* 2005)

Le gène majeur des cellules B est *Pax5* (paired box 5), qui code pour le facteur de transcription BSAP (B–cell-specific activator protein), présent sur toute la lignée B jusqu'aux sous-populations B matures (Nutt SL, *et al* 2001). *Pax5* joue plusieurs rôles dans l'établissement et le maintien de la lignée B, et est probablement associé à l'activation des gènes impliqués dans les principales fonctions des cellules B telles que le réarrangement des Ig, la signalisation BCR et l'induction de

AID dans les GC (Schebesta A, *et al* 2007, Gonda H, *et al* 2003). De plus, simultanément, *Pax 5* réprime les gènes de différenciation et fonctionnels des PCs, dont les gènes d'Ig et le facteur de transcription *Xbp1*(X-box binding protein 1) (Reimold AM, *et al* 2001). Aussi, la répression de *Pax5* est un évènement majeur pour la différenciation plasmocytaire (Nera KP, *et al* 2006). *Bcl6* est aussi un gène clé de la lignée B puisqu'il est essentiel à la formation des GC, où il est fortement exprimé par les centrocytes (Ye BH, *et al* 1997). De plus, *Bcl6* réprime l'expression de Blimp-1, donc la différenciation plasmocytaire (Shapiro-Shelef M, *et al* 2005a).

Parallèlement, les gènes de différenciation plasmocytaire doivent être up-régulés, principalement Blimp-1 codé par le gène Prdm1 (Turner CA, et al 1994, Shaffer AL, et al 2002). Son expression est universellement requise pour la différenciation plasmocytaire (Kallies A, et al 2004). La délétion de Blimp-1 dans les PCs matures résulte dans leur apoptose (Shapiro-Shelef M, et al 2005b). Blimp-1 réprime l'expression des gènes des cellules B et des GC, et promeut la sortie du cycle cellulaire en inhibant des gènes tels que c-myc, une phase essentielle au processus de transition d'un plasmablaste vers un plasmocyte (Lin Y, et al 1997). Les cibles de Blimp-1 parmi les gènes B comprennent Pax5, SpiB, Ciita et Id3, ainsi que les composants des GC, tels que AID et Bcl6 (Shaffer AL, et al 2002). De façon indirecte, en réprimant Pax5, Blimp-1 rétablit l'expression des gènes des Ig et Xbp1. De plus, Blimp-1 induit une up-régulation de CXCR4, nécessaire dans le homing et le maintien des PC in vivo (Sciammas R, et al 2004). Cependant, bien que représentant le pivot central dans la différenciation plasmocytaire, les études menées sur des souris KO conditionnel pour Blimp-1 ont montré que Blimp-1 n'était pas indispensable à l'initiation du processus de différenciation plasmocytaire (Nutt SL, et al 2007, Kallies A, et al 2007). En effet, la détection de taux significatifs d'Ig chez des souris RAG-déficientes reconstituées avec des cellules B déficientes pour Blimp-1 indique l'existence d'une étape intermédiaire, avant l'expression de Blimp-1. Irf4 (interferon regulatory factor 4) est un autre facteur de transcription capital pour les PCs dans lesquels il est fortement exprimé. Comme Blimp-1, Irf4 est requis pour la différenciation plasmocytaire (Klein U, et al 2006, Sciammas R, et al 2006). Irf4 est exprimé faiblement dans les LB non activés, mais sous stimulation antigénique TI ou TD, son expression est induite, d'abord à un niveau permettant l'expression de AID et le switch isotypique, puis à un niveau plus élevé pour promouvoir l'expression de Blimp-1 et la sécrétion d'Ig (Sciammas R, et al 2006). Les cellules B d'une souris déficiente en Irf4 (irf4-1-) ne peuvent induire l'expression de Blimp-1, mais avec la réexpression ectopique de Irf4, l'induction de Blimp-1 est de nouveau possible. Ceci indique que l'expression d'Irf4 précède celle de Blimp-1, et souligne son rôle capital en phase initiale de différenciation. Un autre facteur impliqué dans la différenciation plasmocytaire à un stade antérieur à Irf4 a été identifié. Mitf (microphtalmia-associated transcription factor), qui est très fortement exprimé sur les B naïfs, fait partie des facteurs qui répriment *Irf4*. Une souris $Mitf^{-1}$ développe spontanément des PCs, à l'inverse, une sécrétion ectopique de *Mitf* supprime l'expression de *Irf4* et la sécrétion d'Ac (Lin L, *et al* 2004). Au total, 3 évènements jouent un rôle important en phase précoce de la différenciation plasmocytaire, et sont antérieurs au rôle de Blimp-1 : *Pax5*, *Mitf* et *Irf4*.

Selon que la réponse antigénique soit TI ou TD, la régulation des gènes de différenciation n'est pas tout à fait la même, le processus est plus rapide au cours de la réponse TI. En effet, les B1 et les BZM possèdent ex vivo des caractéristiques qui les prédisposent à se différencier plus rapidement en plasmablastes que les B2 folliculaires, à savoir une expression à l'état basal plus forte de Blimp-1 et moins forte de Bcl6 (Fairfax KA, et al 2007). Suite à une stimulation par un Ag de type LPS in vitro et in vivo, Blimp-1 est up-régulé en moins de 24 heures dans les B1 et les BZM, générant une rapide sécrétion d'Ig, cette up-régulation n'apparait que dans les 72 heures après stimulation pour les B folliculaires (Fairfax KA, et al 2007, Martin F, et al 2001). Au cours d'une réponse TD, différentes voies de signalisation au niveau des GC contrôlent la différenciation plasmocytaire. En premier lieu, le fort niveau d'expression de Bcl6 au niveau des GC réprime l'expression de Blimp 1 (Shapiro-Shelef M, et al 2005a). Bach2 joue aussi un rôle crucial dans la formation des GC, en particulier dans la commutation isotypique et la maturation d'affinité. De même que Bcl6, Bach2 participe à la répression de Blimp-1 (Ochiai K, et al 2008). A l'inverse, un déficit de Bach2 induit une up-régulation de Blimp-1 (Muto A, et al 2004). Alors que Bcl6 et Bach2 sont des répresseurs de Blimp-1, les kinases Erk1 et Erk2 (extracellular signalregulated kinase) régulent positivement la différenciation plasmocytaire au cours de la réponse TD. En effet, des souris KO conditionnel pour Erk1 et Erk2 au niveau des GC ne peuvent générer de plasmablastes à partir des cellules B des GC ni à partir des B mémoires. Cette altération est dûe à un défaut d'induction de l'expression de Blimp-1. Un renforcement de l'expression de Blimp1 dans les cellules B déficientes pour Erk1 et Erk2 rétablit leur capacité de différenciation en plasmablastes (Yasuda T, et al 2011). L'IL21 régule aussi positivement les gènes de différenciation plasmocytaire. En effet, in vitro, l'IL21 induit l'expression de Blimp-1 selon un mécanisme STAT3 dépendant. L'effet de l'IL21 sur STAT3 est potentialisé en présence du CD40L (Ding BB, et al 2013). Enfin, la voie NF-κB a également été impliquée dans la régulation positive de Blimp1 (Heise N, et al 2014). Or l'interaction CD40/CD40L active la voie NF-κB. Ceci est concordant avec les résultats des études sur des souris transgéniques exprimant de façon constitutive CD40L sur les cellules B qui ont montré que la signalisation CD40/CD40L, bien qu'indispensable à la formation des GC, induisait paradoxalement l'involution précoce des GC pour favoriser la différenciation plasmocytaire (Bolduc A, et al 2010, Kishi Y, et al 2010).

Après l'étape d'initiation de la différenciation plasmocytaire, processus au final universel bien que régulé différemment selon le mode de génération, vient celle de la maturation. La maturation des PCs va se traduire par des modifications transcriptionnelles et phénotypiques permettant leur migration au sein de niches favorables à leur maintien.

1d- Processus de migration et de maturation plasmocytaire

La réponse humorale nécessite une modification constante de localisation dans les organes lymphoïdes afin d'effectuer les différentes phases de maturation depuis le stade B immature jusqu'à la phase de différenciation terminale plasmocytaire. Ce processus dynamique implique une modulation de l'expression des récepteurs de surface à chaque étape pour migrer vers la zone adéquate. Après une phase initiale de maturation dans la moelle osseuse, les cellules B passent dans la circulation et migrent dans les OLS, en particulier dans les follicules grâce à l'expression de CXCR5 dont le ligand CXCL13 est exprimé par les follicules. Après stimulation par un Ag TD, les cellules B vont up-réguler le récepteur de la zone T CCR7 afin de migrer vers la zone d'interface B-T et interagir avec les T CD4⁺ activés. CCR7 a pour ligands CCL19 et CCL21 produits dans la zone T (Figure 6).

Une fois différenciés en plasmablastes, l'interaction avec les ligands des zones T et B n'est plus nécessaire d'où une down-régulation de l'expression de CXCR5 et de CCR7 et la perte de réponse à CXCL13, CCL19 et CCL21 (Wehrli N, et al 2001, Hargreaves DC, et al 2001). A ce stade, les plasmablastes vont devoir migrer vers des zones spécifiques favorables à leur maturation et maintien, correspondant à la pulpe rouge dans la rate, le cordon médullaire dans les ganglions et la moelle osseuse. Ces 3 zones sont riches en CXCL12, principalement produit par les cellules stromales. Or il existe un gradient d'expression croissant de CXCL12 depuis la zone périfolliculaire jusque la pulpe rouge, le cordon médullaire et la moelle osseuse. Grâce à ce gradient d'expression et à l'up-régulation de CXCR4, le récepteur de CXCL12, sous le contrôle de Blimp-1, les plasmablastes vont pouvoir migrer jusque vers ces zones qui leur sont favorables. L'absence d'expression de CXCR4 entraine un défaut de localisation dans la pulpe rouge de la rate, la présence de plasmablastes en circulation dans le sang et une importante diminution de capacité de migration vers la moelle osseuse. En revanche, il n'a pas été observé d'altération de localisation dans le cordon médullaire des ganglions (Hargreaves DC, et al 2001). Tandis que les plasmablastes générés par la voie extra-folliculaire dans la rate vont migrer via le gradient CXCL12 vers la pulpe rouge, les plasmablastes issus des GC vont répondre au gradient CXCL12 de la circulation et migrer vers la moelle osseuse. Les plasmablastes générés dans les ganglions vont d'abord migrer vers la médulla, toujours grâce au gradient CXCL12, avant de passer dans la circulation puis la moelle osseuse. Afin de réguler la migration des plasmablastes vers la moelle osseuse, la capacité de réponse au CXCL12 est limitée dans le temps, malgré le maintien de l'expression de CXCR4 (Hauser AE, *et al* 2002). Un autre récepteur, EBI2 (Epstein-Barr virus induced molecule-2), contrôle la migration des plasmablastes issus des GC. En effet, les B des GC se caractérisent par une down-régulation de EBI2. Sous le contrôle positif de BCR et de CD40, l'up-régulation de EBI2 à la surface des plasmablastes nouvellement générés va leur permettre de sortir des follicules et de migrer vers la zone péri-folliculaire. Un défaut d'expression de EBI2 entraine une accumulation des plasmablastes dans les follicules (Pereira JP, *et al* 2009).



Figure 6: Modification de l'expression des récepteurs à la surface des cellules B durant le processus de différenciation plasmocytaire et de migration vers la pulpe rouge et la moelle osseuse

Durant la migration jusque vers la pulpe rouge, la médulla ou la moelle osseuse grâce à la modulation des récepteurs CXCR5, CCR7, EBI2 et CXCR4, les cellules sécrétrices d'Ac perdent les caractéristiques des plasmablastes et acquièrent le phénotype de plasmocyte. En utilisant le modèle murin transgénique porteur de l'allèle reporter Blimp-1^{gfp}, il a été possible de préciser l'évolution des marqueurs phénotypiques avec la maturation plasmocytaire. Basé sur le niveau d'expression du marqueur de différenciation plasmocytaire Blimp-1, Kallies *et al* ont identifié 2 populations plasmocytaires. Les PCs exprimant un niveau intermédiaire de Blimp-1 (Blimp^{int}) prédominent dans la rate de souris non immunisées et sont minoritaires dans la moelle osseuse, tandis que les PCs Blimp^{hi} sont enrichis dans la moelle osseuse. Les cellules Blimp ^{int} ont une plus grande capacité à proliférer que les cellules Blimp^{hi} puisqu'elles incorporent plus rapidement le BrdU (bromodeoxyuridine), un analogue nucléotidique. L'ensemble de ces données suggère donc qu'un haut niveau d'expression de Blimp-1 reflète un stade de maturation plasmocytaire plus

avancé, les Blimp^{hi} provenant de la maturation des précurseurs Blimp^{int} (Kallies A, et al 2004). Ainsi, suite à une immunisation, la population splénique Blimp^{int} s'expand tandis que la population Blimp^{hi} reste stable dans la rate et la moelle osseuse. Comme attendu, la population Blimp^{int} exprime plus fortement que la population mature Blimp^{hi} les marqueurs régulés par les gènes de la lignée B: B220, CD22, CMH II ainsi que les Ig de surface. Bien que les 2 populations Blimp-1 expriment de la même façon CXCR4, seule la fraction Blimp^{int} répond au CXCL12. Au total, les PCs matures se caractérisent donc par l'arrêt de la prolifération, la perte d'expression des marqueurs phénotypiques régulés par les gènes de la lignée B. Ils vont acquérir d'autres marqueurs comprenant CD138 (syndecan-1) et CD93 (Halliley JL, et al 2015, Médina F, et al 2002, Manz RA, et al 1998, Chevrier S, et al 2009). Cependant, la spécificité de ces marqueurs propres aux plasmablastes ou PCs matures n'est pas si nette. Alors que CD138 est un marqueur généralement admis pour identifier les PCs matures, en particulier de la moelle osseuse, l'utilisation du modèle Blimp-1^{gfp} a mis en évidence une hétérogénité dans son expression. En effet, certains PCs Blimp^{int} expriment CD138, à l'inverse, tous les PCs Blimp^{hi} ne l'expriment pas (Kallies A, et al 2004). D'autre part, certaines cellules CD138⁺ sont capables de proliférer, signifiant qu'elles peuvent correspondre à des plasmablastes (Hoyer BF, et al 2004, Shapiro-Shelef, et al 2005b). Enfin, le CMH II fait partie des marqueurs permettant d'identifier les plasmablastes (Manz RA, et al 1998). La perte de CMH II reflète la diminution de capacité des PCs d'interagir avec les lymphocytes T. Or les cellules B220⁻CD138⁺BrdU⁻, donc théoriquement des PCs, peuvent aussi exprimer fortement le CMH II (Lacotte S, et al 2013). Chez l'homme, les marqueurs CD38 et CD27 ne permettent pas non plus de discriminer les plasmablastes des PCs (Halliley JL, et al 2015, Médina F, et al 2002, Avery DT, et al 2005).

A la différence des plasmablastes dont le nombre généré dépend de la quantité d'Ags et donc du nombre de cellules B initialement recrutées, celui des PCs dépend de la place disponible dans les niches nécessaires à leur survie (Sze DM, *et al* 2000). Au cours de la réponse extra-folliculaire TI ou TD, l'interaction des plasmablastes avec les cellules myéloïdes est essentielle à la fois pour leur maturation et leur survie (MacLennan ICM, *et al* 2003, Garcia de Vinuesa GC, *et al* 1999). Les plasmablastes rencontrent d'abord les DC myéloides Cd11c⁺ résidentes localisées dans la zone péri-vasculaire proche des LT puis, une fois arrivés dans la pulpe rouge, les PCs interagissent avec les monocytes/macrophages Gr1⁺Cd11b⁺F4/80⁺ qui ont migré eux aussi dans cette zone grâce à l'expression de CXCR4. Ces cellules myéloïdes sont importantes car les DC produisent la majeure partie de l'IL-6 et une part d'APRIL tandis que les monocytes/macrophages fournissent l'autre part d'IL6 et la majorité d'APRIL. Pour capter APRIL, les PCs up-régulent les récepteurs TACI et surtout BCMA (Mohr E, *et al* 2009). Grâce à ces facteurs de survie cellulaires et cytokiniques, les

PCs générés à partir de la réponse extra-folliculaire peuvent résider durablement dans la pulpe rouge de la rate (Sze DM, *et al* 2000). Cependant, cette niche de survie est limitée en terme de places, dépendante du nombre de cellules myéloïdes et de la quantité de cytokines disponibles. L'expansion de la population dendritique Cd11c⁺ permet une augmentation du nombre de PCs de la réponse extra-folliculaire résidents dans la pulpe rouge (Garcia de Vinuesa GC, *et al* 1999).

L'étape ultime de maturation des PC issus de la réponse GC nécessite quant à elle une migration dans la moelle osseuse. Cette étape implique, outre CXCR4, l'expression de la S1P₁ (sphingosine-1-phosphate receptor 1) et de la β2 integrine. S1P1 est le récepteur de S1P, dont la concentration est plus élevée dans le sang que dans les OLS. Grâce au gradient d'expression croissant de S1P, les plasmablastes vont migrer depuis les OLS vers la circulation sanguine. De même que pour CXCL12, la réponse de S1P₁ au S1P est limitée dans le temps, maximale dans les 5 premiers jours suivant la stimulation antigénique, afin de réguler la migration des plasmablastes vers la moelle (Schwab SR, et al 2007). Chez les souris déficientes pour la S1P₁, malgré une différenciation plasmocytaire normale dans les OLS en réponse à une immunisation, les plasmablastes échouent à passer dans la circulation et à migrer dans la moelle osseuse et s'accumulent au niveau du cordon médullaire ou de la pulpe rouge (Kabashima K, et al 2006). Le passage vers la moelle osseuse des plasmablastes nouvellement générés dans les ganglions nécessite également l'expression de la B2 intégrine. En effet, pour passer dans la circulation, les plasmablastes vont passer par le réseau endothélial du cordon médullaire, qui exprime fortement ICAM-1, le ligand de la β2 intégrine. Un défaut en B2 intégrine empêche les plasmablastes de se diriger vers le cordon médullaire puis de passer dans la circulation, d'où une accumulation dans les ganglions et une diminution significative des PCs dans la moelle osseuse (Pabst O, et al 2005). Le délai entre la formation des plasmablastes et la migration vers la moelle osseuse est d'environ 2 semaines, notamment du fait d'une capacité de réponse limitée dans le temps aux gradients CXCL12 et S1P. Durant cette courte période, la grande majorité des plasmablastes ne migreront pas et seront éliminés in situ durant la phase de contraction suivant la stimulation antigénique (Sze DM, et al 2000, Kallies A, et al 2004). En particulier, les plasmablastes générés lors de la réponse extra-folliculaire vont pour la plupart mourir dans les 72 heures in situ par apoptose, seule une fraction minoritaire va migrer dans la moelle osseuse. Par ailleurs, les plasmablastes hypermutés et de forte affinité issus des GC vont aussi migrer dans la moelle osseuse (Smith KG, et al 1997, Takahashi Y, et al 1998). Ainsi, à partir du 15^e jour de la réponse immune, la majorité des PCs spécifiques résident désormais dans la moelle osseuse (Manz RA, et al 1997).

2- Plasmocytes à longue durée de vie

2a-Naissance du concept de plasmocytes à longue durée de vie

Plusieurs études ont montré qu'au décours de nombre d'infections virales ou bactériennes, des Ac spécifiques étaient encore détectables dans le serum des années après l'exposition, jusqu'à 50 ans après pour le VZV, la rougeole ou les oreillons, voire 200 ans selon des projections mathématiques pour d'autres virus, alors qu'il n'y avait plus de stimulation antigénique (Hyland L, et al 1994, Slifka MK, et al 1995, Smith KG, et al 1997, Ammana IJ, et al 2007). Or la demivie des Ac étant courte, de l'ordre de quelques semaines, le maintien du niveau d'Ac est dû à la sécrétion continue par les PCs. Les PCs étaient donc issus soit de la différenciation continue à partir des B mémoires, soit étaient eux-mêmes de longue durée de vie, indépendamment des B mémoires et de l'Ag. Cette dernière hypothèse a été étayée en plusieurs étapes. Les études rapportant la persistance d'Ac spécifiques dans le serum à distance de l'exposition antigénique l'ont corrélée au nombre de PCs spécifiques présents dans la moelle osseuse, l'apport des PCs de la rate et des ganglions était minoritaire, de l'ordre de 10-20% (Hyland L, et al 1994, Slifka MK, et al 1995). Ho et al ont montré que des PCs, préférentiellement switchés, étaient capables de survivre dans la moelle osseuse pendant au moins 3 semaines sans proliférer, tandis que la grande majorité ne survivaient pas plus de quelques jours dans la rate et les ganglions (Ho F, et al 1986). Par la suite, Manz et al ont démontré que les PCs médullaires étaient issus des OLS et quasiment tous générés dans les 15 jours suivants une immunisation secondaire, puis étaient capables de survivre dans la moelle plus de 90 jours sans proliférer (Manz RA, et al 1997). Afin de savoir si les PCs étaient capables de survivre en l'absence de B mémoires, Slifka et al ont généré un modèle d'infection virale par LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), puis déplété les B mémoires in vivo par irradiation. Ils ont pu ainsi estimer la durée de vie des PCs spécifiques du LCMV, résistants à l'irradiation, en monitorant le taux d'Ac anti-LCMV dans le serum. Ils ont non seulement confimé qu'il existait bien une population plasmocytaire de longue durée de vie, capable de persister plus de 8 mois après l'infection aigue, mais aussi montré que sa survie était indépendante de la présence des B mémoires. A l'inverse des résultats de Ho et al, cette étude a conclu que bien que la plupart des PCs à longue vie proviennent de la moelle osseuse, il en existe également au niveau de la rate (Slifka MK, et al 1998). D'autres modèles de déplétion des B mémoires par anti-CD20 ont confirmé le maintien de PCs à longue vie dans la rate et la moelle osseuse, indépendamment des B mémoires (Ahuja A, et al 2008, DiLillo DJ, et al 2008). Enfin, le maintien des PCs n'est pas non plus dépendant de l'Ag. En effet, en transférant des PCs

médullaires spécifiques de l'ovalbumine chez un récipient naïf de l'Ag, le taux d'Ac spécifiques reste stable de façon durable. De plus, contrairement aux B mémoires, les PCs de longue vie ne répondent pas en cas de re-stimulation antigénique, ne s'expandent ni ne meurent (Manz RA, *et al* 1998). Au final, ces études ont prouvé que les PCs avaient le potentiel de persister très longtemps, maintenant un taux constant d'Ac neutralisants dans le cas d'une ré-infection.

Chez l'homme, de récentes études ont affiné la caractérisation de ces PCs à longue durée de vie dans la moelle osseuse. Au sein des PCs CD138⁺ de la moelle osseuse, une fraction minoritaire est également CD19⁻ (Médina F, et al 2002, Mei HE, et al 2015, Halliley JL, et al 2015). Les PCs de la moelle CD138⁺CD19⁻ ont un phénotype plus mature que les CD138⁺CD19⁺, notamment downrégulent plus nettement HLA-DR et le marqueur de prolifération Ki67. In vitro, la population CD19⁻ présente un léger avantage de survie et in vivo, elle n'est pas impactée par la déplétion anti-CD20 contrairement à la population CD19⁺, signifiant qu'elle n'est pas tributaire de l'alimentation par les plasmablastes. Enfin, en cas de stimulation antigénique, la population CD19⁻ n'est pas mobilisée dans la circulation et reste dans la moelle osseuse, à l'inverse des CD19⁺, qui semblent donc représenter une population plus dynamique (Mei HE, et al 2015). En se basant également sur le marqueur CD19 ainsi que les marqueurs CD38 et CD138, Halliley et al ont caractérisé 4 sous-populations plasmocytaires dans la moelle osseuse chez l'homme. Ils ont identifié les fractions CD19⁺CD38^{high}CD138⁻ et CD19⁻CD38^{high}CD138⁺ comme étant la moins mature et la plus mature respectivement. En effet, la population CD19⁻CD38^{high}CD138⁺ se différencie des autres par son aspect morphologique, ses marqueurs phénotypiques comprenant, là encore, une down-régulation plus marquée des Ig de surface, du CMH II et de Ki67, et un ratio de sécrétion d'IgG/IgA plus important. Surtout, cette population se distingue par un répertoire qui lui est propre puisqu'elle est la seule à pouvoir sécréter des Ac dirigés contre des Ags rencontrés 40 ans auparavant tels que la rougeole et les oreillons. De fait, ces PCs correspondent à une population de longue durée de vie. Les autres populations plasmocytaires sont capables de sécréter des Ac, mais contre des Ags rencontrés plus récemment tels que l'influenza ou le tétanos (Halliley JL, et al 2015). Chez la souris, la distinction des populations plasmocytaires de la moelle à longue vie ou non basée sur le marqueur CD19 n'est peut-être pas aussi pertinente puisque les populations Blimp1^{gfp+}CD138⁺ incorporent le BrdU de la même façon qu'elles soient CD19+ ou – (Chernova I, et al 2014).

2b- Programme intrinsèque des PCs à longue durée de vie

Chez la souris, les PC médullaires de haute affinité possèdent un programme transcriptomique marqué par une up-régulation des molécules anti-apoptotiques. En particulier, Mcl1, de la famille de Bcl2, a montré son importance dans le maintien des PCs médullaires. En effet, une étude sur un modèle KO conditionnel pour Mcl1 a montré qu'une délétion complète de Mcl1 entrainait une diminution significative du nombre de PCs dans la moelle osseuse et, en conséquence, le titre d'Ac spécifiques dans le serum à distance de l'immunisation (Peperzak V, et al 2013). L'expression des molécules de survie Mcl1 et Bcl2 est régulée entre autres par le facteur de transcription Zbtb20. Or, l'expression de Zbtb20 est induite au niveau des cellules B du GC et augmente avec la maturation des PCs, sous la dépendance de Irf4. Les souris déficientes pour Zbtb20 ont un défaut de maintien des PCs de la moelle à distance de l'immunisation bien que les GC et la différenciation plasmablastique ne soient pas altérés (Chevrier S, et al 2014, Wang Y, et al 2014). L'insertion du transgène Bcl2 restaure partiellement la capacité des souris Zbtb20^{-/-} à maintenir des taux d'Ac spécifiques durables dans le serum (Wang Y, et al 2014). Le programme de survie des PCs médullaires est donc établi précocément au cours de la réponse GC (Chevrier S, et al 2014). Zbtb20 n'est cependant pas le seul facteur de transcription impliqué en amont dans la survie des PCs issus des GC (Wang Y, et al 2014).

Les PC de longue vie se caractérisent également par une importante régulation du métabolisme, en particulier impliqué dans l'autophagie, une voie essentielle pour le contrôle du stress du reticulum endoplasmique. Les PCs ont pour fonction principale de sécréter des Ig, ce qui nécessite un équipement spécifique, notamment un réticulum endoplasmique conséquent. Or la sécrétion massive d'Ig génère un stress qui favorise l'apoptose des PCs par le biais de l'activation de la caspase 4. La fonction même des PCs est donc aussi la cause de leur mort (Pelletier N, *et al* 2006). L'autophagie permet de réguler l'expansion du réticulum endoplasmique et la sécrétion des Ig, donc de protéger les PCs du stress oxydatif. Un modèle de souris KO conditionnel pour une molécule essentielle à l'autophagie Atg5-/- a montré qu'en l'absence de ce mécanisme régulateur et protecteur, les PCs sont plus sensibles à l'apoptose générée par le réticulum endoplasmique et ne peuvent se maintenir dans la moelle osseuse, malgré une différenciation plasmocytaire normale (Pengo N, *et al* 2013).

Enfin, Blimp-1 est un master gene des PC. Kallies *et al* avaient distingué 2 populations plasmocytaires sur le niveau d'expression de Blimp-1, les plus matures correspondant au Blimp-1^{hi} notamment dans la moelle osseuse (Kallies A, *et al* 2004). Ceci semblait donc indiquer que le niveau d'expression de Blimp-1 pouvait avoir un rôle direct dans la maturation et/ou le maintien
des PCs. En effet, sur le modèle d'étude KO conditionnel pour Blimp-1, la délétion de Blimp-1 entraine une diminution drastique du nombre de PCs dans la moelle qui ont été générés avant la délétion de Blimp-1 (Shapiro-Shelef M, *et al* 2005b). Blimp-1 pourrait tenir son rôle dans le maintien des PCs de façon indirecte, en déréprimant le facteur *Xbp1*, qui lui-même contrôle l'expansion du reticulum endoplasmique et le stress généré en conséquence (Iwakoshi NN, *et al* 2003).

Une étude récente s'est aussi intéressée au programme transcriptionnel des PC de la moelle. En utilisant le modèle murin transgénique porteur de l'allèle reporter Blimp-1^{gfp}, Shi *et al* ont montré que, de façon étonnante, les PC médullaires Blimp1-gfp^{hi} CD138⁺issus de la réponse endogène présentaient très peu de différences comparé aux plasmablastes et PC de la rate. Les différences portaient essentiellement sur la down-régulation des gènes de prolifération. En revanche, les PC de la moelle ne présentaient pas d'up-régulation ni de Blimp-1 ou autre facteur de transcription plasmocytaire, ni de facteur de survie de la famille de *Bcl2* ni de gènes de l'autophagie. Les principaux gènes up-régulés par les PC de la moelle étaient *Tnfsrf*17 codant pour BCMA, *Tmem 176a, Tmem 176b* dont les rôles ne sont pas encore bien connus, et *Mt2*, impliqué dans le métabolisme cellulaire (Shi W, *et al* 2015).

Chez l'Homme, la population plasmocytaire CD19⁻CD138⁺ de la moelle exprime plus fortement la molécule anti-apoptotique *Bcl2* comparé à la fraction CD19⁺ (Mei HE, *et al* 2015). Dans l'étude de Halliley *et al*, cette même population CD19⁻CD138⁺ de la moelle se distingue des autres populations plasmocytaires par une expression plus importante de gènes et protéines impliqués dans l'autophagie. En confocal, la population CD19⁻CD138⁺ exprime plus le marqueur d'activation de l'autophagie LC3BII, et en microscopie électronique compte significativement plus d'autophagosomes (Halliley JL, *et al* 2015).

Au total, les PC de longue vie se distinguent par une expression plus marquée de molécules antiapoptotiques et impliquées dans l'autophagie. Pourtant, un PC mis en culture ex-vivo ne survit généralement pas plus de 3 jours, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, qu'il provienne de la moelle osseuse, de la rate, d'un ganglion ou d'un autre site. En revanche, le fait de reproduire les conditions de vie d'un PC de la moelle en ajoutant par exemple des fibroblastes dans le système de co-culture rétablit sa capacité de survie (Merville P, *et al* 1996). In vivo, le nombre de PCs pouvant résider et persister dans la rate est fonction des facteurs cellulaires et cytokiniques de survie disponibles au niveau de la pulpe rouge (Garcia de Vinuesa GC, *et al* 1999). Ces données suggèrent donc que le programme transcriptionnel ne suffit pas, les PCs ne sont pas de longue durée de vie de façon autonome mais dépendent largement des facteurs extrinsèques.

2c – Facteurs de survie et niches plasmocytaires

2c1 Niche médullaire

Deux évènements sont déterminants dans la sélection des PCs à longue vie de la moelle, d'une part leur sélection initiale au niveau des GC fonction de leur affinité pour l'Ag, d'autre part, leur capacité à migrer et à venir se loger dans une niche favorable à leur survie.

La moelle osseuse constitue une niche unique pour les PCs car elle rassemble de nombreux éléments favorables à leur survie, comprenant des éléments cellulaires, non hématopoïétiques (cellules stromales) et hématopoïétiques (éosinophiles, monocytes, macrophages, mégacaryocytes, précurseurs myéloïdes), et des facteurs solubles, qui sont principalement CXCL12, IL-6, APRIL et BAFF. Tous ces facteurs sont intriquement liés et se synergisent pour optimiser la survie des PCs (Tangye, *et al* 2011) (Figure 7).



Figure 7: Principaux composants cellulaires et cytokiniques nécessaires à la survie des PC dans la niche médullaire (schéma issu de Tangye SG, *et al* 2011).

Cellules stromales productrices de CXCL12 et d'IL-6

Les cellules stromales de la moelle représentent un composant majeur de cette niche, la mise en culture en leur présence suffit à maintenir la survie des PCs durant plus de 4 semaines (Minges

Wols HA, *et al* 2002). Les cellules stromales tiennent un rôle important pour plusieurs raisons. En premier lieu, les cellules stromales produisent CXCL12 (également appelé SDF-1). Or les PCs migrent depuis les OLS vers la moelle osseuse via le gradient CXC12. Outre le rôle de chémokine, CXCL12 est également un facteur de survie plasmocytaire (Cassese G, *et al* 2003). Plus de 90% des PCs médullaires IgG1⁺CD138⁺ sont observés à proximité des cellules stromales CXCL12⁺ (qui sont aussi VCAM-1⁺). La délétion conditionnelle de CXCR4 sur les B matures induit une diminution du nombre de PCs dans la moelle, suggérant la nécessité de CXCR4 pour leur maintien (Hargreaves DC, *et al* 2001, Tokoyoda K, *et al* 2004). De façon intéressante, alors que la réponse des PCs au chémotactisme exercé par CXCL12 est limitée dans le temps, afin de limiter le phénomène de migration, l'effet de CXCL12 sur la survie plasmocytaire ne diminue pas avec le temps (Hauser AE, *et al* 2002).

En plus de CXCL12, les cellules stromales participent à la survie des PCs via la sécrétion de l'IL-6. En effet, la survie des PCs en présence de cellules stromales IL-6^{-/-} diminue drastiquement comparé à la mise en culture avec des cellules stromales contrôles, le taux d'Ac sécrétés à J7 de culture chute de 80% (Minges Wols HA, *et al* 2002). D'autres études ont confirmé l'importance de l'IL-6 comme facteur de survie plasmocytaire in vitro (Cassese G, *et al* 2003, Jourdan M, *et al* 2014). De plus, in vivo, les souris surexprimant IL-6 développent des plasmocytoses, c'est-à-dire une expansion plasmocytaire au niveau de la moelle, avec une augmentation massive de la sécrétion d'IgG polyclonales (Suematsu S, *et al* 1992). La sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales est induite, ou du moins augmentée, par le contact cellulaire direct avec les PCs, qui favorisent ainsi eux-mêmes la production de facteurs nécessaires à leur survie (Minges Wols HA, *et al* 2002).

Outre l'effet de régulation positive sur la sécrétion d'IL-6, le contact cellulaire direct avec les cellules stromales synergise avec l'IL-6 pour augmenter la survie des PCs in vitro. Cette interaction implique CD44 et VLA-4 sur les PCs, qui ont pour ligands l'acide hyaluronique et VCAM-1 (Cassese G, *et al* 2003) (Minges Wols HA, *et al* 2002). Une autre molécule, CD28, permet l'interaction PCs/cellules stromales et donc la survie des PCs. En effet, la perte d'expression de CD28 entraine une diminution du nombre de PCs à longue vie dans la moelle, sans impacter les PCs à courte durée de vie ni les PCs de la rate. CD28 a pour ligands CD80 et CD86 qui sont exprimés par les cellules stromales. Les souris déficientes pour CD80 et/ou CD86 ont le même défaut de PCs que les CD28^{-/-} (Rozanski CH, *et al* 2011). Chez l'homme, CD28 est très faiblement exprimé par les PCs normaux mais plutôt par les PCs malins, constituant un facteur de mauvais pronostic (Tangye, *et al* 2011). Au cours du myélome, d'autres dérégulations peuvent être observées. En effet, l'IL-6 peut activer l'expression de certains isoformes de CD44 sur les PCs malins à l'échelle transcriptomique et protéique. En retour, CD44 induit la sécrétion

d'IL-6 par les cellules stromales, constituant une boucle de rétrocontrôle positive sur la survie des PCs monoclonaux (Vincent T, *et al* 2004). Cependant, malgré son rôle incontestable dans la survie plasmocytaire in vitro et son implication au cours du myélome, la délétion de l'IL-6 in vivo n'entraine pas de diminution significative du nombre de PCs dans la moelle, suggérant que l'IL6 n'est pas à lui seul un facteur indispensable dans la niche, d'autres facteurs permettent de compenser (Cassese G, *et al* 2003).

Eosinophiles producteurs d'IL-6 et d'APRIL

Les éosinophiles tiennent aussi un rôle essentiel dans la niche médullaire (Chu VT, et al 2011). In vitro, la co-culture des PCs avec les éosinophiles permet d'augmenter leur survie, cet effet est médié par la sécrétion des facteurs solubles APRIL et IL-6 puisque l'effet de survie est annulé en présence de leurs inhibiteurs. In vivo, les souris déficientes en éosinophiles ∆db1GATA-1 ont un défaut d'APRIL et d'IL-6 à la fois en ARN messager et en expression protéique. Malgré une différenciation plasmocytaire normale et une architecture médullaire conservée hormis l'absence d'éosinophiles, ces souris présentent une importante diminution du nombre de PCs médullaires, d'environ 70%, à l'état basal et après immunisation. Le transfert d'éosinophiles de souris WT chez ces souris déficientes permet de restaurer le nombre théorique de PCs dans la moelle, mais de façon transitoire seulement, du fait d'une durée de vie limitée des éosinophiles. Enfin, la déplétion spécifique des éosinophiles par anti-Siglec-F à distance d'une immunisation fait chuter le nombre de PCs spécifiques dans la moelle, confirmant leur rôle dans leur maintien à long terme (Chu VT, et al 2011). De façon intéressante, de même que les PCs, les éosinophiles expriment CXCR4 et peuvent donc répondre au CXCL12 sécrété par les cellules stromales. Aussi, en plus d'avoir un rôle direct dans la survie des PCs par contact cellulaire et sécrétion de CXCL12 et IL-6, les cellules stromales permettent de rapprocher les PCs d'autres composants cellulaires qui vont sécréter APRIL et IL-6, potentialisant leur capacité de survie.

Autres cellules accessoires

En dehors des cellules stromales et des éosinophiles, d'autres cellules exercent probablement un effet additionnel dans cette niche, comprenant les mégacaryocytes, les monocytes et les macrophages puisque eux aussi expriment CXCR4 et VLA-4 et sont capables de sécréter APRIL et/ou IL-6 (Belnoue E, *et al* 2012, Winter O, *et al* 2010, Chu VT, *et al* 2011). Leur contribution est cependant plus modeste. L'absence de mégacaryocytes chez les souris c-mpl^{-/-} n'induit pas de baisse du nombre de PCs spécifiques IgG1 dans la moelle à distance de l'immunisation comparé aux contrôles (Winter O, *et al* 2010). L'effet compensatoire des autres composants cellulaires et solubles de la niche est probablement suffisant. Les précurseurs myéloïdes, chez l'homme et chez

la souris, participent également à la survie des PCs de la moelle via la production d'APRIL, sans toutefois être en contact direct avec les autres composants cellulaires de la niche ni des PCs (Matthes T, *et al* 2011). Les basophiles ont également été décrits comme un facteur de survie des PCs, à la fois dans la rate et dans la moelle. Si les tests in vitro suggèrent effectivement un effet sur le maintien des PCs, partiellement dépendant de la production d'IL-4 et d'IL-6, la déplétion des basophiles in vivo n'affecte que le nombre de PCs de la rate. L'effet sur la survie des PCs à longue vie de la moelle n'a pu être clairement démontré, de façon indirecte en mettant en culture de la moelle totale à 6 mois d'une 2^e immunisation et quelques jours après la déplétion des basophiles. Après 14 jours de culture, les taux d'IgG1 totaux et IgG1 spécifiques étaient significativement diminués dans la moelle déplétée en basophiles comparé à la moelle contrôle (Rodriguez Gomez M, *et al* 2010).

APRIL et BAFF : deux cytokines essentielles à la niche plasmocytaire

L'importance d'APRIL dans la niche de survie a été mise en évidence par de nombreuses équipes, de façons directe et indirecte. In vitro, APRIL augmente la survie des PCs (O'Connor BP, *et al* 2004). De plus, alors que la délétion de l'IL-6 n'impacte pas le maintien des PCs in vivo, les souris déficientes pour APRIL ont un défaut de PCs spécifiques dans la moelle après immunisation (Belnoue E, *et al* 2008, Belnoue E, *et al* 2012). Cependant, le défaut de maintien des PCs de la moelle chez les souris APRIL^{-/-} n'est pas reporté par toutes les équipes, cette conclusion reste donc controversée (Benson MJ, *et al* 2008). D'autres études ont conforté l'importance d'APRIL en déplétant, comme mentionné plus haut, les éosinophiles, sa principale source de production, ou en la bloquant indirectement via ses récepteurs TACI ou BCMA (Chu VT, *et al* 2011, O'Connor BP, *et al* 2004, Ingold K, 2005). Le traitement par TACI-Ig induit une diminution de 65% le nombre de PCs dans la moelle tandis que les souris BCMA^{-/-} ont des PCs médullaires diminués de 80% par rapport aux contrôles (O'Connor BP, *et al* 2004). Une autre étude a confirmé la baisse des PCs de la moelle avec un traitement bloquant BCMA (Ingold K, *et al* 2005). Cependant, l'interprétation des résultats des études bloquant les récepteurs TACI ou BCMA est plus difficile car ils ne se lient pas seulement à APRIL, mais aussi à BAFF (Figure 8).

Or BAFF est aussi un facteur de survie plasmocytaire in vitro (O'Connor BP, *et al* 2004, Avery DT, *et al* 2003). Toutefois, ni les souris déficientes pour BAFF ni l'inhibition sélective par anti-BAFF in vivo n'ont induit de défaut de PCs dans le compartiment médullaire (Belnoue E, *et al* 2008, Scholz JL, *et al* 2008). Le blocage par BAFF-R, qui ne se lie qu'à BAFF et n'impacte donc pas APRIL, n'entraine pas non plus de diminution du nombre de PCs dans la moelle (Ingold K, *et al* 2005). En revanche, le traitement par BAFF-R chez des souris APRIL^{-/-} induit une baisse de

PCs médullaires spécifiques à distance de l'immunisation, signifiant que BAFF est un facteur de survie des PCs de la moelle in vivo (Benson MJ, *et al* 2008).

Au total, l'ensemble de ces études indique que BAFF et APRIL sont des facteurs de survie plasmocytaires redondants et peuvent se substituer l'un l'autre dans la niche médullaire. Toutefois, APRIL semble avoir un rôle prépondérant comparé à BAFF, d'autant qu'APRIL possède une plus grande affinité pour BCMA que BAFF et que seul APRIL peut se lier aux peptidoglycans dont fait partie le syndecan-1 (=CD138), qui est fortement exprimé sur les PCs matures, en particulier de la moelle (Ingold K, *et al* 2005).



Figure 8:Les cytokines BAFF et APRIL et leurs récepteurs (Schéma issu de Foster D, *et al* 2004)

Dynamique de la niche médullaire

Au total, les cellules stromales composent la partie statique de la niche cellulaire, le nombre ne change pas, elles ne prolifèrent pas. D'autres composants de la niche sont plus dynamiques, comme les éosinophiles dont la durée de vie limitée nécessite un renouvellement continu assuré par la prolifération (Zehentmeier S, *et al* 2014). La structure de la niche permettant le rapprochement cellulaire et donc des facteurs solubles a son importance car plusieurs études ont montré que IL-6, APRIL, BAFF et CXCL12 avaient un effet synergique sur la survie des PCs in vitro, pouvant multiplier le taux de survie d'un facteur dix comparé à l'effet d'une cytokine seule. Ces facteurs solubles peuvent maintenir des PCs humains in vitro pendant plus de 120 jours (Jourdan M, *et al* 2014, O'Connor BP, *et al* 2004). Leur importance passe notamment par

l'induction de l'expression de la molécule anti-apoptotique *Mcl-1*, via une signalisation BCMAdépendante pour BAFF et APRIL (O'Connor BP, *et al* 2004, Peperzak V, *et al* 2013). En effet, *Mcl-1* est essentielle au maintien des PCs de la moelle (Peperzak V, *et al* 2013).

La structure de la niche médullaire impose un nombre de places limité pour les PCs à longue vie. La fréquence des PCs atteint un plateau à la maturité et représente 0,1-1% des cellules de la moelle osseuse chez l'homme. Le nombre de PCs dans la moelle n'augmente pas avec le temps (Terstappen LW, et al 1990). Se pose donc la question de la capacité de la moelle à modifier et enrichir son répertoire au fil des nouvelles infections ou vaccinations tout en maintenant ses spécificités précédemment acquises. Une étude a montré que quelques jours après une seconde vaccination par la toxine tétanique, une vague de cellules sécrétrices d'Ac apparaissait dans la circulation, se composant de plasmablastes HLA-DR^{hi} spécifiques du tétanos et de PCs polyspécifiques HLA-DR¹⁰ correspondant probablement à des PCs résidents venant de la moelle (Odendahl M, et al 2005). Or, alors que les plasmablastes nouvellement générés ont la capacité de migrer via le gradient CXCL12 vers la moelle, les PCs, bien qu'exprimant CXCR4, l'ont perdue (Odendahl M, et al 2005, Hauser AE, et al 2002). Les plasmablastes nouvellement générés peuvent donc entrer dans la moelle, prendre la place des PCs délogés et devenir à leur tour des PCs à longue vie. Les PCs délogés ne reçoivent plus de signal de survie extrinsèque et meurent par apoptose. Les PCs CD19⁻ auraient donc un avantage de survie comparé aux PCs CD19⁺ à ne pas passer dans la circulation au moment d'une nouvelle infection (Mei HE, et al 2015). Cependant, la fraction de PCs de la moelle qui passent dans la circulation à chaque nouvelle infection est mineure, il reste suffisamment de PCs de chaque spécificité pour assurer un titre suffisant d'Ac protecteurs (Radbruch A, et al 2006). La niche plasmocytaire médullaire nécessite donc d'être à la fois stable et dynamique, en évolution constante. Une étude récente a suggéré que la population plasmocytaire de la moelle était beaucoup plus hétérogène et dynamique qu'attendu. Basé sur l'analyse de l'incorporation de BrdU, du cycle cellulaire et après modélisation mathématique, le renouvellement des PCs dans la moelle était estimé à 40% tous les 5-6 jours, une partie des PCs arrive régulièrement de la circulation et meurt rapidement dans la moelle, tandis qu'une autre, correspondant à ceux ayant la meilleure affinité, est stable et de longue durée de vie (Chernova I, et al 2014).

Certaines situations pathologiques modifient et déstabilisent la niche médullaire. En particulier, la niche médullaire est sensible aux signaux inflammatoires systémiques, notamment au TNF α (Ueda Y, *et al* 2004). Dans un contexte d'inflammation chronique tel qu'au cours d'un rhumatisme inflammatoire ou d'une infection prolongée, le TNF α déloge des PCs de la moelle vers la circulation, sans pour autant les remplacer par de nouveaux PCs à longue vie, malgré une réponse GC persistante et la génération d'un grand nombre de PCs à courte durée de vie dans la

rate (Slocombe T, *et al* 2013). L'hypothèse avancée est que le TNFα induit une diminution de la sécrétion médullaire de CXCL12, une moindre réponse au CXCL12 malgré une expression normale de CXCR4 et une diminution du nombre d'éosinophiles, principale source d'APRIL (Ueda Y, *et al* 2004, Slocombe T, *et al* 2013). En conséquence de la baisse des PCs médullaires, les taux d'Ac protecteurs vis-à-vis des Ags précédemment rencontrés sont diminués (Slocombe T, *et al* 2013).

2c2 Autres niches plasmocytaires

Niche au niveau des MALT

Bien que la moelle représente la principale niche des PCs à longue durée de vie, elle n'est pas exclusive. Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) sont également une source locale de production de PCs. A la différence de la moelle osseuse qui contient des éléments permettant le maintien des PCs de façon constitutive, la niche dans les muqueuses est principalement induite en cas d'inflammation et d'infection par des agents pathogènes. Les cellules épithéliales sécrètent APRIL et recrutent les neutrophiles venant de la circulation qui vont être la principale source de production d'APRIL. Des niches de survie sont créées à proximité de la zone d'infection grâce à l'expression des peptidoglycans par le tissu épithélial qui retient ainsi localement APRIL. Les PCs vont venir s'accumuler dans ces zones, capter APRIL grâce au syndecan-1 et BCMA, et sécréter localement des Ac. Les souris déficientes en APRIL ^{-/-} ne peuvent maintenir la sécrétion locale d'Ac spécifiques à distance d'une immunisation orale par ovalbumine, malgré une réponse initiale normale, prouvant l'importance d'APRIL dans le maintien des PCs des tissus muqueux lymphoides, notamment digestifs. APRIL promeut leur survie en induisant l'expression des molécules antiapoptotiques *Bcl-xL*, *Bcl2* et *Mcl-1* (Huard B, *et al* 2008).

Niche splénique

La pulpe rouge de la rate contient aussi des PCs à longue vie (Sze DM, *et al* 2000). La pulpe rouge se compose notamment de cellules stromales CXCL12⁺ auxquels répondent les PCs spléniques via CXCR4 (Heargreaves DC, *et al* 2001). Dans la rate humaine, les cellules stromales expriment en plus la molécule CD54 qui permet d'interagir avec le Cd11a, uniquement exprimé sur les PCs spléniques. Là encore, les cellules stromales maintiennent les PCs en vie grâce à la production d'IL-6 (Ellyard JI, *et al* 2005). La niche splénique comprend par ailleurs des monocytes/macrophages Gr1⁺Cd11b⁺F4/80⁺ qui expriment également CXCR4, leur permettant de se localiser à proximité des cellules stromales CXCL12 et donc des PCs. Ces cellules sont source

d'apport d'APRIL et d'IL-6 (Garcia de Vinuesa GC, *et al* 1999). Les basophiles pourraient être un autre composant favorable à la survie des PCs de la rate, notamment en produisant de l'IL-6 (Rodriguez Gomez M, *et al* 2010).

Enfin, plusieurs travaux ont rapporté un effet des T CD4⁺ sur la survie des PCs dans les OLS. Cet effet a été montré in vivo chez des souris xénogreffées c'est-à-dire immunodéficientes recevant une greffe d'amygdale humaine composée de PCs à 90% non proliférants. Le traitement par anti-CD3 humain a entrainé la déplétion complète des PCs humains présents dans les amygdales et donc une diminution du taux d'Ig humaines circulantes (Withers DR, et al 2007). Les tests in vitro ont permis d'affiner la caractérisation de ces T, correspondant à la population TFH CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺. Certains avaient suggéré un effet des TFH médié par la production d'IL-21, le contact cellulaire direct serait en fait l'élément le plus important (Rodriguez-Bayona B, et al 2013, Ramos-Amaya A, et al 2015, Withers DR, et al 2007). Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, les PCs expriment des molécules à la surface leur permettant d'interagir avec les T CD4⁺, telles que BTLA, HVEM, LAIR, HLA-DR, CD80, CD86 (Ramos-Amaya A, et al 2015). En revanche, l'interaction CD40-CD40L ne semble pas impliquée puisque ni le blocage in vivo ni l'inhibition in vitro par l'anti-CD154 (=anti-CD40L) n'impactent la survie des PCs (Withers DR, et al 2007). Les TFH maintiennent les PCs en diminuant l'apoptose, sans avoir d'effet sur la prolifération. L'effet des TFH n'est pas tissu-dépendant, il n'y a pas de différence selon que les TFH proviennent de la circulation ou des OLS, ni Ag-dépendant puisque les TFH autologues ou hétérologues ont le même effet. En revanche, les TFH ne maintiennent que les PCs provenant des OLS ou de la circulation, pas les PCs de la moelle osseuse (Ramos-Amaya A, et al 2015).

Niches dans les tissus inflammatoires

D'autres niches plasmocytaires existent, mais en conditions pathologiques. En effet, les tissus inflammatoires sécrètent CXCL9, CXCL10 et CXCL11, et ainsi attirent les PCs via le récepteur CXCR3. L'expression de CXCR3 et de ses ligands peut être induite par l'IFN γ , produit en contexte inflammatoire Th1-dépendant (Hauser AE, *et al* 2002). Selon le site inflammatoire concerné, ces PCs peuvent se localiser dans différents tissus, que ce soit le rein, la synoviale ou les glandes salivaires (Hoyer BF, *et al* 2004, Hutloff A, *et al* 2004, Kim HJ, *et al* 1999). De même que dans les niches « naturelles », les tissus inflammatoires fournissent des facteurs de survie favorables au maintien des PCs. Cependant, ces niches sont transitoires et disparaissent une fois l'inflammation résolue (Wang W, *et al* 2014). Le rôle des PCs dans les tissus inflammatoires au cours des maladies auto-immunes et les facteurs impliqués dans leur survie seront détaillés dans la 2^e partie.

B-Dysrégulation des lymphocytes B au cours des maladies auto-immunes et conséquences thérapeutiques

1- Implication des lymphocytes B au cours des maladies autoimmunes

1a- Mécanismes de rupture de la tolérance des cellules B

Le répertoire B se caractérise par une immense diversité, permettant de reconnaitre et de faire face théoriquement à une infinité d'Ags, mais cela implique en contrepartie le risque de reconnaissance et d'attaque du soi. En effet, chez les sujets sains, 55-75% des LB immatures sont polyréactifs et reconnaissent des Ags du soi (Wardemann H, *et al* 2003). Pourtant, les maladies auto-immunes (MAI) ne touchent qu'environ 5% de la population générale, signifiant qu'il existe des mécanismes de régulation pour éliminer ou contrôler les LB auto-réactifs. Le système immunitaire est doté de plusieurs points de contrôle ou « checkpoints » depuis le stade immature jusqu'au stade de différenciation terminale. Cette sélection négative permet la "tolérance B". On distingue la tolérance centrale dans la moelle osseuse et la tolérance périphérique dans le sang et les OLS. Les mécanismes à l'origine de la tolérance B sont extrêmement complexes et ne sont encore que partiellement compris. Au moins 4 mécanismes ont été identifiés pour éliminer les LB auto-réactifs: l'édition du récepteur (receptor editing), la délétion clonale, l'anergie et la régulation par des facteurs extrinsèques (Casellas R, *et al* 2001, Gay D, *et al* 1993, Tiegs SL, *et al* 1993, Nemazee DA, *et al* 1989) (Figure 9).

Une dérégulation d'un ou plusieurs de ces checkpoints induit un risque de développer une MAI.



Figure 9: Quatre mécanismes de régulation négative des récepteurs B et T autoréactifs (Schéma issu de Goodnow CC, *et al* 2005)

1a1 Mécanismes de rupture de la tolérance centrale

Au niveau de la moelle osseuse, le répertoire B est généré grâce à la recombinaison des gènes V(D)J et à la diversité jonctionnelle au niveau des chaines lourdes des Ig. De l'infinie possibilité de ces recombinaisons aléatoires, certains récepteurs produits sont auto-réactifs et vont être éliminés de 2 façons. Soit le BCR effectue un nouvel editing, c'est-à-dire qu'une nouvelle recombinaison VJ au niveau de la chaine légère génère une autre spécificité lui permettant de continuer la suite du processus de maturation, soit la cellule B meurt en surexprimant le facteur pro-apoptotique BIM. Les souris déficientes pour BIM produisent spontanément des auto-Ac anti-DNA et des manifestations lupus-like (Strasser A, *et al* 2003). Des mécanismes de sélection négative existent aussi pour les LT. Les lymphocytes T sont de façon paradoxale soumis à une sélection négative centrale dans le thymus par les antigènes du soi puis «éduqués» pour reconnaitre ceux-ci avec une affinité plus faible. Pour le TCR, la délétion se fait notamment via la voie de Fas/FasL qui va activer la caspase 8.

1a2 Mécanismes de rupture de la tolérance périphérique

Activation des cellules B par les T CD4⁺

Au niveau périphérique, les mécanismes de rupture de l'auto-immunité B sont multiples et complexes et font intervenir plusieurs évènements avec en premier lieu une rupture de tolérance au niveau des T helper CD4⁺, nécessaires à l'activation des B et leur maturation d'affinité dans

les GC. Cette rupture de tolérance T est généralement dûe à une déficience des T régulateurs qui contrôlent les T auto-réactifs présents normalement à la périphérie. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter (Goodnow CC, *et al* 2005).

Dans le premier cas, l'activation de cellules B auto-réactives de forte affinité pour l'antigène mais théoriquement anergiques lors de leur passage en périphérie, peut être induite par des T CD4⁺ helpers auto-réactifs non contrôlés par des T régulateurs.

Dans un deuxième cas, des cellules B non auto-réactives sont activées suite à une stimulation antigénique, par exemple un agent pathogène. Cet agent pathogène peut présenter des similitudes avec des auto-antigènes et donc, par phénomène de mimétisme moléculaire, générer la production de clones auto-réactifs de haute affinité lors de leur entrée dans le GC. Un exemple est le syndrome de Guillain-Barré, maladie neurologique auto-immune dont l'association avec l'infection par Campylobacter Jéjuni est classiquement rapportée.

Par ailleurs, il existe de nombreux clones B auto-réactifs de faible affinité qui circulent continuellement en périphérie chez les sujets sains, les anticorps produits par ces cellules jouant un rôle de voierie pour les déchets cellulaires à éliminer. En condition pathologique, certains de ces clones peuvent être activés par des T CD4⁺ auto-réactifs non contrôlés, entrer dans les GC, et générer là encore des anticorps auto-réactifs de haute affinité. BAFF pourrait jouer un rôle capital à la fois dans la sélection des clones de faible ou moyenne affinité et l'activation des T CD4⁺. Nous y reviendrons plus en détails dans la partie portant spécifiquement sur BAFF.

Mécanismes de sélection dans les centres germinatifs

Quelque soit le mécanisme initial d'activation des cellules B, l'entrée dans le GC est un évènement essentiel pour générer des clones auto-réactifs de haute affinité. L'étude des mutations somatiques sur les cellules B spécifiques anti-DNA chez les patients lupiques et dans les modèles murins lupiques a révélé que la quasi-totalité des clones B auto-réactifs dérivaient des GC. L'existence de check-points au niveau des GC est donc extrêmement importante pour la sélection négative des clones auto-réactifs. En effet, il a été montré que lors du processus d'hypermutation somatique, les cellules B ayant acquis par mutation une spécificité anti-soi sont éliminés par les interactions Fas-Fas ligand. Les manifestations autoimmunes observées en cas de déficit en Fas ou FasL chez l'homme et chez la souris témoignent de leur importance dans le processus tolérogène (Nagata S, *et al* 1998, Moulian N, *et al* 1998).

Compte-tenu de l'importance des TFH dans la sélection et la différenciation terminale des cellules B dans les GC, leur dysfonction peut aussi participer à l'auto-immunité (Craft JE, *et al* 2012, Tangye SG, *et al* 2013). Le modèle murin Roquin^{san/san} se caractérise par la formation

spontanée de GC, une expansion de TFH et des stigmates d'auto-immunité de type lupus-like (production d'Ac anti-dsDNA, glomérulonéphrite avec dépôts de complexes immuns). L'inhibition des GC par délétion d'un allèle Bcl6 suffit à réduire les manifestations auto-immunes, signifiant une réponse auto-immune essentiellement GC-dépendante. Par ailleurs, en bloquant un signal de costimulation T par délétion de Sap chez ce modèle auto-immun, le nombre de TFH diminue de façon drastique, avec en aval la diminution du nombre de GC, d'autoAc et des manifestations rénales moins sévères. A l'inverse, le transfert des TFH issu de ce modèle induit la formation spontanée de GC. Cette étude a ainsi établi un lien de causalité entre un excès de TFH et une réponse aberrante des GC générant un risque d'auto-immunité (Linterman MA, et al 2009). De plus, chez le modèle murin lupique, le nombre de TFH CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺ et/ou ICOS⁺ est augmenté à la fois dans les GC et en périphérie (Simpson N, et al 2010). Or l'accumulation de TFH dans les GC chez la souris lupique favorise la production d'autoAc (Vinuesa CG, et al 2005). Chez l'homme, au cours du lupus et du syndrome de gougerot-sjögren (SGS), une augmentation des TFH dans la circulation CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺ et/ou ICOS⁺ a également été rapportée, bien que cela soit plus hétérogène que chez la souris. La détection de TFH dans la circulation semble être corrélée à un phénotype de lupus plus sévère (Simpson N, et al 2010). Compte-tenu de l'importance des TFH, des traitements visant à bloquer la signalisation TFH, en particulier les interactions B7/CD28, CD40/CD40L, ICOS/ICOS-L et IL21/IL21-R, ont été testés sur différents modèles murins de lupus. Les résultats étaient globalement positifs confortant le rôle des TFH dans la rupture de tolérance au cours du lupus (Finck, B. K, et al 1994, Mihara M, et al 2000, Mohan C, et al 1995, Iwai H, et al 2003, Herber D, et al 2007, Peters AL, et al 2009). Chez l'homme, certains essais avec le traitement anti-CD40L se sont révélés encourageants au cours du lupus permettant la réduction du nombre de PCs en périphérie, d'Ac anti-dsDNA et de la protéinurie, d'autres ont eu des résultats plus décevants. Cependant, le traitement anti-CD40L a depuis été abandonné en raison d'un sur-risque thrombo-embolique (Grammer AC, et al 2003, Huang W, et al 2002, Kalunian, K.C, et al 2002, Boumpas DT, et al 2003).

Rôle central de BAFF dans la rupture de tolérance périphérique

De nombreux travaux ont révélé l'importance de BAFF dans la rupture de tolérance périphérique, et ce par plusieurs mécanismes.

Lors de leur passage depuis la moelle osseuse vers la périphérie, les cellules B sont au stade transitionnel et comprennent de nombreux clones reconnaissant des antigènes du soi avec une faible ou moyenne affinité. Or le processus de maturation et la survie des B transitionnels sont sous l'étroit contrôle de BAFF (Gross JA, *et al* 2001). Les cellules B reconnaissant le soi

expriment plus de facteur pro-apoptotique BIM que les autres cellules B d'où leur élimination en périphérie. L'interaction de BAFF avec BAFF-R active la voie NFKB2 qui inhibe BIM et induit l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 (Lesley R, et al 2004). Lorsque le taux de BAFF augmente, les cellules B reconnaissant le soi peuvent survivre d'où le risque d'auto-immunité (Thien M, et al 2004). Les souris transgéniques surexprimant BAFF ont ainsi une expansion de la population B avec des manifestations auto-immunes de type lupus-like, comprenant des forts taux de facteur rhumatoïde (FR), d'IgG anti-dsDNA (double-strand DNA), des complexes immuns circulants et des dépôts d'Ig dans les reins (Mackay F, et al 1999, Khare SD, et al 2000). A un stade plus avancé, ces souris développent un syndrome de Gougerot-Sjogren (SGS), caractérisé par une intense prolifération B polyclonale avec hypergammaglobulinémie et production d'auto-Ac anti-SSa et anti-SSb, une infiltration B des glandes exocrines en particulier salivaires et lacrymales (Groom J, et al 2002). L'association de BAFF aux MAI a été confortée par l'observation de taux élevés de BAFF dans le serum des modèles murins lupiques NZB/NZW F1 et MRL/lpr à un stade avancé de la maladie (Gross JA, et al 2000). De même, chez l'homme, nombre de MAI sont associées à des taux élevés de BAFF, par exemple la polyarthrite rhumatoïde (PR), le SGS ou le lupus érythémateux systémique (LES). L'augmentation de BAFF sérique n'est cependant pas systématique, son association avec l'activité de la maladie est plus variable que chez la souris. BAFF est non seulement augmenté dans le serum mais aussi localement dans les synoviales au cours de la PR et dans les glandes salivaires au cours du SGS (Cheema GS, et al 2001, Groom J, et al 2002, Stohl W, et al 2003, Tan S, et al 2003). Chez les souris transgéniques pour BAFF, la signalisation passe principalement par TACI (Groom J, et al 2007). De récentes études ont montré que TACI était non seulement exprimé sur les B matures mais aussi sur une fraction des B transitionnels chez les souris transgéniques pour BAFF. La population transitionnelle TACI⁺ exprime AID, est enrichie en clones auto-réactifs et capable de produire des auto-Ac switchés IgG ex-vivo. Donc, l'auto-immunité observée chez les souris transgéniques pour BAFF impliquerait principalement les B1b, BZM et la population transitionnelle via TACI (Jacobs HM, et al 2016). Le rôle de TACI est complexe dans la régulation de l'auto-immunité car paradoxal. En effet, alors que l'interaction BAFF-TACI a un effet activateur sur la réponse antigénique TI, voire aussi les B transitionnels en cas d'excès de BAFF, d'un autre côté, TACI régule négativement BAFF sur les B matures en situation normale. En effet, les souris TACI-/présentent des manifestations similaires à celles des souris surexprimant BAFF, à savoir une accumulation de cellules B dans les ganglions et surtout dans la rate, une augmentation de la production d'Ac en réponse à un Ag TD ainsi que des stigmates d'autoimmunité lupus-like comprenant des autoAc anti-dsDNA, des dépots d'Ig dans les reins, des lésions de glomérulonéphrite (Yan M, et al 2001, Seshasayee D, et al 2003).

De façon intéressante, les T CD4⁺ peuvent être aussi activés directement par BAFF. En effet, les T CD4⁺ expriment les récepteurs de BAFF, BAFF-R et TACI. Si l'augmentation des T CD4⁺ effecteurs CD44^{hi} observée chez les souris transgéniques pour BAFF a été imputée à l'augmentation des cellules B plutôt qu'à un rôle direct de BAFF, d'autres études sont venues par la suite montrer un lien direct entre BAFF, l'activation et la survie in vitro des T CD4⁺ (Mackay F, *et al* 1999, Martin F, *et al* 2004, Sutherland AP, *et al* 2005, Huard B, *et al* 2001, Huard B, *et al* 2004, Ng LG, *et al* 2004). BAFF-R semble médier l'effet de co-stimulation de BAFF sur les T CD4⁺ tandis que TACI aurait un rôle inhibiteur (Ng LG, *et al* 2004, Seshasayee D, *et al* 2003). Aussi, un excès de BAFF peut à la fois mener à une sélection des clones B auto-réactifs et à l'activation des T CD4⁺ d'où leur interaction et la possible entrée des B auto-réactifs dans des GC.

Enfin, au niveau des GC, BAFF pourrait aussi favoriser l'expansion des TFH. Cet effet est médié par BAFF-R et a été observé sur un modèle murin lupique Nba2 où le taux de BAFF est supérieur à celui des souris contrôles. En retour, IFNγ produit par les TFH stimule la production de BAFF par les DC, entretenant ainsi l'excès de BAFF, la stimulation des TFH et la formation de PCs auto-réactifs. L'inhibition de BAFF par TACI-Ig bloque l'expansion des TFH, des GC et des PCs de la rate. De façon surprenante, les souris Nba2 BCMA^{-/-} ont plus de TFH, plus de PCs auto-réactifs dans la rate et des manifestations rénales plus sévères comparé aux souris Nba2, suggérant un rôle de régulation négative de BCMA sur les TFH (Coquery CM, *et al* 2015).

Au total, une MAI est rarement le fait d'un seul point de dérégulation de la tolérance immune, mais le plus souvent la conséquence d'une succession de dysfonctionnements au niveau des checkpoints, devenus des cibles de choix des nouveaux traitements visant à restaurer la tolérance.

1b- Importance et caractéristiques des PCs auto-réactifs

La sélection des LB auto-réactifs, conséquence de la rupture de tolérance B, est un évènement majeur dans la survenue d'une MAI médiée par les cellules B. La production d'auto-Ac explique pour beaucoup l'importance des cellules B dans la physiopathologie des MAI. En effet, les auto-Ac sont historiquement la preuve du rôle des cellules B dans les MAI, à la fois critères diagnostique et pronostique, et marqueurs d'activité de la maladie. Cependant, les auto-Ac ne sont pas tous pathogènes, certains comme les ANA sont constamment présents au cours du lupus mais n'ont pas montré d'implication dans sa physiopathologie. A l'inverse, d'autres auto-Ac tels que les Ac anti-dsDNA au cours du lupus, les Ac anti-récepteur de l'acétylcholine dans la myasthénie, les

Ac anti-plaquettes dans le purpura thrombopénique immunologique (PTI) ou les Ac anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) de spécificité myéloperoxidase dans la polyangéite microscopique, ont fait la preuve de leur pathogénie. Les auto-Ac peuvent être pathogènes sous forme soluble en médiant un effet cytotoxique Fc-dépendant ou médié par le complément ou sous forme de complexes immuns qui se déposent dans les tissus cibles, comme par exemple au cours du lupus néphritique (Vlahakos D, *et al* 1992a, Vlahakos D, *et al* 1992b, Vincent A, *et al* 2002, Harrington WJ, *et al* 1990, Xiao H, *et al* 2002, Martin F, *et al* 2004).

1b1 Localisation et production in situ dans les tissus inflammatoires

Les PCs auto-réactifs, cellules sécrétrices des auto-Ac, présentent plusieurs particularités en comparaison avec les PCs « normaux ». En premier lieu, ils se localisent non seulement dans la moelle osseuse, mais aussi dans la rate et les tissus inflammatoires, variables selon la MAI. Par exemple, au cours du lupus, chez l'homme et dans le modèle murin NZB/W, les PCs auto-réactifs sont retrouvés dans la moelle osseuse, la rate et les reins inflammatoires. Si le nombre de cellules sécrétrices d'IgG totales augmente de facon considérable dans la rate et les reins des souris NZB/W en comparaison avec des souris B6, la fraction de cellules sécrétrices d'Ac IgG antidsDNA est surtout enrichie dans les reins, de l'ordre de 30% des IgG totales versus 3% dans la rate et la moelle osseuse. Ceci a été observé chez des souris âgées, à un stade avancé de la maladie (Hutloff A, et al 2004, Hoyer BF, et al 2004, Cassese G, et al 2001, Lacotte S, et al 2013, Starke C, et al 2011, Espeli M, et al 2011, Wang W, et al 2014). Or le taux d'IgG anti-dsDNA dans les reins est corrélé au taux d'IgG anti-dsDNA dans le serum chez la souris NZB/W, le nombre de PCs rénaux est corrélé à la sévérité des lésions rénales chez les patients lupiques, signifiant l'importance des PCs auto-réactifs présents dans les tissus inflammatoires (Espeli M, et al 2011). La localisation dans les sites inflammatoires s'explique par une dérégulation des gradients de migration d'un site vers un autre. En effet, de nombreuses MAI sont associées à des anomalies d'expression de chémorécepteurs et de production de chémokines (Henneken M, et al 2005). En situation physiologique, les PCs expriment principalement CXCR4 qui va répondre à CXCL12 produit dans la moelle. Les PCs expriment également CXCR3, mais son importance est moindre pour migrer vers la moelle (Hauser AE, et al 2002). Au cours du lupus chez le modèle NZB/W, en phase précoce, la rate produit CXC12 permettant le maintien des PCs localement. En phase tardive, la rate produit moins de CXCL12 tandis que les reins inflammatoires se mettent à en produire, attirant ainsi les PCs via CXCR4, et produisent aussi CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui sont les ligands de CXCR3. Ces gradients de chémokines expliquent l'accumulation initiale de PCs dans la rate puis leur migration et l'augmentation progressive dans les reins avec le temps (Balabanian K, et al 2003, Lacotte S, et al 2013, Wang W, et al 2014). De façon intéressante, la spécificité des PCs localisés dans les tissus inflammatoires n'est pas restreinte aux auto-Ags. En effet, une étude a montré qu'une immunisation secondaire .par OVA dans le modèle NZB/W induisait une accumulation de PCs spécifiques de l'OVA dans les reins inflammatoires riches en CXCL10. Ces PCs ont été générés dans la rate puis ont migré dans les reins. Une telle immunisation n'induit pas d'accumulation de PCs dans un rein normal (Cassese G, *et al* 2001).

Par ailleurs, les PCs peuvent aussi être produits in situ dans les tissus inflammatoires, devenus des structures lymphoïdes tertiaires comprenant des follicules avec des GC, des FDC et des T CD4⁺. Des exemples ont été rapportés dans les glandes salivaires au cours du Syndrome de Gougerot-Sjogren (SGS) ou dans les tissus synoviaux au cours de la PR. Cependant, aucune preuve formelle par étude des relations clonales entre les LB présents dans les tissus inflammatoires et les PCs n'a pu être apportée pour statuer sur la différenciation plasmocytaire in situ (Stott DI, *et al* 1998, Salomonsson S, *et al* 2002, Berek C, *et al* 1997, Kim HJ, *et al* 1999, Kim HJ, *et al* 2000). En revanche, les reins lupiques contiennent peu ou pas de GC, suggérant que la majorité des PC retrouvés dans les reins sont issus des OLS (Cassese G, *et al* 2001, Espeli M, *et al* 2011). Toutefois, dans une étude portant sur des biopsies rénales de 68 patients lupiques, une fraction comprenait des structures lymphoïdes tertiaires avec des GC, des FDC, des T CD4⁺ et des PCs situés en périphérie, évoquant donc la possibilité d'une différenciation plasmocytaire in situ. Ces structures étaient retrouvées dans moins de 10% des cas et associées à des lésions tubulo-interstitielles et non glomérulaires (Chang A, *et al* 2011).

1b2 PC auto-réactifs de longue durée de vie

Pendant longtemps, l'hypothèse de PCs auto-réactifs constamment générés à partir des GC et de courte durée de vie a été privilégiée. Les traitements de référence des MAI dans les années 1980, en particulier les corticoïdes et le cyclophosphamide pour les formes sévères, avaient pour cibles les cellules en cycle ou de courte durée de vie. Bien qu'efficaces, les taux de réponse étaient variables selon les patients. La persistance d'auto-Ac malgré les traitements immunosuppresseurs a dû remettre en question ce dogme et soulever la possibilité de l'existence de PCs auto-réactifs de longue durée de vie. En effet, ces traitements sont connus pour avoir peu d'effets sur les PCs à longue vie. La première étude ayant clairement prouvé leur existence a été faite sur le modèle murin lupique NZB/W à partir d'expériences avec le BrdU. Hoyer *et al* ont en effet montré que la rate contenait à la fois des PCs de longue vie avec une demi-vie de plus de 6 mois, représentant 40% de l'ensemble des PCs CD138⁺, associés à 60% de PCs de courte durée de vie, en constant renouvellement, d'une demi-vie de moins de 15 jours. De façon surprenante, les PCs à longue vie étaient IgM alors que les PCs de courte durée de vie étaient à prédominance IgG, les 2 fractions contenant des PCs de spécificité dsDNA. Alors que la dexaméthasone et le

cyclophosphamide ont permis de dépléter la totalité des PCs de courte durée de vie de la rate, les PCs de longue vie de la rate et de la moelle étaient peu atteints, pouvant expliquer l'échec de ces traitements chez un certain nombre de patients lupiques (Hoyer BF, *et al* 2004). L'incapacité de la dexaméthasone à forte dose et/ou du cyclophosphamide à dépléter les PCs BrdU- de la rate et l'ensemble des PCs de la moelle a été confirmée par une autre étude (Mumtaz IM, *et al* 2012).

Par la suite, Cheng *et al* se sont attachés à montrer l'importance des PCs de longue vie de la rate de souris NZB/W. Pour cela, ils ont transféré des cellules sécrétrices d'Ac CD138⁺ de la rate de souris NZB/W âgées de plus de 30 semaines chez des souris RAG1^{-/-}. Dès les premiers jours après transfert, les souris RAG1^{-/-} avaient des auto-Ac anti-dsDNA détectables dans le serum, persistant au même taux jusqu'au moment du sacrifice 21 semaines après. Les PCs spécifiques anti-dsDNA étaient BrdU- et résistants au traitement par cyclophosphamide donc de longue vie, d'isotypes majoritairement IgM mais aussi IgG, localisés dans la moelle et dans la rate, et de façon négligeable dans les reins. Ces souris RAG1^{-/-} ont développé des lésions de néphrite avec dépôts de complément, d'IgG et d'IgM et ont eu une survie significativement réduite comparé à des souris RAG1^{-/-} contrôles. Cette expérience a donc montré que des PCs de longue vie auto-réactifs issus de la rate de souris lupiques étaient pathogènes donc relevants comme cible thérapeutique (Cheng Q, *et al* 2013).

Par la suite, des études ont prouvé que des PCs auto-réactifs de longue vie étaient aussi présents dans les reins inflammatoires de souris NZB/W (Espeli M, *et al* 2011, Starke C, *et al* 2011, Lacotte S, *et al* 2013). Ces PCs rénaux étaient aussi pour une partie résistants au traitement par dexaméthasone et/ou cyclophosphamide (Mumtaz IM, *et al* 2012).

Chez l'homme, une étude récente a identifié les PCs de longue vie de la moelle osseuse comme étant CD19⁻. Chez le sujet sain, les PCs CD19⁻ ne sont retrouvés que dans la moelle osseuse. En revanche, au cours de la PR, il existe des PCs CD19⁻ dans les tissus synoviaux, au cours du lupus, les Ac anti-dsDNA sont retrouvés dans les 2 fractions plasmocytaires CD19⁺ et CD19⁻ (Mei HE, *et al* 2015).

1b3 Niche de survie plasmocytaire dans les tissus inflammatoires

L'accumulation et la persistance de PCs dans les tissus inflammatoires impliquent qu'ils produisent des facteurs favorables à leur survie. En effet, comme mentionné dans la partie précédente, les PCs ne possèdent pas de propriété intrinsèque leur permettant de survivre et dépendent essentiellement de l'environnement local. L'étude de Wang *et al* s'est particulièrement intéressée à l'environnement local dans la rate et les reins des souris NZB/W. Compte-tenu des facteurs de survie décrits dans la niche plasmocytaire de la moelle, cette équipe s'est focalisée sur IL-6, BAFF, APRIL et CXCL12. Dans la rate, seul APRIL apparait augmenté en ARN messager

(ARNm) dès la 8^e semaine d'âge comparé à la rate de souris contrôle, mais de façon modeste d'un facteur inférieur à 2, tandis qu'IL-6 augmente de façon plus significative d'un facteur 4 mais seulement à partir de 39 semaines. L'expression de BAFF en ARNm dans la rate ne diffère pas de celle dans les souris contrôles. Dans le rein, APRIL et IL-6 augmentent de façon plus nette que dans la rate, d'un facteur 4 pour APRIL et supérieur à 10 pour IL-6 comparé à un rein normal, ceci à un âge avancé. Bien que statistiquement non significatif, BAFF semble aussi augmenter dans l'environnement rénal avec le temps. Enfin, l'évolution de CXCL12 est inversement symétrique entre les 2 organes, c'est-à-dire diminue dans la rate et augmente dans le rein avec l'âge, suggérant une modification du gradient pour favoriser la migration des PCs depuis la rate et leur survie dans le rein. Au final, les reins possèdent des facteurs de survie nécessaires à la survie des PCs, notamment APRIL et CXCL12 qui sont produits localement par des cellules stromales (Wang W, *et al* 2014).

Chez l'homme, la détection de BAFF dans les tissus inflammatoires, par exemple dans les biopsies rénales de patients lupiques ou les glandes salivaires au cours du SGS, pourrait avoir un lien avec le maintien des PCs localement en situation pathologique (Chang A, et al 2011, Lavie F, et al 2004). L'IL-6 est également augmentée dans les tissus synoviaux des patients ayant une PR, et son augmentation a été corrélée à l'atteinte rénale au cours du lupus chez l'homme (Houssieau F, et al 1988). Par ailleurs, les tissus inflammatoires sont riches en T CD4⁺, que ce soit les glandes salivaires dans le SGS ou les tissus synoviaux au cours des rhumatismes inflammatoires, participant à la structure lymphoïde tertiaire et la réponse GC dans ces tissus (Stott DI, et al 1998, Salomonsson S, et al 2002, Berek C, et al 1997, Kim HJ, et al 1999, Kim HJ, et al 2000). Sur les biopsies rénales de patients lupiques, il a été observé une augmentation du nombre de T CD4⁺ ICOS⁺ en comparaison avec des sujets sains, ces T CD4⁺ étaient situés à proximité des PCs (Hutloff A, et al 2004). Comme mentionné dans la partie précédente, plusieurs études ont suggéré un rôle des TFH dans la survie plasmocytaire en dehors de la moelle (Rodriguez-Bayona B, et al 2013, Rodriguez-Bayona B, et al 2015, Withers DR, et al 2007). Une autre étude semble conforter cette hypothèse, de façon indirecte. Les T régulateurs (Treg) ont un rôle inhibiteur sur les LT, notamment les TFH. Sur un modèle murin de rhumatisme inflammatoire K/BxN déficient en Treg, il a été observé une augmentation significative des T CD4⁺ à la fois extra-folliculaires et folliculaires dans la rate associée à une augmentation des GC. De façon intéressante, il a été également constaté une accumulation de PCs dans la rate, de surcroit de longue vie d'après les expériences avec le BrdU et majoritairement résistants au cyclophosphamide. Ces PCs se différencient des PCs habituellement retrouvés dans le modèle K/BxN qui sont pour la quasitotalité de courte durée de vie et sensibles au cyclophosphamide. Les souris K/BxN déficientes en Treg avaient un phénotype clinique plus sévère que celles qui ne l'étaient pas. Le déficit en Treg

semble donc favoriser l'émergence des PCs de longue vie, à la fois du fait de l'absence d'apoptose par effet cytotoxique médié par les Treg sur les PCs, et de façon indirecte, en favorisant l'expansion des TFH qui pourraient contribuer au maintien et/ou à la différenciation des PCs en PCs à longue vie. Ceci n'a cependant pas été prouvé de façon directe dans cette étude (Jang E, et al 2011). Les tissus inflammatoires contiennent donc potentiellement BAFF, IL-6 et des TFH. La co-localisation de BAFF et IL-6 avec les TFH pourrait potentialiser l'activation et l'expansion des TFH. En effet, comme mentionné précédemment, BAFF active les T CD4⁺ (Huard B, et al 2001, Huard B, et al 2004, Ng LG, et al 2004). Une autre étude a associé une augmentation de l'IL-6 à une prolifération des TFH et à la production d'IL-21. Sur le modèle murin lupique BXBS Yaa muté pour TLR7, l'activation de TLR7 induit une production excessive d'IL-6. Le taux d'IL-6 était corrélé à une augmentation de la production d'auto-Ac et à la progression de la maladie. Ce modèle murin présentait également un excès de TFH et de production d'IL-21. Le modèle BXBS Yaa déficient pour IL-6 avait significativement moins de TFH dans la rate, de production d'IL-21, de sécrétion d'auto-Ac, d'atteinte rénale, la mortalité était donc réduite (Jain S, et al 2016). Ainsi, de façon analogue à l'action synergique des facteurs de survie plasmocytaires dans la moelle en situation normale, on pourrait supposer un système similaire dans les tissus inflammatoires dans le contexte auto-immun, où l'augmentation de BAFF et IL-6 favoriserait l'activation et l'expansion des TFH, ces 3 facteurs participant au maintien des PCs localement, associés possiblement à d'autres facteurs. De façon intéressante, en situation auto-immune, les PCs pourraient eux-mêmes exercer un effet de rétrocontrôle positif sur les TFH. En situation normale, les PCs exercent un feed-back négatif sur les TFH, permettant de réguler la réponse immune (Pelletier N, et al 2010). Une étude récente sur le modèle murin de rhumatisme inflammatoire K/BxNsf a montré que les PCs CD138⁺B220^{low} de la rate pouvaient activer in vitro les T CD4⁺. Ces T CD4⁺ acquièrent le phénotype CD44⁺, parmi lesquels une plus grande proportion de T CD4⁺ exprime Bcl6 comparé à l'activation induite par des PCs ou des DC de souris non auto-immunes. Les T CD4⁺ Bcl6⁺ issus de cette différenciation in vitro sont fonctionnels et sont les plus efficaces lorsqu'ils sont remis en culture avec des cellules B autologues pour induire la différenciation en PCs sécréteurs d'Ac, cet effet est bloqué en présence d'un inhibiteur de l'IL-21. Enfin, le transfert adoptif des PCs spléniques issus des souris K/BxNsf chez des souris non auto-immunes induit le développement spontané de TFH dans les ganglions. Selon ce modèle, les TFH participent à la différenciation et au maintien des PCs, potentiellement auto-réactifs, qui à leur tour favorisent leur développement et leur activation, entretenant la réponse auto-immune (Jang E, et al 2016).

Compte-tenu de leur importance dans la pathogénie des MAI, les cellules B ont logiquement représenté une cible de choix des nouvelles biothérapies.

2- Conséquences: avènement des biothérapies ciblant les lymphocytes B dans le traitement des maladies auto-immunes

2a- Ac monoclonal anti-CD20

Historiquement, pendant des décennies, la corticothérapie et les traitements immunosuppresseurs ont représenté les deux principaux piliers de la prise en charge des MAI. Les traitements immunosuppresseurs, en premier lieu le cyclophosphamide, ont été une avancée majeure puisqu'ils ont transformé le pronostic vital des MAI, notamment celui des vascularites à ANCA dont l'espérance de vie est passée de moins de 10% à plus de 90% à 5 ans. Cependant, le cyclophosphamide est un agent immunosuppresseur non spécifique grevé de lourds effets secondaires comprenant infections, stérilité et cancer de vessie. D'autres traitements immunosuppresseurs, toujours non spécifiques mais moins toxiques, ont par la suite été approuvés dans la prise en charge des MAI, tels que le mycophénolate mofétil, le méthotrexate ou l'azathioprine, mais avec une efficacité moindre que le cyclophosphamide, donc non recommandés en première intention dans les formes avec menace du pronostic vital immédiat. Ces traitements immunosuppresseurs sont des agents alkylants qui visent les cellules en cycle donc en cours de division. En particulier, ces agents déplètent les cellules B sans atteindre les PCs de longue vie. Des traitements associés plus ciblés sur les B ont prouvé leur intérêt dans certaines MAI. Par exemple, les échanges plasmatiques sont indiqués dans les formes graves rénales de vascularites à ANCA ou le syndrome de Devic (affection neurologique médiée par les auto-Ac anti-aquaporine 4), tandis que les immunoglobulines intraveineuses (IgIV) ont montré leur intérêt au cours du PTI sévère, les formes graves de dermatomyosite ou lors d'une crise aigue de myasthénie. Les échanges plasmatiques sont utilisés dans l'objectif d'éliminer du plasma les auto-Ac pathogènes et les complexes immuns tandis que l'effet des IgIV passe, entre autres mécanismes, par le blocage des Fc des cellules B produisant des auto-Ac. Ces traitements ne sont cependant que des traitements d'appoint, avec un effet suspensif transitoire utile en situation d'urgence.

Une nouvelle révolution dans la prise en charge des MAI a eu lieu dans les années 2000 avec le développement des biothérapies ciblant les cellules B, en premier lieu l'Ac monoclonal anti-CD20. CD20 est une glycoprotéine transmembranaire exclusivement exprimée sur les LB normaux ou malins, depuis le stade pré-B jusqu'aux B matures, excluant les pro-B et les PCs. L'Ac anti-CD20 a donc l'avantage de ne pas cibler les PCs de la moelle sécréteurs d'Ac

protecteurs et de permettre à distance du traitement une reconstitution B à partir des progéniteurs immatures de la moelle. Le premier Ac monoclonal anti-CD20 mis au point et approuvé était un Ac chimérique homme-souris, composé de régions constantes Fc d'une IgG1 kappa humaine et de la partie variable des chaines lourdes et légères de souris (rituximab, Genentech). L'Ac anti-CD20 induit la déplétion B de plusieurs façons. Le complexe Ag CD20-Ac anti-CD20 active la voie intrinsèque apoptotique de la cellule via la signalisation CD20. Mais l'effet déplétant est principalement médié par l'interaction du fragment Fc de l'IgG1 humaine avec le FcyR de cellules effectrices comprenant les cellules natural killer (NK), les neutrophiles, les monocytes et les macrophages qui vont exercer leur effet cytotoxique sur les cellules cibles CD20⁺ (effet cytotoxique cellulaire Ac-dépendant = ADCC). Les cellules effectrices expriment principalement le FcyRIIIa (CD16a). Enfin, l'Ac anti-CD20 active la voie du complément qui, en formant le complexe d'attaque membranaire, va aussi avoir un effet cytotoxique sur les cellules B (Pescovitz MD, et al 2006). Chez la souris, l'Ac murin anti-CD20 IgG2a 18B12 (Genentech) est considéré comme l'équivalent du rituximab, étant le plus efficace pour induire la déplétion B. Des différences existent cependant avec le rituximab, notamment son effet déplétant semble indépendant de la voie du complément, la déplétion des BZM et des B des GC est moins efficace que chez l'homme, la fraction Fc de l'IgG2a murine n'active probablement pas tout à fait les mêmes cellules effectrices que la fraction Fc de l'IgG1 humaine. Malgré tout, cet Ac est le plus utilisé chez la souris (Bekar KW, et al 2010).

Le traitement anti-CD20 a obtenu sa première autorisation d'utilisation dans les lymphomes B de bas grade (McLaughlin P, et al 1998). Par la suite, le rituximab a fait l'objet de multiples essais thérapeutiques dans les MAI considérées comme B-médiées, avec des résultats hétérogènes. Au cours de la PR et des vascularites à ANCA, des essais contrôlés randomisés en double aveugle sur de larges effectifs ont prouvé une efficacité du rituximab au moins similaire à celle des agents immunosuppresseurs conventionnels associée à une bonne tolérance (Edwards JC, et al 2004, Stone JH, et al 2010). Le rituximab a donc obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) dans ces 2 indications. Au cours du PTI chronique, les résultats étaient plus modestes avec une réponse initiale chez environ 50 % des patients (Stasi R, et al 2001, Khellaf M, et al 2014). Dans un essai de phase III sur 120 patients présentant un syndrome de Gougerot-Sjogren (SGS) primaire, le rituximab n'a pas montré de bénéfice comparé au placebo (Devauchelle-Pensec R, et al 2014). Les résultats se sont aussi révélés décevants au cours du lupus, considéré comme la MAI médiée par les cellules B par excellence. Pourtant, dans le modèle murin lupique NZB/W, les résultats de la déplétion B par anti-CD20 étaient encourageants, à la fois dans la prévention et dans l'amélioration des signes cliniques au stade avancé, y compris rénal (Bekar KW, et al 2010). Chez l'homme, de nombreux essais ouverts sur de petits effectifs au cours du lupus réfractaire avaient indiqué une réponse chez 60% des patients à la fois dans les formes cutanéo-articulaires et rénales (Leandro MJ, et al 2002, Looney RJ, et al 2004, Sfikakis PP, et al 2005, Ng KP, et al 2007, Cambridge G, et al 2008). Par la suite, 2 grands essais contrôlés randomisés en double-aveugle dans les formes modérées à sévères de lupus extra-rénal et rénal ont échoué à prouver un bénéfice du rituximab versus placebo en association avec d'autres traitements immunosuppresseurs (Merrill JT, et al 2010, Rovin BH, et al 2012). L'usage des corticoïdes à fortes doses et l'association d'emblée à d'autres immunosuppresseurs ont peut-être masqué l'action propre du rituximab. Par ailleurs, des différences existaient en termes de réponses clinique et sérologique en faveur du rituximab, sans pour autant remplir le critère d'étude principal qui était probablement trop ambitieux (réponse avec le rituximab supérieure de plus de 20% par rapport au placebo). En effet, une autre étude prospective a montré une efficacité du rituximab similaire à celle du cyclophosphamide per os dans le lupus néphritique en rechute (Moroni G, et al 2012). Sur une étude prospective à partir d'un registre français de 136 patients, une réponse de l'ordre de 70-75% était observée dans les formes cutanée, articulaire et rénale, et jusqu'à 88% pour les formes hématologiques, que le rituximab ait été utilisé seul ou en association avec d'autres traitements immunosuppresseurs (Terrier B, et al 2010). Des études ont cherché à comprendre l'hétérogénéité des réponses selon les essais alors que la place des B semble centrale dans la physiopathologie du lupus. Le rituximab n'était peut-être pas le meilleur Ac anti-CD20. L'efficacité du rituximab tient principalement de son effet ADCC. Or la qualité de l'effet ADCC est dépendante de l'interaction Fc de l'Ac anti-CD20 avec le FcyR des cellules effectrices, en premier lieu le FcyRIIIa (CD16a). Ainsi, les patients lupiques avant un polymorphisme de FcyRIIIa responsable d'une faible affinité pour le fragment Fc de l'Ac monoclonal répondent moins bien au rituximab (Anolik JH, et al 2003). De plus, le rituximab est un Ac chimérique donc à risque d'induire une réponse immune et une résistance au traitement. Effectivement, en reprenant plusieurs séries de patients traités par rituximab pour une PR, 11% d'entre eux avaient développé au moins une fois des Ac antichimériques humains durant le traitement, mais la détection de ces Ac n'était associée ni à un risque accru de réaction allergique à la perfusion suivante de rituximab ni à une moins bonne réponse (Van Vollenhoven RF, et al 2010).

Dans l'hypothèse d'une meilleure efficacité de la déplétion B, des essais avec des Ac monoclonaux anti-CD20 entièrement humanisés, parmi lesquels l'ocrelizumab, ont été menés au cours de la PR et du lupus. L'ocrelizumab se distingue du rituximab par un meilleur effet ADCC mais un moindre effet cytotoxique médié par le complément. Plusieurs essais contrôlés prospectifs sur de très grands effectifs ont montré une réponse significative à l'ocrelizumab versus placebo dans les PR réfractaires au méthotrexate ou aux anti-TNF α , mais le taux de réponse était similaire à celui du rituximab avec un risque accru d'infections sévères dose-dépendant. L'ocrelizumab ne

présentait donc pas de bénéfice comparé au rituximab dans la PR, au contraire (Rigby W, et al 2012, Tak PP, et al 2012, Emery P, et al 2014). L'essai de phase III avec l'ocrelizumab dans le lupus extra-rénal a dû être arrêté prématurément du fait d'effets secondaires graves. L'essai réalisé dans le lupus néphritique a mis en évidence un bénéfice de l'association ocrelizumab avec le cyclophosphamide à faible dose versus placebo ou cyclophosphamide seul mais pas de bénéfice à l'association ocrelizumab + mycophénolate mofétil versus mycophénolate mofétil seul, ce dernier étant probablement déjà plus efficace que le cyclophosphamide seul à faible dose. Cette étude a également été arrêtée prématurément du fait d'une incidence élevée d'infections sévères graves dans le groupe ocrelizumab + mycophénolate mofétil (Mysler EF, et al 2013). Enfin, compte-tenu de l'importance de l'effet ADCC dans la déplétion B, des Ac anti-CD20 entièrement humanisés avec un fragment Fc modifié ont été récemment développés. En particulier, l'ocaratuzumab a été testé dans un essai de phase I/II dans le lymphome folliculaire chez 50 patients non-répondeurs au rituximab et porteurs du polymorphisme FcyRIIIa de faible affinité (Ganjoo KN, et al 2015). Malgré des résultats positifs (30% de réponse), le taux d'effets secondaires graves de près de 30% n'encourage pas à développer son usage en première intention dans les MAI, le rapport bénéficesrisques serait probablement déraisonnable.

Au final, dans la stratégie de déplétion B directe via le CD20, le rituximab reste actuellement le meilleur compromis.

2b- Autres biothérapies ciblant les lymphocytes B

Outre la déplétion directe des B, d'autres thérapeutiques visant les cellules B ont été développées, soit en inhibant la voie de signalisation B soit en privant les LB de leurs facteurs de survie, en particulier BAFF. Les B sont surtout considérés comme la source de production d'auto-Ac mais les LB activés en contexte auto-immun exercent d'autres fonctions à caractère pathogène. La signalisation BCR est essentielle à l'activation des B. L'inhibition de la signalisation BCR représentait donc une approche thérapeutique intéressante. L'epraluzumab est un Ac monoclonal entièrement humanisé ciblant CD22, une glycoprotéine transmembranaire exprimée exclusivement sur les cellules B qui inhibe à l'état physiologique la signalisation BCR. L'epraluzumab accentue l'effet inhibiteur de CD22. En revanche, l'Ac anti-CD22 n'a pas d'effet ADCC ni d'effet cytotoxique médié par le complément donc induit une faible déplétion B (Dorner T, *et al* 2015). Les premiers résultats des études de phase IIb dans le lupus modéré à sévère à l'exclusion des

formes rénales sévères étaient encourageants, basés sur un score clinique composite différent de celui utilisé dans les 2 grands essais qui avaient mis en échec le rituximab dans le lupus (Wallace DJ, *et al* 2014, Wallace DJ, *et al* 2016). Ainsi, cette nouvelle approche thérapeutique est en cours de développement et devrait faire prochainement l'objet d'études de phase III pour confirmer ou non son efficacité.

Comme mentionné précédemment, compte-tenu de l'importance de BAFF dans la différenciation et la survie des cellules B et son implication dans la rupture de tolérance B, il était logique de cibler cette cytokine, de façon directe ou via l'inhibition de ses récepteurs. Cette approche était particulièrement pertinente dans les MAI où le taux de BAFF est spontanément élevé comme dans le lupus, la PR et le SGS (Cheema GS, et al 2001, Groom JR, et al 2002, Stohl W, et al 2003, Tan S, et al 2003). Le belimumab est un Ac monoclonal entièrement humanisé IgG1 qui se lie au BAFF soluble et inhibe son activité biologique. Deux grandes études de phase III (BLISS-52 et BLISS-76) sur plus de 800 patients chacune ont comparé le belimumab versus placebo dans le lupus actif modéré à sévère à l'exclusion des formes rénales sévères, associé ou non à un traitement immunosuppresseur conventionnel. Le critère principal était l'amélioration d'un score clinique composite à 52 semaines du traitement (Navarra SV, et al 2011, Furie R, et al 2011). Les taux de réponse à 1 an étaient de 58% avec BLISS-52 et de 43% dans l'étude BLISS-76, le bénéfice comparé au placebo était de 10% et 14% respectivement, atteignant le seuil de significativité dans les 2 études. Le risque de rechutes sévères était diminué à long terme. En reprenant l'ensemble des données issues de ces 2 études, le belimumab était particulièrement bénéfique dans les formes musculo-squelettiques et cutanéo-articulaires mais une réponse était aussi observée chez les plus rares patients inclus présentant des atteintes rénale, neurologique ou des vascularites (Manzi S, et al 2012). La réponse clinique était associée à une diminution des titres d'auto-Ac. Bien qu'il ait été observé une diminution de toutes les sous-classes d'IgG, IgA et IgM durant le suivi, il n'a pas été rapporté d'hypogammaglobulinémie, l'incidence d'infections sévères était de 7% dans l'étude BLISS-76 (Navarra SV, et al 2011, Furie R, et al 2011). Basé sur ces 2 études, le belimumab a obtenu son AMM aux Etats-Unis et en Europe dans le lupus en échec des traitements conventionnels, excepté dans les formes rénales ou neurologiques sévères. Il est à noter que ces études ont été réalisées sur de très grands effectifs pour mettre en évidence un bénéfice modeste, mais réel de la déplétion B au cours du lupus. L'objectif principal avait été revu à la baisse comparé à celui des études avec le rituximab, les scores d'évaluation étaient moins stringents. Il est donc probable que le rituximab et le belimumab ont une efficacité quasi-similaire mais le rituximab n'a pas reçu d'autorisation officielle au cours du lupus. Le belimumab pourrait aussi avoir un bénéfice dans la PR et le SGS. Cependant, cet effet est modeste, plus important sur

les paramètres biologiques notamment sur la diminution des taux d'auto-Ac que sur les signes cliniques et n'a pour l'instant été montré que dans des études de phase II (Stohl W, *et al* 2013, Mariette X, *et al* 2015). Un essai de phase III est en attente dans le SGS.

Plus récemment, un autre Ac monoclonal anti-BAFF a été développé. Alors que le belimumab n'inhibe que le BAFF soluble, le tabalumab permet d'inhiber à la fois les BAFF soluble et membranaire. Cet Ac correspond à un Ac entièrement humanisé IgG4. Dans les formes de PR réfractaires au méthotrexate, malgré des résultats positifs dans des essais ouverts de phase II, l'étude randomisée en double aveugle versus placebo sur plus de 1000 patients n'a pas mis en évidence de bénéfice du tabalumab (Smolen JS, *et al* 2015). Au cours du lupus, le tabalumab a fait aussi l'objet de 2 grandes études contrôlées versus placebo sur plus de 1000 patients chacune avec des résultats contradictoires, l'une ne trouvant pas de bénéfice, l'autre si (Isenberg DA, *et al* 2016, Merrill JT, *et al* 2016). Bien que statistiquement significatif, le bénéfice demeurait modeste, mais plus important comparé au placebo dans les formes sévères de lupus (Merrill JT, *et al* 2016). Il est étonnant d'observer des résultats discordants dans de si grandes études alors que le belimumab avait montré un bénéfice dans 2 grands essais de phase III indépendants. La déplétion B, quelque soit l'anti-BAFF, n'est que partielle, de l'ordre de 10% comparé au niveau initial dans le sang périphérique, les B mémoires ne sont pas ou très peu déplétés, contrairement au rituximab.

Enfin, une autre arme thérapeutique, toujours dans l'objectif de cibler les facteurs de survie des B, a été testée, l'atacicept. L'atacicept est une protéine de fusion entièrement humanisée composée de la partie extra-cellulaire de TACI et d'un fragment Fc d'une Ig humaine permettant de bloquer à la fois BAFF et APRIL. Or APRIL est un facteur de survie majeur plasmocytaire donc pourrait avoir un rôle dans les MAI. Les résultats se sont révélés négatifs dans 2 essais de phase II au cours de la PR en échec du méthotrexate ou des anti-TNF α , malgré une diminution des titres de facteur rhumatoide en IgG, IgA et IgM (Van Vollenhoven RF, *et al* 2011, Genovese MC, *et al* 2011). Au cours du lupus, l'essai testant l'association atacicept et mycophénolate mofétil a dû être arrêté prématurément après inclusion de seulement 6 patients du fait de la survenue de plusieurs cas d'hypogammaglobulinémie profonde et d'infections sévères (Ginzler EM, *et al* 2012). Un autre essai de phase III a montré un potentiel bénéfice de l'atacicept à fortes doses dans le lupus modéré à sévère mais ce bras a été arrêté prématurément en raison de 2 décès survenus liés à des infections pulmonaires graves mais sans hypogammaglobulinémie, tandis que l'atacicept à plus faible dose n'a pas prouvé de bénéfice comparé au placebo (Isenberg D, *et al* 2015).

Au total, la littérature scientifique est aujourd'hui inondée d'essais thérapeutiques ciblant les cellules B dans diverses MAI. Ceci prouve l'espoir placé dans ces biothérapies pour allier efficacité et bonne tolérance, et cet espoir est basé à juste titre sur un rationnel scientifique.

Pourtant, nombre de biothérapies se sont soldées par des échecs et/ou étaient dotées d'effets secondaires trop sévères pour l'indication. Au final, seuls 2 traitements ont pour le moment obtenu des autorisations officielles d'utilisation, le rituximab et le belimumab. Le rituximab demeure aujourd'hui le plus utilisé. En effet, si le rituximab n'est officellement autorisé que dans les vascularites à ANCA et la PR en échec des anti-TNF α , son usage dépasse largement ce cadre et s'étend à diverses MAI, notamment le PTI, l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI), le purpura thrombotique thrombocytémique, le syndrome de Devic mais aussi le lupus malgré les résultats négatifs des 2 essais randomisés. Le recul acquis sur le rituximab nous permet aujourd'hui de mieux comprendre ses mécanismes d'action, ses limites et nous impose de l'optimiser car son usage sera encore probablement perenne dans les années à venir au vu de son apport dans l'arsenal thérapeutique.

C- Causes d'échec du rituximab, perspectives thérapeutiques

1- Qualité de la déplétion B

La qualité de la déplétion B est le principal objectif du rituximab. Son évaluation n'est cependant pas aisée, la déplétion B dans le sang périphérique ne reflètant pas forcément celle dans les OLS. De nombreuses études ont tenté de répondre à ces questions en créant un système murin transgénique où les cellules B expriment le CD20 humain et sont déplétés par différents clones d'Ac anti-CD20 humain (Ahuja A, et al 2007). Après 1 injection de rituximab IgG1 ou du clone 2H7 IgG2b chez des souris wild-type BALB/c ou C57BL/6, la déplétion B dans la rate est de l'ordre de 70%, passant à 90% après 4 injections. En utilisant l'anti-CD20 murin 18B12 IgG1 chez ces mêmes souris wild-type, une seule injection induit une déplétion B de 97% dans le sang périphérique, plus de 90% dans les ganglions, 76% dans la rate et seulement 38% dans la cavité péritonéale (Ahuja A, et al 2007). En utilisant l'Ac anti-CD20 murin 18B12 IgG2a, la déplétion après une injection était sensiblement la même dans le sang et les ganglions, mais meilleure dans la rate (91%) et la cavité péritonéale (69%). Dans la moelle osseuse, si les B matures étaient bien déplétés, les B immatures ne l'étaient pas du tout (Bekar KW, et al 2010). De façon intéressante, les souris autoimmunes lupiques sont plus résistantes au traitement par anti-CD20 que les souris normales, quelque soit l'isotype anti-CD20 murin utilisé, à la fois dans les modèles MRL/lpr et NZB/W. Après une injection d'anti-CD20 18B12 IgG2a dans le modèle NZB/W, la déplétion B n'est que de 89% dans le sang, 80% dans les ganglions et 78% dans la rate (Ahuja A, et al 2007,

Bekar KW, et al 2010). Les souris NZB/W étaient d'autant plus résistantes au traitement anti-CD20 qu'elles étaient âgées, fortement protéinuriques et avec une atteinte rénale avancée. Pour la même quantité d'anti-CD20 injecté, le taux d'Ac anti-CD20 était moins élevé dans le serum que chez les souris normales. Cependant, l'Ac n'était pas détectable dans les urines. Le mécanisme de résistance n'était donc pas très clair. La répétition des injections a permis d'obtenir une meilleure déplétion dans les OLS, y compris chez les souris NZB/W (87% dans la rate après 4 injections au lieu de 78%) (Bekar KW, et al 2010). En particulier, un traitement prolongé avec de fortes doses permet de mieux dépléter les 2 populations B les moins sensibles de la rate qui sont les BZM et les cellules B des GC (Ahuja A, et al 2007, Bekar KW, et al 2010). Une autre étude a comparé, toujours dans le modèle NZB/W où les GC sont générés de façon spontanée et permanente, un schéma long comprenant 12 injections d'anti-CD20 à un schéma court de 4 injections. Effectivement, le traitement prolongé impacte de manière plus efficace les cellules B des GC (Wang W, et al 2014). Un traitement prolongé permet d'obtenir une meilleure réponse clinique, qu'il soit administré à la phase précoce ou à la phase tardive de la maladie lupique (Bekar KW, et al 2010, Wang W, et al 2014). Toujours dans l'objectif d'obtenir une meilleure déplétion B, une équipe a testé chez la souris NZB/W avec atteinte rénale avancée l'association de l'anti-CD20 à un inhibiteur de BAFF via l'inhibition de BAFF-R (BR3-Fc). Effectivement, la déplétion B était meilleure dans la rate et les ganglions, mais pas dans le sang ni la moelle osseuse ni la cavité péritonéale (Bekar KW, et al 2010). Une autre étude a testé cette même association et retrouvé un bénéfice clinique chez 3 modèles murins lupiques dont le modèle NZB/W, comparé aux monothérapies anti-CD20, BR3-Fc ou cyclophosphamide. Cette association avait permis, entre autres, d'obtenir une meilleure déplétion de l'ensemble des populations B de la rate, à la fois les B folliculaires, les B des GC et les BZM (Lin W, et al 2015).

Cependant, il est difficile d'établir un strict parallèle avec la déplétion B chez l'homme puisqu'il ne s'agit pas du même clone d'anticorps, et contrairement à la souris, la déplétion lymphocytaire B dans les OLS chez l'homme est quasi-complète, y compris dans un contexte auto-immun. Une équipe a montré qu'au niveau du ganglion, une seule injection d'Ac anti-CD20 suffisait à induire une déplétion B profonde, les cellules B résiduelles correspondaient majoritairement à des cellules B mémoires (Wallin EF, *et al* 2014). Lors de l'analyse des rates de patients splénectomisés pour un PTI ou une AHAI dans les 3 mois suivant le traitement par rituximab, on retrouvait moins de 2% de CD19⁺ résiduels, correspondant à des B mémoires et surtout des PCs (Wallin E, *et al* 2014, Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2015). Pour obtenir une bonne déplétion B, des injections répétées sont en général nécessaires. Le schéma 375 mg/m2 par semaine pendant 4 semaines est le plus utilisé, l'alternative pouvant être 1g 2 injections à 15 jours d'intervalle (Looney RJ, *et al* 2004, Anolik JH, *et al* 2003). Il a été suggéré, au cours de la PR et du lupus,

qu'une déplétion B incomplète dans le sang était associée à une moins bonne réponse clinique, sans précision sur le compartiment B dans les OLS (Leandro MJ, *et al* 2006, Anolik JH, *et al* 2007, Vital EM, *et al* 2011).

2- Absence de restauration de la tolérance B

L'une des problématiques posées par le traitement anti-CD20 est la survenue de rechutes chez certain patients, aprés la reconstitution lymphocytaire B, suggérant qu'il existe un nouvel évènement de rupture de tolérance conduisant à la réapparition de la maladie. Plusieurs équipes ont analysé la répartition des sous-populations B au moment de la reconstitution immunitaire et les ont comparées à la répartition avant traitement par rituximab. Au cours du lupus, de la PR ou des vascularites à ANCA, les LB naifs sont en général diminués tandis que la proportion de LB mémoires switchés et de plasmablastes est augmentée (Anolik JH, et al 2004). L'analyse à 6 à 9 mois après le traitement par rituximab, soit au moment de la reconstitution immunitaire, montre une normalisation de ces populations, les B immatures et transitionnels deviennent la population dominante avant que les LB matures naifs prennent le relais. Les B mémoires n'apparaissent que plus tardivement et restent à un taux nettement inférieur comparé à celui avant traitement (Anolik JH, et al 2004, Leandro MJ, et al 2006, Roll P, et al 2006, Venhoff N, et al 2014). La prédominance de cellules B immatures et transitionnelles CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} et, à l'inverse, l'absence persistante des cellules B mémoires, étaient significativement associées à une réponse prolongée et à un moindre risque de rechute (Md Yusof MY, et al 2015, Anolik JH, et al 2007). Ces données étaient intéressantes car suggéraient un rétablissement de la tolérance immunitaire sous rituximab. Initialement étudiés dans des modèles murins auto-immuns d'encéphalite autoimmune, de colite inflammatoire et de rhumatisme inflammatoire chronique associé au collagène, les B regulateurs (Breg) jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation médiée par les T via la production de l'IL10 (Fillatreau S, et al 2002, Mauri C, et al 2003, Mizoguchi A, et al 2002). Les Breg inhibent notamment la différenciation des TCD4⁺ en Th1 et Th17, et favoriseraient celle des T régulateurs. Les Breg sont Ags spécifiques, la signalisation par le CD40 est primordiale, impliquant une collaboration avec les TCD4⁺. Chez l'homme, une population B équivalente productrice d'IL10 a aussi été retrouvée au sein des B immatures CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, capable d'inhiber la réponse Th1. Or cette population B n'aurait pas les mêmes capacités inhibitrices chez les patients lupiques (Blair PA, et al 2010). La même équipe a récemment suggéré que les patients lupiques auraient un défaut d'interaction entre les cellules dendiriques plasmacytoides (pDC) et

les B immatures CD24^{hi}CD38^{hi} qui mène théoriquement à la différenciation en LB producteurs d'IL10. Inversement, les Breg CD24⁺CD38^{hi} contrôleraient la production d'IFNa des pDC via l'IL10. Chez les lupiques, l'excès d'IFNa produit par les pDC induirait un défaut d'expansion des Breg qui ne peuvent exercer de rétrocontrôle négatif sur les pDC et la production d'IFNa. Cette même équipe a ensuite suggéré que les patients lupiques ayant répondu au rituximab restauraient leur capacité de production de Breg, les pDC exprimant moins de marqueurs d'activation tandis que chez les non répondeurs au rituximab, les pDC gardaient un phénotype activé et les Breg n'étaient pas restaurés (Menon M, et al 2016). Il est donc possible d'imaginer que les réponses prolongées aprés rituximab qui sont associées à une expansion des cellules B transitionnelles soient associées à une repopulation de Breg et donc une restauration de la tolérance. Plusieurs équipes se sont aussi intéressées aux Breg dans les vascularites à ANCA et leur évolution après rituximab. En utilisant les marqueurs des cellules transitionnelles CD24^{hi}CD38^{hi} donc peu spécifiques des Breg, il existait une tendance à une augmentation de cette population après traitement par rituximab (Todd SK, et al 2014). Une étude a tenté d'en évaluer la pertinence comme facteur prédictif de réponse prolongée. Cependant, en identifiant les Breg avec le phénotype CD19⁺CD5⁺, les résultats étaient peu probants (Unizoni S, et al 2015). Il n'existe donc pas de réponse très claire à l'heure actuelle, cela nécessiterait un suivi prospectif à long terme après rituximab et une identification des Breg avec des marqueurs plus spécifiques.

En tout état de cause, le taux de rechutes observées dans la quasi-totalité des MAI à distance du traitement anti-CD20 malgré une réponse satisfaisante initiale ne plaide pas en faveur d'une restauration de la tolérance avec le rituximab. Alors que les rechutes précoces sont généralement associées à une déplétion incomplète des B mémoires, les rechutes tardives sont quasisystématiquement observées après reconstitution immunitaire, dans un délai variable allant de deux mois à plusieurs années après (Leandro MJ, et al 2006, Keogh KA, et al 2005, Venhoff N, et al 2014). Outre la reconstitution B, les rechutes, que ce soit dans la PR ou au cours des vascularites à ANCA, étaient généralement associées à une ré-augmentation des titres d'auto-Ac (Leandro MJ, et al 2006). Ces données suggèrent donc que des clones auto-réactifs ont été de nouveau sélectionnés à partir des B immatures. Une étude récente s'est intéressée au répertoire B de patients diabétiques de type 1 avant et 52 semaines après la fin du traitement par rituximab. Comme attendu, lors de la reconstitution B, il a été observé une augmentation significative des B immatures transitionnels nouvellement émigrés de la moelle osseuse, tandis que les B mémoires étaient franchement diminués. Après traitement, la fréquence des B polyréactifs et autoréactifs était aussi élevée dans le sang qu'avant traitement, suggérant une sélection de clones autoréactifs à partir des LB nouvellement générés. Basé sur ces résultats, cette étude a conclu que le rituximab n'avait pas d'incidence sur l'évolution naturelle des MAI, son effet n'étant que suspensif et provisoire. Cette étude ne peut cependant pas exclure de façon formelle une réémergence de clones auto-réactifs à partir des cellules B mémoires résiduelles ayant échappé à la déplétion B (Chamberlain N, *et al* 2016).

Compten-tenu de l'importance de BAFF dans la rupture de tolérance B, un lien entre BAFF et le risque de rechutes après rituximab a été recherché. En effet, plusieurs études ont observé une augmentation de BAFF après traitement par rituximab au cours du lupus, de la PR et du SGS (Lavie F, et al 2007, Cambridge G, et al 2008, Carter LM, et al 2013). De façon intéressante, non seulement BAFF était augmenté en expression protéique de façon précoce après injection de rituximab, traduisant l'augmentation de BAFF disponible suite à l'induction de la lymphopénie B, mais BAFF était aussi augmenté en ARN messager dans les cellules mononucléées, pouvant signifier la mise en place d'un mécanisme compensatoire pour pallier à la déplétion B (Lavie F, et al 2007). Cependant, dans une étude sur des patients lupiques, malgré une augmentation de BAFF après rituximab, Cambridge et al ne lui ont pas trouvé d'association avec le risque de rechute, celui-ci était plutôt lié au taux initialement élevé de BAFF avant rituximab (Cambridge G, et al 2008). Chamberlain et al n'ont pas trouvé non plus d'association entre le taux de BAFF et la resélection de clones autoréactifs à partir des B immatures dans le diabète de type 1 (Chamberlain N, et al 2016). L'augmentation constante de BAFF qui persiste dans les 6 mois suivant la déplétion B, pourrait favoriser la survie de clones autoréactifs en périphérie, Dans cette optique, 2 essais ouverts et un essai contrôlé randomisé en double aveugle dans le lupus rénal et non rénal sont en cours pour évaluer l'intérêt du traitement séquentiel par rituximab suivi du belimumab 15 jours après la dernière injection, l'idée étant de diminuer le nombre de clone B autoréactifs lors de la reconstitution immunitaire B (Ehrenstein MR, et al 2016). Un papier a rapporté des résultats encourageants sur 2 cas de lupus réfractaires au traitement conventionnel ayant répondu au traitement séquentiel par rituximab suivi du belimumab (Kraaij T, et al 2014).

Au total, le rituximab ne semble pas avoir la capacité de restaurer une tolérance B de façon durable. Parmi les répondeurs initiaux, le risque de rechutes est élevé donc un traitement d'entretien est nécessaire. Plusieurs alternatives sont possibles, soit un traitement d'entretien systématique par rituximab qui a fait ses preuves dans les vascularites à ANCA, soit un traitement préemptif en cas de reconstitution B et/ou de ré-augmentation des titres d'auto-Ac (essai MAINRISTAN 2 dans les vascularites à ANCA en cours), soit un traitement séquentiel par rituximab suivi du belimumab dont des essais sont en cours dans le lupus (Guillevin L, *et al* 2014, Ehrenstein MR, *et al*, 2016).

3- Non déplétion des plasmocytes auto-réactifs à longue durée de vie

Si environ 60% des patients répondent au rituximab, près de 40% n'y répondent pas ou seulement de façon partielle, cette proportion variant selon les MAI. Comme mentionné précédemment, une partie des non-réponses peut être liée à une déplétion B incomplète et est accessible à un traitement prolongé par rituximab. Mais d'autres patients ne répondent pas au rituximab pour des raisons différentes. Le rituximab a l'avantage de ne pas cibler les PCs de longue vie protecteurs de la moelle, d'où un risque infectieux limité, mais cela représente aussi un inconvénient. En effet, il existe à présent de nombreuses données pour penser qu'au moins une partie des PCs auto-réactifs sont de longue durée de vie, localisés dans la moelle osseuse, la rate et les tissus inflammatoires, et ne sont pas ciblés par les traitements actuels, qu'il s'agisse du cyclophosphamide ou du rituximab (Hoyer BF, et al 2004, Mumtaz IM, et al 2012, Cheng Q, et al 2013, Espeli M, et al 2011, Khodadadi L, et al 2015). Ces données chez la souris, en particulier dans le modèle NZB/W, sont corroborées chez l'homme par l'observation d'une déplétion le plus souvent seulement partielle des titres d'auto-Ac avec le cyclophosphamide et le rituximab (Anolik JH, et al 2004, Looney RJ, et al 2004, Ng KP, et al 2007). Or, bien que toutes les études ne soient pas unicistes, une corrélation semble exister entre persistance des auto-Ac et activité clinique (Cambridge G, et al 2003, Sfikakis PP, et al 2005, Thurlings RM, et al 2008). De plus, une série d'études chez la souris et l'homme, en obtenant une déplétion complète des PCs auto-réactifs, a montré l'impact sur la réponse clinique et donc leur importance.

Une étude prospective pilote chez 7 patients lupiques réfractaires a testé la combinaison d'une immunoablation complète suivie d'une greffe de cellules souches hématopoiétiques autologues. Outre des corticoides et du cyclophosphamide à fortes doses, les patients ont reçu un traitement par anti-thymoglobuline (ATG) qui cible notamment les PCs de longue vie. Ce traitement combiné a permis une déplétion complète de l'ensemble des cellules B, mais aussi, à la différence des traitements conventionnels, une déplétion complète des Ac anti-dsDNA. Une réponse complète clinique a été observée chez tous les patients. Après greffe de cellules souches, une réponse persistante a été maintenue durant les 8 années de suivi en moyenne, sans réapparition d'auto-Ac, traduisant la restauration d'une tolérance immune (Alexander T, *et al* 2008). Cette étude était une première preuve de l'intérêt à éliminer totalement les PCs auto-réactifs pour obtenir une réponse clinique complète, mais du fait de son large spectre d'action, elle était insuffisante pour prouver que la déplétion des PCs était la principale raison de son efficacité. Il est à noter qu'un tel traitement, aussi lourd et grevé de graves effets secondaires, en particulier infectieux, ne peut être réservé qu'aux formes particulièrement graves et réfractaires aux autres

traitements. D'autres équipes se sont intéressées à cibler plus spécifiquement les PCs avec le bortezomib, un anti-protéasome, qui a déjà fait ses preuves dans le traitement des PCs malins. L'inhibition du protéasome inhibe la voie anti-apoptotique NFKB et induit l'accumulation de protéines dans le cytoplasme, générant un stress du reticulum endoplasmique d'où l'apoptose de la cellule. Dû à leur haut niveau de synthèse protéique, les PCs sont particulièrement sensibles à l'inhibition du protéasome. Le bortezomib a d'abord été testé dans les modèles murins NZB/W et MRL/lpr. En distinguant les PCs de courte et longue durée de vie en fonction de l'incorporation du BrdU, cette étude a montré que le bortezomib avait une action déplétante sur les 2 populations plasmocytaires, dès 48h après la première injection, à la fois dans la rate et la moelle osseuse, permettant d'obtenir un taux indétectable d'Ac anti-dsDNA dans le serum. Le bortezomib était efficace à la fois dans la prévention de l'apparition de la glomérulonéphrite mais aussi en curatif, permettant une amélioration de la survie (Neubert K, et al 2008). Dans une autre étude, en comparant le cyclophosphamide et le bortezomib en monothérapies, toujours dans le modèle NZB/W, seul le bortezomib est parvenu à dépléter les PCs de longue vie de la rate et de la moelle osseuse (Taddeo A, et al 2015). Comme mentionné précédemment, chez l'homme, les PCs les plus matures de la moelle ont été récemment identifiés avec le phénotype CD19⁻. Ces PCs CD19⁻ ne sont présents que dans la moelle chez le sujet sain, mais aussi dans les tissus inflammatoires en situation pathologique. Or, alors que l'anti-CD20 n'affecte que les CD19⁺, le bortezomib est capable de cibler in vitro à la fois les CD19⁺ et les CD19⁻ (Mei HE, et al 2015). Une étude chez 12 patients lupiques réfractaires aux traitements conventionnels a conforté l'intérêt de l'usage du bortezomib associé à la dexaméthasone puisqu'une amélioration significative du score clinique a été systématiquement observée, associée à une diminution d'environ 60% du titre d'Ac antidsDNA. Le fait que le titre d'auto-Ac n'ait pas diminué avec les traitements conventionnels précédemment administrés mais seulement sous bortezomib évoque une production des auto-Ac par des PCs de longue vie. Outre la déplétion des PCs auto-réactifs, le bortezomib down-régule aussi l'activité IFN de type I, caractéristique du lupus (Alexander T, et al 2015). De façon intéressante, à la fois chez la souris et chez l'homme, le bortezomib induit un effet différentiel sur les titres d'auto-Ac et d'Ac protecteurs, ces derniers étant moins altérés (Neubert K, et al 2008, Taddeo A, et al 2015, Alexander T, et al 2015). Le bortezomib a aussi montré des résultats encourageants dans le purpura thrombotique thrombocytopénique, une MAI médiée par les Ac anti-ADAMTS13, chez 5 patients auparavant réfractaires aux traitements standards comprenant échanges plasmatiques, méthylprednisolone et rituximab. La réponse clinique était associée à une déplétion des auto-Ac et le rétablissement de l'activité ADAMTS13 (Patriquin CJ, et al 2016). Cependant, le bortezomib a des limites. En effet, au cours du lupus qui se caractérise par une réponse B intense et continue, que ce soit chez l'homme ou la souris, dès l'arrêt du bortezomib, les

titres d'Ac notamment d'auto-Ac réaugmentent rapidement du fait de l'absence de déplétion des précurseurs, ce qui à terme risque de mener à une rechute clinique (Neubert K, et al 2008, Alexander T, et al 2015). Le bortezomib ne peut être maintenu indéfiniment, dans l'étude sur les 12 patients lupiques, 58% ont dû l'arrêter pour mauvaise tolérance, en particulier neurologique. Malgré un effet différentiel sur les Ac protecteurs, il est probable qu'un traitement prolongé induise une hypogammaglobulinémie et un risque infectieux grave important. De plus, d'un point de vue physiopathologique, son maintien en monothérapie n'est pas justifié, une combinaison avec une déplétion des précurseurs semble plus pertinente. Des associations du bortezomib avec le cyclophosphamide ou le rituximab ont été testées dans le modèle NZB/W. Effectivement, l'association du bortezomib avec l'un ou l'autre de ces traitements, maintenus ensuite en monothérapie en entretien, prévient la ré-augmentation des titres d'auto-Ac (Taddeo A, et al 2015, Khodadadi L, et al 2015). En particulier la combinaison bortezomib + anti-CD20 retarde l'apparition des signes rénaux et améliore le taux de survie (Khodadadi L, et al 2015). Il serait donc intéressant de tester la combinaison bortezomib + rituximab dans des essais contrôlés au cours des formes réfractaires de lupus mais aussi d'autres MAI où les auto-Ac jouent un rôle pathogène important.

Au final, de nouvelles combinaisons permettant de cibler à la fois les précurseurs B et les PCs auto-réactifs de longue vie feront probablement très prochainement l'objet d'essais contrôlés, en particulier dans le lupus. Cependant, elles ne seront à réserver qu'aux formes sévères, réfractaires aux traitements conventionnels étant donné le risque d'infectieux induit par la déplétion non spécifique de l'ensemble des PCs, dont ceux sécréteurs d'Ac protecteurs. L'idéal serait donc d'identifier et de cibler un facteur de survie plasmocytaire essentiel en contexte auto-immun sans dépléter les PCs protecteurs de la moelle. Etant donné son augmentation dans le serum et les tissus inflammatoires de nombreuses MAI, avec un rôle plus secondaire dans la survie des PCs de la moelle, BAFF pourrait être cette cible. Les essais en cours dans le lupus associant rituximab + belimumab, bien qu'administrés de façon séquentielle dans l'optique de restaurer la tolérance B lors de la reconstitution, devraient apporter des éléments de réponse.

4- Différenciation paradoxale des PCs auto-réactifs en PCs à longue durée de vie

Enfin, récemment, une autre cause d'échec du rituximab été identifiée par notre labloratoire dans le contexte de 2 cytopénies auto-immunes, le PTI et l'AHAI. Ces 2 MAI se caractérisent au niveau de la rate par une intense réponse B avec de nombreux GC et plasmablastes, qui sont pour une partie autoréactifs, dirigés contre les plaquettes dans le PTI et les globules rouges dans l'AHAI. La splénectomie a longtemps représenté le « gold standard » dans la prise en charge de ces 2 MAI. Cependant, ce traitement chirurgical n'est pas dénué de complications graves à court et long termes, notamment infectieuses et thrombo-emboliques. La recherche et le développement de traitements médicamenteux tout aussi efficace mais grevés de moins d'effets secondaires étaient donc justifiés. Aussi, comme dans de nombreuses autres MAI, le rituximab a été testé dans ces 2 indications. Malheureusement, les résultats se sont révélés relativement décevants, surtout dans le PTI où le taux de réponse initiale n'était que de 40%, et de 70% dans l'AHAI (Stasi R, et al 2001). En cas d'échec du rituximab, une indication à la splénectomie était posée dans un 2^e temps. Ainsi, des rates de patients atteints de PTI ou d'AHAI ont pu être analysées, certains avaient reçu auparavant du rituximab, d'autres ont été splénectomisés d'emblée. Ces rates auto-immunes ont été comparées à des rates de sujets sains. Les PCs ont été identifiés avec le phénotype CD19⁺CD27⁺CD38^{hi}HLA-DR^{low}Ki67⁻, les plasmablastes avec le phénotype CD19⁺CD27⁺CD38^{hi}HLA-DR^{hi} Ki67⁺. Ces populations plasmocytaires ont d'abord été analysées au niveau transcriptomique puis les 15 gènes considérés comme les plus discriminants ont ensuite été sélectionnés pour établir les signatures plasmablastique, plasmocytaire et inclassée lors de l'analyse à l'échelle unicellulaire. De ces comparaisons, plusieurs faits intéressants et paradoxaux en sont ressortis. En premier lieu, il n'y a pas de PCs spontanément à longue durée de vie dans la rate malgré une intense réponse B auto-immune, que ce soit dans le PTI ou l'AHAI, à la différence de ce qui a été rapporté dans le lupus chez la souris. Ces PCs spléniques ont un profil similaire à celui des PCs des rates de sujets sains, plus de 75% des PCs ont une signature inclassée c'est-àdire intermédiaire entre plasmablastes et PCs matures. En revanche, le profil des PCs des patients PTI traités par rituximab avant d'être splénectomisés diffère nettement, 84% de ces PCs ont une signature de PCs à longue vie. Ils se distinguent en particulier par une surexpression des gènes de régulation du cycle cellulaire et anti-apoptotiques klf6, klf9, tnfaip3 et atf3. Des résultats similaires ont été observés au cours de l'AHAI, le profil des PCs spléniques non exposés au rituximab était intermédiaire, celui des PCs après rituximab était plus mature et proche de celui des PCs de longue vie de la moelle osseuse. L'observation dans 2 MAI distinctes d'un processus de différenciation des PCs de la rate en PCs plus matures sous traitement par rituximab suggérait un mécanisme

général lié à l'anti-CD20 plutôt qu'à une MAI en particulier. Ces observations étaient d'autant plus importantes qu'une partie des PCs devenus plus matures de la rate étaient auto-réactifs. Etant donné l'absence d'autres populations B résiduelles hormis de rares B mémoires, la persistance de la sécrétion d'auto-Ac dans la rate pouvait expliquer l'échec du rituximab, ce qui a été confirmé par la réponse à la splénectomie dans la quasi-totalité des cas, à la fois dans le PTI et l'AHAI.

Comme mentionné précédemment, les PCs nécessitent des facteurs de survie pour se maintenir, quelque soit le lieu où ils se situent. Seul BAFF a été retrouvé augmenté de façon significative dans le milieu splénique dans la condition anti-CD20 comparé à la condition non anti-CD20 des rates de PTI et d'AHAI, IL6 et APRIL étaient inchangés. En revanche, le taux de BAFF dans le milieu splénique chez les patients PTI non traités par rituximab n'était pas différent de celui des sujets sains (Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2015).

Au cours du syndome de Gougerot-Sjogren primaire, le rituximab n'a pas démontré d'efficacité dans l'essai de phase III (Devauchelle-Pensec R, *et al* 2014). Or une étude récente a établi une corrélation entre un taux initialement élevé de BAFF et l'absence de réponse au rituximab. Aussi, peut se poser là encore la question d'un mécanisme de différenciation paradoxale des PCs autoréactifs, favorisé par un taux initialement élevé de BAFF et amplifié par l'augmentation de BAFF suite à la déplétion B (Cornec D, *et al* 2016).

Au total, les causes de non réponse au rituximab peuvent être multiples et différer d'une MAI à une autre. Ces mécanismes ne s'excluent pas mutuellement d'ailleurs. Ainsi, bien que des PCs de longue vie pré-existants ont été décrits dans certaines MAI telles que le lupus, peut se poser la question d'un processus supplémentaire de différenciation paradoxale des PCs qui n'étaient pas à longue vie en PCs plus matures sous anti-CD20. Ce processus pourrait avoir lieu dans la rate, mais peut-être aussi dans d'autres sites inflammatoires tels que le rein, augmentant le risque de non réponse au rituximab. De façon intéressante, quelque soit la cause imputée à l'échec du rituximab, BAFF semble jouer un rôle pivot.

Mon travail de thèse s'est attaché à détailler et mieux comprendre le mécanisme de différenciation paradoxale des PCs "normaux" en PCs de longue vie sous anti-CD20. En effet, nous avons cherché à savoir si ce processus de maturation paradoxale était général en prenant comme modèles d'étude les modèles murins non auto-immun AID-Cre-ERT2 x Rosa26-loxP-EYFP (AID-Cre-EYFP) et auto-immun NZB/NZW. Le modèle AID-Cre-EYFP présente l'avantage de marquer de façon irréversible par l'administration du tamoxifène à des temps donnés de la réponse immune et donc de suivre in vivo les plasmocytes qui ont été générés suite à une réponse immune GC-dépendante tandis que le modèle NZB/NZW permet d'observer le processus de différenciation
plasmocytaire dans un contexte auto-immun, plus proche de ce qui est observé chez l'homme. Comprendre les mécanismes de différenciation et tenter de bloquer ce processus ont fait partie des principaux enjeux de ce travail.

Les résultats sont présentés dans l'article ci-après.

II-RESULTATS

Présentation de l'article

En situation pathologique, les plasmocytes (PC) peuvent être délétères et sécréter des Ac dirigés contre soi et participer au développement de maladies auto-immunes (MAI). Les thérapies ciblées visant les cellules B ont considérablement modifié la prise en charge des MAI médiées par les cellules B, en particulier l'Ac monoclonal anti-CD20 (Rituximab). Pourtant les résultats sont hétérogènes selon les indications et se sont en particulier révélés décevants dans le lupus. Or de précédentes études au cours du purpura thrombopénique immunologique (PTI) et de l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) ont suggéré que l'Ac anti-CD20 induisait de façon paradoxale la différenciation des PC de la rate en plasmocytes de longue durée de vie (PLDV), proches des plasmocyes de longue vie naturels de la moelle osseuse. Certains de ces PLDV étaient auto-réactifs, pouvant expliquer l'échec au Rituximab et le succès de la splénectomie effectuée dans un deuxième temps.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à savoir si le processus de maturation plasmocytaire induit par le traitement anti-CD20 était un processus général et à en déterminer les mécanismes sous-jacents. Nous avons travaillé sur le modèle murin transgénique AID-Cre-EYFP qui permet de marquer irréversiblement par la protéine EYFP les cellules B lors de leur passage dans un centre germinatif au cours d'une réponse immune après ingestion de tamoxifène, puis de les suivre in vivo. Les PC ont été générés par 2 immunisations à 1 mois d'intervalle avec des globules rouges de mouton. Grâce à ce modèle, nous avons pu identifier les PC avec les seuls marqueurs EYFP⁺B220⁻, sans nécessité des autres marqueurs tels que le CD138 dont l'expression est hétérogène au niveau de la rate.

Dans un premier temps, en utilisant le modèle AID-Cre-EYFP, nous avons fait une analyse transcriptomique des PC EYFP⁺ de la rate dits « matures » car analysés plusieurs mois après immunisation avec des globules rouges de mouton. Nous les avons comparés aux PC EYFP⁺ nouvellement générés de la rate, analysés 6 jours après une 3^e immunisation. Parmi les gènes surexprimés par les PC nouvellement générés, nous avons identifié un seul gène de prolifération *Chek1*, le facteur pro-apototique *Bcl2l11* et *CXCR3*, impliqué dans la migration. Parmi les 224 gènes surexprimés (fold >4, P < 0.05) par les PC matures, nous avons identifié des facteurs anti-apoptotiques (*Tnfaip3*, *Bcl2*), des facteurs de transcription (*Nfkb2*, *Runx2*, *Irf8*, *Tox2*, *Klf2*), des régulateurs du signal de transduction (*Btla*), des récepteurs membranaires (*Tnfrsf17*, *IcosL*) et de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire (*Mt2*, *Anxa2*, *Cox15*, *Atp1b1*). Sur la base des résultats de ce transcriptome, nous avons sélectionné des gènes permettant d'établir la

signature plasmocytaire pour l'analyse du programme des plasmocytes à l'échelle unicellulaire dans différents compartiments et différentes conditions (*Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Nfkb2, Tox2, Mt2, Tesc, PerP, Tnfrsf17*).

Nous avons ensuite analysé par RT-PCR multiplex sur cellules uniques le programme transcriptionnel des PC EYFP⁺ de la rate de souris traitées par anti-CD20 et l'avons comparé aux programmes de plasmablastes (analysés 3 jours après une 3^e immunisation), de PC EYFP⁺ de rates contrôles générés de la même façon et analysés au même temps que les PC EYFP⁺ des souris traitées par anti-CD20 et de PC EYFP⁺ de la moelle osseuse. Les souris traitées par anti-CD20 (3 injections) avaient un taux de cellules B résiduelles dans la rate de l'ordre de 2% au nadir de la déplétion B, soit à J50 de la première injection d'anti-CD20. Les gènes sélectionnés pour établir la signature plasmocytaire ont inclus Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Nfkb2, Tox2, Mt2, Tesc, PerP, Tnfrsf17, *Tmem176b*, *Fos* et *Klf6*, provenant essentiellement de notre analyse transcriptomique et complétés avec les données de la littérature. Les genes avant servi à établir la signature plasmablastique ont inclus Chek1, Bcl2111, CXCR3, issus de notre transcriptome, complétés avec des gènes connus pour être impliqués dans la prolifération: Mki67, Bub1, Aurka, Ccnd2 et Rrm2b. Par cette analyse, nous avons pu établir des différences claires entre le programme des PC anti-CD20 et celui des PC de la rate des souris contrôles. Alors que les PC contrôles de la rate présentent un profil intermédiaire, exprimant à la fois peu de gènes de plasmablastes et de PC de longue vie, les PC de la rate des souris traitées par anti-CD20 composent une population homogène exprimant de nombreux gènes de PC, se rapprochant du programme des PLDV de la moelle osseuse. Non seulement le nombre de PC EYFP⁺ ne diminue pas de façon significative dans la rate sous anti-CD20, mais surtout le programme diffère clairement entre les 2 populations. Ces resultats signifient que le traitement anti-CD20 induit un processus de maturation plasmocytaire dans la rate et non une sélection de PLDV pré-existants.

Nous avons ensuite cherché à identifier les facteurs de survie plasmocytaires dans la rate dans le contexte de déplétion B. De même que chez l'homme, le taux de BAFF (B-cell activating factor) augmente à la fois dans le serum et les surnageants spléniques après traitement par anti-CD20. Surtout, la combinaison in vivo des anticorps anti-CD20 et anti-BAFF a permis d'obtenir une diminution drastique (fold > 5, P < 0.001) du nombre de PC EYFP⁺ dans la rate comparé à la condition anti-CD20 seule, significant un rôle majeur de BAFF dans le maintien des PC dans la niche splénique dans le contexte de déplétion B. Au niveau de la moelle, le nombre de PC EYFP⁺ était aussi diminué d'un facteur 2, mais portant majoritairement sur les IgM⁺, nous n'avons pas observé d'hypogammaglobulinémie IgG.

Les granuleux Gr1⁺ co-localisent dans la pulpe rouge de la rate avec les PC EYFP⁺. Leur nombre, ainsi que leurs interactions avec les PC EYFP⁺, augmentent dans le contexte de déplétion B. De plus, nous avons identifié les neutrophiles Gr1⁺Ly6G⁺ comme la principale source de production de BAFF dans la rate, suggérant un possible rôle dans la niche de survie plasmocytaire. Cependant, l'induction d'une population compensatoire Gr1⁺ Ly6G⁻ similaire aux neutrophiles, productrice de BAFF, lors de la déplétion spécifique des neutrophiles Ly6G⁺ in vivo a interféré avec les résultats, empêchant une conclusion formelle sur le rôle des neutrophiles dans la niche splénique.

Enfin, les T CD4⁺ interagissent de façon étroite avec les PC EYFP⁺ de la rate. En les déplétant spécifiquement in vivo, associé à la déplétion B, nous avons observé une diminution (fold >2, P < 0.05) du nombre de PC EYFP⁺ spléniques, signifiant leur participation au maintien des PC dans la niche splénique. Les tests de déplétion des T CD4⁺ in vivo et de co-culture in vitro des PC avec les T CD4⁺ suggèrent que les T CD4⁺ dans le contexte de déplétion B ont un meilleur effet sur la survie des PC que les T CD4⁺ issus de rate de souris non traitées. Ceci signifierait que les T CD4⁺ reçoivent des signaux différents provenant du milieu splénique après traitement par anti-CD20.

Nous avons complété ce travail avec l'analyse des plasmocytes dans le modèle murin lupique NZB/NZW dont la réponse B auto-immune se rapproche plus de la réponse B observée chez l'homme au cours des MAI. En accord avec les résultats obtenus chez le modèle AID-Cre-EYFP, nous avons observé le même processus de différenciation plasmocytaire induit par le traitement anti-CD20 dans la rate, les rapprochant des PLDV de la moelle osseuse. En revanche, nous avons été étonnés d'observer l'absence de PLDV spontanés dans la rate des souris non traitées, à l'âge de 27 semaines. Nous avons également obtenu une diminution significative de toutes les populations plasmocytaires comprenant la fraction de longue vie de la rate avec la combinaison anti-CD20+ anti-BAFF, sans impacter sur le nombre de PC de la moelle.

Au total, nos données suggèrent que la différenciation paradoxale plasmocytaire avec le traitement anti-CD20 est un mécanisme général, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, dans un contexte auto-immun ou non. Nos résultats suggèrent qu'inhiber les facteurs de survie de la niche plasmocytaire, en particulier en utilisant l'anti-BAFF, dans le contexte du traitement par anti-CD20 sera bénéfique dans le traitement des cytopénies auto-immunes. Dans cette optique, un essai au cours du PTI associant anti-CD20+ anti-BAFF débutera prochainement.

L'article ci-après a été écrit en vue d'une soumission dans Journal of Clininal Investigation.

BAFF and CD4⁺ T-cells are major survival factors for long-lived splenic plasma cells in B cell depletion contexts.

Lan-Huong Thai ^{1,4}, Simon Le Gallou ^{1,*}, Ailsa Robbins ^{1,*}, Nicolas Cagnard ², Jérôme Mégret³, Jean-Claude Weill ¹, Claude-Agnès Reynaud ¹ and Matthieu Mahévas ^{1,4}

¹Institut Necker-Enfants Malades-INSERM U1151-Team 12 "Développement du système immunitaire", Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France.
²Plateforme de bioinformatique de l'université Paris Descartes, Paris, France.
³Plateforme de cytométrie en flux, Structure Fédérative de Recherche Necker, Paris, France
⁴ Service de Médecine Interne, Centre de référence des cytopénies auto-immunes de l'adulte, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris Est Créteil, Créteil, France.

* equal contribution

Corresponding authors: Claude-Agnès Reynaud or Jean-Claude Weill. Institut Necker-Enfants Malades-INSERM U1151-Team 12 "Développement du système immunitaire", Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France. Email:claude-agnes.reynaud@inserm.fr , jean-claude.weill@inserm.fr

Abstract

Previous data suggested that the monoclonal anti-CD20 antibody induced paradoxically the settlement of autoreactive splenic long-lived plasma cells (LLPC) in the spleen of patients with auto-immune cytopenia, explaining the treatment failure. To investigate whether this process had a general relevance and decipher its mechanism, we used the AID-CreERT2-EYFP mouse model, which allows the irreversible expression of EYFP in B cells engaged in an immune response after tamoxifen regimen to follow plasma cells at different times after immunization. When analyzed by multiplex PCR at the single-cell level, while the splenic EYFP⁺B220⁻PC of untreated mice displayed an intermediate profile between short-lived and long-lived PC, the PC from anti-CD20 treated mice composed a more mature homogeneous population, similar to the long-lived bone marrow PC. The absolute number of splenic EYFP⁺B220⁻PC did not change significantly upon anti-CD20 treatment indicating that B-cell depletion promoted PC differentiation rather than a long-lived PC selection. BAFF (B-cell activating factor) and CD4⁺T-cells played a major role in plasma cell survival since combination of anti-CD20 with anti-BAFF or anti-CD4 antibodies dramatically reduced the number of splenic EYFP⁺B220⁻ LLPC. Anti-CD20 treatment also promoted the differentiation of LLPC in the spleen in the lupus prone NZB/W model, while a treatment combining anti-CD20 with anti-BAFF induced a marked reduction in total splenic PC numbers. These results suggest that the process of PC maturation upon anti-CD20 treatment is a general mechanism and that interfering with anti-BAFF antibody at the time of B-cell depletion might greatly improve the response rate in auto-immune disease.

Introduction

Plasma cells are terminally differentiated B cells producing antibodies that provide immediate and long-term protection against pathogens. Circulating high-affinity antibodies specific for viral encountered antigens are sustained for decades by long-lived plasma cells (LLPCs) that mainly reside in the bone marrow (1-5). Plasma cell longevity depends on a supportive environment that forms a specific survival niche, the number of LLPCs being likely limited by the available space in the niche. The bone marrow contains both cellular and soluble factors essential for LLPCs survival, among them stromal cells, megakaryocytes and eosinophils producing SDF-1a (CXCL12), IL-6, B-cell activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL), which act synergistically to support plasma cell survival in vivo (6-9). Under certain conditions, B cells specific for self-antigens may become activated and then differentiate into autoreactive plasma cells, potentially leading to autoimmune diseases. Indeed autoreactive antibodies can contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases either directly, through direct targeting of specific surface antigens, or indirectly, by inducing local inflammatory reactions and tissue destruction. In auto-immune contexts, spleen and inflamed tissues can provide an additional survival niche for autoreactive LLPCs, as shown in the lupus-prone NZB/NZW mouse model (10). LLPCs have been also described in the spleen of normal mice, in the context of B-cell depletion induced by irradiation or by anti-CD20 therapy (3-5). However, little is known about the cellular environment and signals required for the establishment of such LLPC in the spleen.

The treatment of B-cell mediated autoimmune diseases has undergone substantial changes since the development of B cell-targeted therapies. In particular, the use of rituximab, a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody, has considerably increased in a wide range of autoimmune disorders since the last decade, albeit with variable outcomes. Actually, although rituximab has become a mainstay in the therapy of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (AAV) and rheumatoid arthritis (RA), results have been more disappointing in primary Sjögren syndrome or systemic lupus erythematosus (SLE), with significant numbers of refractory patients (11-15). Immune thrombocytopenia (ITP) and warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) are autoimmune diseases mediated by the production of pathogenic autoantibodies, mainly in the spleen, targeting platelets in ITP and red blood cells in wAIHA. About 40% of patients with ITP and 30% with wAIHA fail to respond to rituximab, splenectomy being then performed as a second-line treatment (16). Our previous data suggested that the use of rituximab, in the context of ITP and wAIHA, paradoxically induced the settlement of splenic LLPC, some of them being autoreactive, whereas LLPC were surprisingly less frequent in the spleen of untreated

patients (17-18). The presence of this LLPC population could explain rituximab treatment failure for most of the patients, and their subsequent response to splenectomy. Interestingly, an increased level of B-cell activating factor (BAFF), a member of the TNF family with a B-cell survival function similar to APRIL, was observed in the supernatant of spleen cell cultures from rituximab-treated ITP and wAIHA patients (17-18). These results suggested that B-cell depletion induced by rituximab promoted new environmental conditions suitable for the maturation and survival of auto-immune LLPC in the spleen.

In this study, we have taken advantage of the knock-in transgenic mouse model AID-Cre-ERT2 x Rosa26-loxP-EYFP, which allows the irreversible expression of EYFP in B cells engaged in an immune response after tamoxifen regimen, to follow plasma cells at different times after immunization (19). We characterized the plasma cell maturation stage at the single cell level, upon B-cell depletion in the spleen and in bone marrow. We provide here a mechanistic view of the process that leads to the differentiation into long-lived plasma-cells in the spleen, identify major cytokines and cellular component involved in this process, and demonstrate that treatments targeting the plasma cell niche, combined with B-cell depletion, can have a major impact on plasma cell survival in this organ.

Results

Plasma cell maturation after immune responses in the spleen of AID-Cre-EYFP mice.

Plasma cells are rare populations in vivo, with no universal surface marker. Intrinsic cell labeling models are therefore powerful tools to analyze them in different physiological or pathological contexts. To this end, we used the AID-Cre-ERT2 x ROSA26-loxP-EYFP mouse line (hereafter named AID-Cre-EYFP) to follow the fate of plasma cells generated during an immune response. In this mouse line, tamoxifen ingestion coupled with immunization allows the timely labeling of cells engaged in the response and the analysis of persistent cell populations through their acquired EYFP labeling at different time points. A prime-boost immunization scheme was used with two sheep red blood cell (SRBC) injections one month apart and three tamoxifen labeling episodes (See Supplemental Figure 1). Plasma cells were identified as EYFP⁺B220⁻ (Figure 1A). Single cell analysis (see below) confirmed all EYFP⁺B220⁻ cells to be authentic PC, through their expression of *Prdm1* and *Xbp1*. In order to find out whether there was a gradient of maturation between newly generated PB/PC and mature PC, we sorted splenic EYFP⁺B220⁻ 6 days after a third immunization with SRBC, and splenic EYFP⁺ B220⁻PC, isolated 3 months after the second immunization (see Supplemental Figure 1), and analyzed their transcription profile by microarrays. We performed a supervised analysis and identified 223 differentially expressed genes (p < 0.05, > 4- or < 0.25-fold change), with 174 genes over-expressed in mature splenic PC compared with newly generated PB/PC and 49 under-expressed (Supplemental Table 1). Surprisingly, there was no cell cycle gene, apart from *Chek1*, over-expressed in newly generated PB/PC, indicating that differentiation of memory B cells into antibody-secreting cells in a recall response involves a rapid exit of the cell cycle. Among specific genes in the newly generated PB/PC population were CXCR3, involved in cell migration, Bcl2l11 (Bim), a pro-apoptotic factor, and several activators of signal transduction (Bank1, Smad3, Plaa). Genes over-expressed in the 3month old PC population included anti-apoptotic factors (*Tnfaip3*, *Bcl2*), transcription factors (Nfkb2, Runx2, Irf8, Tox2, Klf2), regulators of signal transduction (Btla), membrane receptors (Tnfrsf17, coding for BCMA, Ctla4, IcosL), and numerous genes involved in ion transport (Tesc, Clic5, S100a6), intra-cellular trafficking (Rab27a, several Gimap genes), metabolic pathways (Mt2, Anxa2, Cox15, Atp1b1), cell adhesion (Perp) or reorganization of actin cytoskeleton (Nebl, Arhgap5) (Figure 1B and C). There was no difference between the two populations concerning the expression level of major transcription factors involved in plasma cell identity, like Xbp1, Irf4, jun, or other ones, like Ell2 or Cited2, recently identified by Shi et al. as part of this cell lineage signature (20) (Supplemental Figure 2). In contrast, Prdml (encoding Blimp-1) showed a 3-fold expression difference, further documenting the maturation occurring between these two subsets, a maturation that constitutes the basis of plasma cell discrimination in

the Blimp-eGFP reporter mouse (20). These results show that recently formed, non-dividing plasma cells further undergo important transcriptional changes during their maturation into a long-lived cell fate.

Follow-up of plasma cells during B-cell depletion in AID-Cre-EYFP mice.

Mice were treated or not with anti-CD20 (clone 18B12), one month after the second immunization (see description of the protocol in Supplemental Figure 1). B-cell depletion in the spleen was maximal at 50 days after the first anti-CD20 injection (i.e. 3 months after the last immunization), with approximately 2% of splenic residual B-cells (Figure 2A). At that time, B cells were scarcely detectable in peripheral blood. Plasma cells, identified as EYFP⁺B220⁻, ⁻ represented the major EYFP subset that resisted B-cell depletion. Splenic EYFP⁺PC showed an heterogeneous expression of syndecan-1 (CD138), a classical PC marker, both in controls and anti-CD20 treated mice (not shown). The number of EYFP⁺B220⁻ PC was somewhat decreased in anti-CD20 treated mice compared to controls, even though this difference failed to reach significance (Figure 2B). The distribution of IgM, IgA and IgG1 isotypes among plasma cells remained unchanged upon anti-CD20 treatment (Figure 2C).

Single-cell gene expression analysis of PC from anti-CD20 treated mice reveals a long-lived gene expression profile.

From the previous transcriptomic analysis, we defined a set of genes that allows us to distinguish, at the single cell level, the process of plasma-cell maturation. For plasma cell genes, we selected Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Nfkb2, Tox2, Mt2, Tesc, PerP and Tnfrsf17 that showed increased expression in the 3 month-PC samples. We included Tmem176b, highlighted by Shi et al. as a PC maturation marker (20), which showed a 3.6 difference in our microarray analysis. We also selected two genes that had a relevant value in our previous analysis of human PC maturation, Klf6 and Fos (18). For plasmablast genes, we selected the three most relevant ones from our analysis of PB/PC at day 6, Chek1, Bcl2111 and CXCR3, and included 5 other genes linked with cell proliferation: Mki67, Bub1, Aurka, Ccnd2 and Rrm2b. Xbp1 and Prdm1 were used as control for PC identity, and *beta2-microglobulin* as housekeeping gene. We sorted newly generated splenic PB 3 days after a boost with SRBC ("Boost"), splenic PC (Spl-PC) and bone marrow PC (BM-PC) 3 months after the second immunization, and splenic PC from anti-CD20 treated mice at the nadir of B-cell depletion (day 50) (anti-CD20 PC), by using EYFP⁺B220⁻ criteria (see description of the protocol in Supplemental Figure 1). About 140 single cells per group were analyzed. Single-cell gene expression profiling was performed by multiplex RT-PCR using Fluidigm Dynamic Arrays. To facilitate the analysis, we generated a condensed heat map of gene

expression of each population (Figure 3A and Supplemental Figure 3). Plasmablasts, analyzed 3 days after the boost, expressed multiple genes linked with cell division, confirming the rapid exit of cell cycle observed at day 6 (Figure 3A). BM-PC expressed multiple plasma cell-specific genes, with 4 or more genes expressed by two-thirds of cells (Figure 3B). In contrast, a major fraction of mature PC (Spl-PC), while not harboring a proliferative profile, express a much lower number of PC specific genes per cell basis (14% of cells expressing at least 4 genes). PC isolated after anti-CD20 treatment differed clearly from Spl-PC through the criteria of numbers of plasma cell genes expressed per cell unit (66% of cells expressing at least 4 genes), these numbers being conversely similar to the ones observed for long-lived BM-PC (Figure 3A, B and Supplemental Figure 3). The large difference observed (14% vs. 66%) in cells expressing 4 or more PC specific genes between SpI-PC and anti-CD20 PC further excludes that this maturation profile could result from the selection of a minor subset pre-existing in control mice. Thus, anti-CD20 PC, which have persisted over time since their initial AID-mediated labeling, appear mostly non-dividing and composed a mature population expressing a long-lived program that differed from the one of plasma cells isolated from untreated animals at a similar distance from their EYFP labeling. Our results thus suggest that B-cell depletion induced a process of plasma-cell differentiation into a more mature, long-lived program.

BAFF plays a major role in promoting the emergence of splenic long-lived PC.

Many different factors and cells have been described as being essential for the survival of PC in bone marrow. As described for human spleens from rituximab-treated ITP patients, we observed that BAFF (B-cell activating factor) secretion was increased in the culture supernatants of splenocytes isolated from B-cell depleted animals (Figure 4A). Mouse splenic PC expressed BAFF receptor (BAFF-R), transmembrane activator and CAML interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA) (Supplemental Figure 4A). We chose to target BAFF concomitantly with B-cell depletion since BAFF levels increased rapidly in serum after the first anti-CD20 injection (Supplemental Figure 4B). We used a monoclonal antibody (10F4, GSK) previously reported to efficiently block soluble BAFF. We analyzed AID-Cre-EYFP mice immunized with SRBC and treated with 4 injections of anti-BAFF antibody associated or not with anti-CD20 antibody (see protocol in Supplemental Figure 1). The combined anti-BAFF and anti-CD20 treatment efficiently prevented the BAFF increase in serum (Supplemental Figure 4C). EYFP⁺ Bcells were more efficiently depleted with the combined treatment than with anti-CD20 alone, with only a few hundreds EYFP⁺B220⁺ B cells surviving in the spleen (Figure 4B). Strikingly, the combined treatment led to a dramatic decrease of splenic EYFP⁺B220⁻ PC compared with control and anti-CD20 antibody-treated mice, and also more pronounced than with anti-BAFF treatment alone (Figure 4C). IgG1-, IgM- and IgA-secreting PC were all decreased upon combination treatment (Figure 4D). The number of BM-PC decreased more than two-fold compared with controls, a reduction that more strongly impacted IgM PC (Supplemental Figure 4D). Accordingly, the level of IgM significantly decreased in the sera, whereas IgG1 and IgA levels remained unchanged (Supplemental Figure 4E, F and G). These results demonstrate that blocking BAFF by monoclonal antibody can interfere with the maturation and the overall survival of long-lived PC in the spleen without having a major impact on long-lived PC with a switched isotype in bone marrow.

BAFF-producing neutrophils are components of the splenic plasma cell niche.

We observed by confocal microscopy that Gr1⁺ cells (including neutrophils, monocytes and dendritic cells) co-localized with splenic plasma cells in the red pulp both in both normal (Supplemental Figure 5A) and in anti-CD20 treated mice (Figure 5A). The number of splenic Gr1⁺ cells increased upon B-cell depletion (Supplemental Figure 5B), as well as the number of interactions with PCs (Figure 5B). Among various cellular populations in the spleen, we found that BAFF was mainly expressed by Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁺ neutrophils, rather than by Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁻ monocytes and dendritics cells or CD4⁺ T-cells (Figure 5C). We therefore aimed to deplete BAFF-producing splenic neutrophils through repeated injections of an anti-Ly6G antibody over a 7-week period (clone 1A8, isotype IgG2a, 19 injections, every third day) (see protocol in Supplemental Figure 1). However, we observed that prolonged depletion with anti-Ly6G did not affect the level of BAFF in the serum, but induced the expansion of a Gr1⁺CD11b⁺ population that expressed BAFF at a level similar to neutrophils (Supplemental Figure 5C and D). This observation suggested that the Ly6G depleting treatment may have forced the emergence of a neutrophil population having down-modulated Ly6G surface expression while maintaining its BAFF secretion capacity, thus rendering the targeting of the neutrophil component of the plasma cell niche inoperative.

CD4⁺ T-cells contribute to the survival niche of splenic long-lived plasma cells in the context of B-cell depletion.

Approximately 20-30% of splenic PC co-localized with CD3⁺ T-cells, either in anti-CD20treated or untreated mice (Figure 6 A and B). We observed close interactions of PC with T-cells, mostly CD4⁺ (not shown). The number of PC/CD4⁺-T cell interactions did not significantly increase upon B-cell depletion (not shown). PC expressed co-stimulation molecules such as CD28, CD86, CMHII which could be involved in T-cell interactions. We therefore performed CD4⁺ Tcell depletion, combined or not with anti-CD20 treatment to assess the contribution of CD4⁺ T- cells on plasma cell survival (see protocol in Supplemental Figure 1). CD4⁺ T-cell depletion did not reduce the number of splenic PC. By contrast, combining CD4⁺T-cell depletion with anti-CD20 antibody treatment significantly decreased the number of splenic PC (Figure 6 C). This effect was not due to a better T-cell depletion in anti-CD20 treated mice (Supplemental Figure 6) or an effect on Gr1⁺ population (not shown). We hypothesized that the differential effect in the context of B-cell depletion could be due to CD4⁺ T-cell activation processes induced either by BAFF or by other splenic factors modified by anti-CD20 treatment. We therefore co-cultured splenic EYFP⁺ B220⁻ PC with autologous CD4⁺T-cells previously primed with various concentrations of BAFF and observed no effect on PC survival (not shown). However, co-culture *in vitro* with CD4⁺ T-cells isolated from anti-CD20 treated mice slightly but significantly increased the survival of splenic EYFP⁺ B220⁻ PC compared to cultures with CD4⁺ T-cells from control animals (Figure 6 D). These results suggested that CD4⁺T cells might provide additional signals to splenic PC in the context of B-cell depletion, which could contribute to the emergence or the survival of LLPC.

B-cell depletion induces the emergence of LLPC in the spleen of NZB/NZW lupus prone mice, and targeting BAFF reduces this differentiation process.

We wanted to assess whether the B-cell depletion could also modify the splenic PC program in an auto-immune context. NZB/NZW mice spontaneously develop a disease closely resembling human systemic lupus. The splenic PC compartment of these mice has been described to contain continuously dividing cells and a stable population of non-dividing cells that contribute to the production of pathogenic auto-antibodies. In this model, auto reactive germinal center Bcells start to feed the short-lived plasmablasts pool between 6-12 weeks. Mice were treated or not with 6 injections of anti-CD20 starting from week 20 (see protocol in Supplemental Figure 7). In these conditions, only few residual B cells were detectable in the spleen at day 50 after the first anti-CD20 injection compared with untreated mice (Supplemental Figure 8 A). We used dump staining (CD3/CD4/Ly6G/CD11b) and B220/CD138 labeling to identify splenic PC. Three different CD138-positive subsets were identified, according to their B220 expression: B220⁺CD138^{high}, B220^{low}CD138^{high} and B220⁻CD138^{high} (Figure 7A). Further analyses indicated that the first subset represent B lineage cells, not PC, as they do not express Blimp-1 nor Xbp-1 (not shown). Interestingly, the B220⁻CD138⁺ subset was the major one that persisted after B-cell depletion (Figure 7A). We therefore sorted the two B220^{low} and B220⁻CD138^{high} PC subsets as well as BM-PC (CD138^{high} B220⁻) from 27-week old untreated mice, and splenic PC (CD138^{high} B220⁻) from anti-CD20 treated mice. Single cell analysis by multiplex RT-PCR of these different populations revealed that anti-CD20 PC and BM-PC clustered together. The two PC subsets from 27-week old untreated mice appeared very similar, and contained a heterogeneous mixture of proliferative PB and PC (Figure 7B and Supplemental Figure 8B). Splenic PC of untreated mice differed from anti-CD20 PC and BM-PC as only 2-3 % expressed at least 4 PC specific genes per cell compared to more than 40% for anti-CD20 PC and BM-PC (Figure 7C). The absolute number of splenic CD138^{hi}B220⁻ PC did not change significantly upon treatment, indicating that anti-CD20 induced a process of PC maturation rather than a selection of pre-existing long-lived PC (Figure 7 D). We finally combined B-cell depletion with BAFF blockade and observed a decrease in the number of B220⁻ CD138^{high} splenic PC compared with control mice (Figure 7D and Supplemental Figure 8C). There was no effect on BM-PC of either BAFF blockade or of combined anti-BAFF/anti-CD20 treatment (Supplemental Figure 8D). These results clearly demonstrate that, similarly to our observation in AID-Cre-EYFP mice, B-cell depleting treatment modifies the expression pattern of splenic PC towards a more mature profile in lupus prone mice, and that combined BAFF and B-cell depletion efficiently interferes with this maturation process and specifically impacts PC survival in the splenic microenvironment.

Discussion

The removal of pathogenic B-cells is a major goal in the treatment of B-cell mediated autoimmune diseases. B-cell depletion therapy with rituximab has raised many hopes, unfortunately impeded by failure or relapse in various clinical situations and diseases. We recently proposed that B-cell depletion, through its impact on the splenic microenvironment, could promote the emergence of LLPC in the spleen of patients with ITP and wAIHA, explaining in part the failure of anti-CD20 therapy in some patients. To investigate whether this mechanism could have a general relevance and decipher the cellular and molecular mechanism of this process, we used the knock-in AID-Cre-EYFP mouse model, to follow PC at different times after immunization, and upon B-cell depletion, in the spleen and the bone marrow. With this model, we can bypass the use of the classical surface markers to identify PC, such as Syndecan-1 and CD43 whose expression is heterogeneous and therefore do not represent universal markers. Moreover, the timing of tamoxifen-induced cell labeling allows us to date the formation of EYFP⁺ plasma cells.

We took advantage of this system to characterize the transcriptional program of splenic PC, and its maturation between early time points after a recall immunization (6 days) and 3 months. This analysis highlighted an early acquisition of the PC program, as most of the transcriptional factors involved in antibody-secreting-cell identity (ASC) were already expressed in newly generated PC, such as *Xbp-1* or *Irf4*, as well as key survival factors like *Mcl1*. It also revealed that their maturation program, coming along an increased expression of *Blimp-1*, mobilizes various effectors, including transcription factors (*Nfkb2*, *Runx2*, *Klf6*), anti-apoptotic genes (*Bcl2*, *Tnfaip3*), and several metabolic or cell signaling pathways (*S100a6*, *Mt2*, *Btla*, *Tnfrsf17*).

To investigate the plasma cell program in the context of B-cell depletion, we treated immunized AID-Cre-EYFP mice an anti-CD20 antibody (18B12, Biogen Idec). The B-cell depletion induced appears similar to the one observed in humans upon rituximab treatment, as it extensively depleted B-cell subsets in blood and spleen, except for some residual splenic GC B-cells, and had only a more modest impact on the absolute number of PC in the spleen. Using a set of diagnostic genes selected from our transcriptomic analysis, we performed single-cell gene expression assays of such splenic PC from anti-CD20 treated mice, which revealed that splenic PC matured upon B-cell depletion and acquired an expression profile close to that of normal bone-marrow long-lived plasma-cells (LLPC). The PC population isolated from anti-CD20 treated animals clearly differed from normal EYFP⁺ PC, whereas one could have expected that normal PC whose EYFP labeling was similarly acquired from GC responses initiated 3 months before analysis, would represent resident long-lived cells. In fact, the single cell assay thus revealed a paucity in the number of expressed genes per cell in the control PC sample, while anti-CD20 and

bone marrow PC showed a more robust and reinforced long-lived signature at the individual cell level, with 66% of cells expressing at least four diagnostic genes, compared to 14% in the control PC sample. As the absolute number of splenic EYFP⁺ PC did not change significantly upon anti-CD20 treatment, our results strongly suggest that B-cell depletion promoted further maturation rather selection of a pre-existing long-lived PC subset.

PC from anti-CD20 treated mice strongly expressed the non-canonical NF-κB signaling pathway that integrates signals from a subset of TNF receptor family members, including BAFF receptor (BAFF-R), to promote cell survival (21). Activation of this pathway likely resulted from the increased level of B-cell activating factor (BAFF) that accompanied B-cell depletion. BAFF can signal in mouse PC through BAFF-R, calcium-modulator and cyclophilin interactor (TACI) and with low-affinity binding through B-cell maturation antigen (BCMA), these 3 receptors being expressed at their surface (22-23). In line with this, the combination of anti-CD20 and anti-BAFF antibodies, injected simultaneously, markedly reduced the number of splenic EYFP⁺ PC compared to treatment with anti-C20 alone, showing that BAFF is a major player for the differentiation and the maintenance of LLPC in the spleen in the context of B-cell depletion.

NZB/NZW lupus prone mouse mirrors many aspects of auto-immune diseases, notably an ongoing GC B-cell response and generation of short-lived ASC in the spleen. Although it was more difficult to identify splenic PC in NZB/NZW than in AID-Cre-EYFP mice, we also observed a process of maturation upon B-cell depletion towards a long-lived program in the spleen that is similar to our results in the AID-Cre-EYFP setting. In this auto-immune context, the combined injection of anti-CD20/anti-BAFF efficiently suppressed splenic PC, without impacting on PC numbers in bone marrow. These results provide a mechanistic explanation for a recent report showing that combining anti-CD20 with BAFF receptor blockade (BR3-FC) in a pre-nephritis lupus prone mouse model enhanced B-cell and PC depletion and reduced progression towards nephritis (24-25).

There is growing evidence that splenic neutrophils contribute to B-cell survival and plasmablast generation by producing BAFF/APRIL and IL21, in the context of T-independent immune responses (26). We observed that splenic neutrophils were localized close to PC and that Gr1⁺Ly6G⁺ cells were the major source of BAFF. Upon B-cell depletion, the absolute number of splenic neutrophils as well as of PC-neutrophils interactions increased, which likely contributed to the observed maturation of PC in this context. Interestingly, we also observed that PC co-localized with neutrophils in human spleen in ITP (unpublished). The appearance of a Ly6G⁻ subset with strong BAFF expression following anti-Ly6G injection however prevented the assessment of PC survival in the context of neutrophils in the survival and maintenance of

splenic PC. Splenic PC reside in the red pulp at the border of the T-cell zone, but, more surprisingly, 20-30% of them interacted with CD4⁺ T cells. Such interactions have been previously reported in tonsils grafts in xenochimeric mouse, and we also observed them in human spleens of ITP patients (27-28). But while anti-CD4 antibodies given alone had little or no effect, the combination of CD4⁺ T-cell depletion with anti-CD20 treament led to a significant decrease in the number of splenic PC. Accordingly, T-cells isolated from anti-CD20 treated mice promoted the survival of PC in vitro. This complies with a scenario in which modulation/activation of CD4⁺ T-cells would be achieved by B-cell depletion, which would endow them with additional supportive capacities for LLPC maturation. It should be noted that CD4⁺ T-cells is independent of BAFF level in the sera, suggesting that the role played by CD4⁺ T-cells is independent of BAFF. The different contributions of soluble and cellular components of the PC niche in the spleen thus demonstrated that the long-lived PC expression profile is not cell-intrinsic but largely depends on signals provided by the splenic microenvironment.

From a clinical point of view, our findings may explain the failure of anti-CD20 treatment in the two large clinical trials in lupus erythematosus as well as the primary failure of rituximab in some cases of ITP and wAIHA. Collectively, our results in mice provide strong arguments to believe that combining rituximab with anti-BAFF mAb (belimumab) could modify the splenic environment of B-cell mediated auto-immune diseases and interfere with the maturation of autoreactive LLPC in the spleen. This new B-cell targeting approach, involving a combined and simultaneous treatment targeting BAFF before its early rise following B-cell depletion, could significantly increase the rate of complete and sustained responses in patients with persistent ITP or wAIHA, diseases in which the spleen is the major site of production of pathogenic autoantibodies.

Experimental procedures

Mice and treatments

AID-Cre-ERT2xRosa26-loxP-EYFP mice (named "AID-Cre-EYFP" throughout this paper) have been previously described (19). Female NZB/NZW F1 mice were purchased from Envigo. All mice were bred and maintained under specific-pathogen-free conditions. Animal experiments were done according to guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and protocols approved by the Paris Descartes Ethical Committee and the French Ministery of Research.

8-12-week-old AID-Cre-EYFP mice were immunized intraperitoneally twice at a 30-day interval with 5 x 10^9 SRBCs (sheep red blood cells) (Eurobio). Doses of 10 mg Nolvadex in 500 µl of 20% Clinoleic (Baxter) were administered on days 7 and 12 after primary immunization and on day 1 after secondary immunization by gavage. One month after the second immunization, subgroups received the following injections: anti-CD20 intravenously or intraperitoneally (3 injections of 250 µg every 5th day, 18B12 antibody, Biogen Idec), and/or anti-BAFF intraperitoneally (4 injections of 100 µg every 10th day, 10F4 antibody, GSK), anti-CD4 intraperitoneally (3 injections of 700 µg, every 10th day, YTS 191.1 antibody, kindly provided by Lucienne Chatenoud or GK 1.5, Bioxcell). 20-week-old female NZB/NZW F1 mice received anti-CD20 intraperitoneally (6 injections of 250 µg every 5th day) and/or anti-BAFF intraperitoneally (5 injections of 100 µg every 10th day). All mice were analyzed at nadir of B cell depletion, corresponding to day 50 after the first injection of anti-CD20.

Treatment protocols are summarized in Supplemental Figures 1 and 7.

Flow cytometry and cell sorting

Cells were suspended in FACS buffer (HBSS supplemented with 10% Fetal Bovine Serum) and labeled with primary and secondary antibodies for 15 minutes at 4°C (Supplemental Table 2). Cell viability was determined with Sytox live dead (Life Technologies). Intracellular staining was performed after cell fixation and permeabilization with the BD Cytofix/Cytoperm solution. Stained cells were analyzed with a FACS Fortessa apparatus (Becton Dickinson) with DIVA Software. Cell sorting was performed with a FACS Aria cell sorter (BD). EYFP⁺ plasma cells were first enriched by sorting and then purified. The cell purity after the second sorting was greater than 99%.

Gene expression profiling

Splenic early plasma cells (EYFP⁺B220⁻CD138⁺) were generated and sorted 6 days after a third immunization with SRBCs (boosted mice) and splenic mature plasma cells (EYFP⁺B220⁻) were sorted 3 months after second immunization (control mice).

For gene expression profiling, RNA was isolated from sort-purified plasma cells from 3 boosted mice and 4 control mice. Total RNA was isolated using the RNeasy Micro Kit (QIAGEN). RNA quality and concentration were assessed using RNA 6000 Pico LabChips with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Total RNA (10 ng) was preamplified by Ribo-SPIA (Ribo-single primer isothermal amplification) RNA Amplification using the Ovation Pico WTA Kit (NuGENTechnologies), fragmented, and labeled with biotin using the Encore Biotin Module (NuGEN Technologies), as recommended by the manufacturer. Expression analysis was performed using GeneChip Mouse U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix). Gene expression levels were calculated using GCRMA, and flags were computed using MAS5 within R. To limit potentially biased measurements (background or saturating), all probes whose flags were absent or marginal were flagged as 0, whereas those present were flagged as 1. The group comparisons were done using a Student's t test. To estimate the false discovery rate, we filtered the resulting Pvalues at 0.05 and considered data with 4-fold changes between samples. Data were subsequently compared to the gene ontology and genecards database (http://www. geneontology.org/, http://www.genecards.org/).

Single-cell gene expression analysis

Single cell gene expression analysis was performed on EYFP⁺B220⁻ plasma cells (PC) and EYFP⁺B220⁻CD138⁺ plasmablasts (PB) from AID-Cre-EYFP mice. We sorted splenic PB 3 days after boost with SRBC from 2 mice, splenic PC (Ctl-PC) and bone marrow PC (BM-PC) 3 months after the second immunization from 2 control mice and splenic PC from 4 anti-CD20 treated mice (anti-CD20 PC). PC from NZB/W mice were also analyzed at the single-cell level. After dump staining (CD3/CD4/Ly6G/CD11b), we sorted two splenic PC populations (CD138^{hi}B220^{lo} and CD138^{hi}B220⁻), and BM-PC (CD138^{hi}B220⁻) from two 27-week old untreated mice and splenic PC (CD138^{hi}B220⁻) from 4 anti-CD20 treated mice.

Cells were sorted in 5 μ l of buffer containing the RT-PCR reagents and the preamplification primers (CellsDirect One-Step qRT-PCR mix, SuperScriptIII RT/Platinum TaqMix 2%, and TaqMan primers (×0.005) [Applied Biosystems]). A list of primers is available in Supplemental Table 3. After reverse transcription and gene-specific preamplification, cDNAs were diluted 5 times and kept frozen at -20° C. 10× primer solutions were prepared with 2× Assay Loading Reagent (Fluidigm). cDNAs were mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix 2× (Applied

Biosystems) and ×20 GE Sample Loading Reagent (Fluidigm). Assay mix and cDNA mix were then transferred in a 48.48 Dynamic Array primed chip, and real-time PCR was run according to the Fluidigm protocol. 100-cell and no-cell wells were used as positive and negative controls, respectively. Data were analyzed using Fluidigm Real-Time PCR analysis software. CD3 and CD4 genes were used as control genes. Cells expressing $\beta 2$ microglobulin and at least one master plasma cell gene Xbp1 or Prdm1 were considered for further analysis. Gene expression was considered positive when detectable under 25 cycles. Percent of positive cells per group was calculated for each gene. The group comparisons were done using a Wilcoxon Test.

Confocal microscopy analysis of spleens

Spleen tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C, incubated in 30% sucrose at 4°C overnight, embedded in OCT compound (Sakura), snap-frozen in liquid N₂, and then sectioned at a thickness of 8 μ m with a Cryostat. Cryosections were rehydrated in wash buffer (TBS, pH 7.6), and incubated in blocking buffer (0.5% BSA and 10% goat serum in PBS) for 30 minutes at room temperature. Sections were then labeled at room temperature in blocking buffer solution with primary antibodies for 30 minutes, washed 3 times and with secondary reagents for 30 minutes (Supplementary Table 2). After washing, stained slides were mounted with Fluoromount-G (Southern Biotechtechnology Associates). Images were acquired by confocal microscopy with a LSM 700 (Zeiss) or a SP5 (Leica). Pictures were taken with an objective ×40. Images were analyzed and processed with ImageJ version 1.46.

Cytokine and immunoglobulin enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)

Culture supernatants of 4×10^6 spleen cells plated in 24-well plates were collected at day 3. Quantitative determination of BAFF level in sera and supernatants of splenocytes was performed with a mouse BAFF ELISA Kit (Quantikine, R&D systems) according to the manufacturer's instructions.

IgG1, IgA and IgM levels were determined in the sera before and after treatments. Multiscreen HTS 96-well plates (Millipore) were coated 1h at 37 °C with 10 μ g/ml of goat anti-mouse immunoglobulin and incubated in blocking buffer (1% BSA and 0.05% Tween in PBS) overnight at 4°C. After washing plates, fourfold cell dilutions were incubated for 1 h, washed 5 times and then incubated in blocking buffer with secondary antibodies for 1 h at room temperature (Supplemental Table 2).

Quantification of gene expression by RT-PCR

Total RNA was extracted using RNeasy Microkit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. RNA was reverse-transcribed to cDNA with the Reverse Transcriptase Kit (Agilent) and gene expression was measured by quantitative RT-PCR. Gene expression was normalized to the $\beta 2$ microglobulin expression. A list of Taqman primers used is available in Supplemental Table 3.

In vitro assays

After sorting, splenic EYFP⁺B220⁻PC were co-cultured in 96-well plates with CD4⁺T-cells from immunized mice untreated or 5 days after second anti-CD20 injection (CD4⁺T-cells to PC ratio 5:1). Cells were cultured in complete RPMI (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum. Cells were collected at day 5 and PC survival was estimated by FACS as Sytox⁻ Annexin⁻ (BD bioscience kit).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the Prism Software (GraphPad) by paired or unpaired t test or one-way ANOVA for multiple comparisons. A *P* value of 0.05% was considered significant; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Acknowledgments

We are grateful for helpful discussions to M.Espeli. We thank L. Da Silva and D. Lecoeuche for technical assistance. We thank R. Zoubairi for animal care, C. Cordier for cell sorting and N. Goudin for confocal microscopy (from, respectively, the animal core facility, the cytometry and imaging core facilities of the Structure Fédérative de Recherche Necker INSERM US24-CNRS UMS 3633. The team "Development of the immune system" is supported by an ANR PRTS 2013 grant ("PC-RITUX"), the Ligue Nationale contre le Cancer ("Equipe labelisée"), the Fondation Princesse Grace, and an ERC Advanced Grant (Memo-B). Lan-Huong Thai was supported by a fellowship from the « Société de Médecine Interne » (Bourse Marcel Simon) and a Poste d'Accueil INSERM. Ailsa Robbins was supported by the « Société de Médecine Interne » (Bourse CSL-Behring).

References

1. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1903-1915

2. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*.1997;388(6638):133-134.

3. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998;8(3):363-372.

4. Ahuja A, Anderson SM, Khalil A, Shlomchik MJ. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *ProcNatlAcadSci U S A*. 2008;105(12):4802-4807

5. DiLillo DJ, et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature andmemory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Immunol*. 2008;180(1):361-371.

6. Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *TrendsImmunol.* 2011;32(12):595-602.

7. Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*. 2002;169(8):4213-4221.

8. Chu VT, et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011;12(2):151-159.

9. Cassese G, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol*. 2003;171(4):1684-1690.

10. Hoyer BF, et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med*. 2004;199(11):1577-1584.

11. Edwards JC, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350(25):2572-2581.

12. Stone JH, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*.2010;363(3):221-232.

13. Devauchelle-Pensec V, et al. Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2014;160(4):233-242.

14. Merrill JT, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately- to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):222-233.

15. Rovin BH, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1215-1226.

16. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001;98(4):952-957.
17. Mahévas M, et al. B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest*.2013;123(1):432-442.

18. Mahévas M, et al. Emergence of long-lived autoreactive plasma cells in the spleen of primary warm auto-immune hemolytic anemia patients treated with rituximab. *J Autoimmun*. 2015;62:22-30. 19. Dogan I, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol*. 2009;10(12):1292-1299.

20. 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):663-73

21. Gardam S, Brink R. Non-Canonical NF-κB Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctures. *Front Immunol*. 2014 6;4:509.

22. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(3):203-215.

23. Benson MJ, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol*. 2008;180 (6):3655-3659.

24. Bekar KW, et al. Prolonged effects of short-term anti-CD20 B cell depletion therapy in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2443-2457.

25. Lin W, et al. Dual B cell immunotherapy is superior to individual anti-CD20 depletion or BAFF
blockade in murine models of spontaneous or accelerated lupus. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(1):215-224.
26. Puga I, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 2011;13(2):170-180.

27. Withers DR, Fiorini C, Fischer RT, Ettinger R, Lipsky PE, Grammer AC. T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood.* 2007 ; 109 (11):4856-4864. 28. Mahévas M, Michel M, Weill JC, Reynaud CA. Long-lived plasma cells in autoimmunity: lessons from B-cell depleting therapy. *Front Immunol.* 2013; 4:494.

Figures Legends

Figure 1. Gene expression profiling of newly generated and mature splenic EYFP⁺ plasma-cells.

Splenic newly generated EYFP⁺B220⁻ plasma cells were sorted 6 days after third immunization by SRBC (D6) and splenic mature EYFP⁺B220⁻ plasma cells 3 months after second immunization (M3). About 10000 EYFP⁺ plasma cells per mouse were analyzed (D6, n=3, M3, n=4). (A) Illustration of the sorting steps of mature splenic EYFP⁺ B220⁻ plasma cells. (B) Heat map clustering of genes selected from the supervised comparison of newly generated (D6) vs. mature plasma cells (M3) in the spleen (223 genes with a fold change >4 or < 0.25, P < 0.05). Heatmap based on normalized log2 intensities which were probe-wise mean centered across all compared conditions. Columns represent individual samples and rows represent specific gene probes, with upregulated genes in red and downregulated genes in blue. Genes selected for the single-cell analysis are precised beside the heat map. (C) Functional analysis of the 174 up-regulated genes from the comparison of newly generated and mature plasma cells (P < 0.05, > 4-fold). The number of genes in each functional category is shown.

Figure 2. B-cell depletion in the spleen of AID-Cre-EYFP mice.

Generation of EYFP⁺ plasma cells by 2 immunizations with sheep red blood cells (SRBC) and tamoxifen regimen. Immunized AID-Cre-EYFP mice received either or not 3 injections of anti-CD20 (250 μ g, intravenously). Mice were analyzed at the nadir of B-cell depletion (day 50 after first anti-CD20) by flow cytometry and compared with controls (3 months after immunization). (**A**) Comparison of EYFP⁺B220⁺ cells number per spleen in controls and anti-CD20 treated mice. Results are represented with logarithmic scale. (**B**) Comparison of EYFP⁺B220⁻ plasma cells number per spleen in controls and anti-CD20 treated mice. (**C**) Repartition of isotypes IgG1, IgA and IgM among splenic EYFP⁺B220⁻ plasma cells in controls (n=4) and anti-CD20 treated (n=4) mice. All these data were obtained from FACS analysis. Significant differences are estimated by Mann-Whitney test (**P* < 0.05). Mean values are indicated.

Figure 3. Process of maturation of splenic EYFP⁺ plasma cells upon B-cell depletion at the single-cell level.

(A) Heatmap clustering of genes from the comparison of splenic antibody secreting cells generated 3 days after second boost ie third immunization (boost), plasma cells 3 months after immunization (Spl-PC), plasma cells at the nadir of B-cell depletion (anti-CD20 PC), and bone marrow plasma cells (BM-PC). Multiplex single-cell PCR was performed with the Fluidigm Dynamic Array. Analyzed cells required to express $\beta 2$ microglobulin and master plasma cell genes Xbp1 and/or Prdm1. About 140 cells per group were analyzed. Percent of positive cells for each gene expression (<25 cycles) per group was then calculated and compared to other groups using Wilcoxon test. Heatmap is based on normalized log2 intensities which were probe-wise mean centered across all compared conditions. Genes upregulated are in red and downregulated in blue. (B) Percent of cells per population expressing n plasma cell genes/cell (boost (blue), Spl-PC (green), Anti-CD20 PC (orange), BM-PC (purple)). About 140 cells per group were analyzed. Plasma cell genes included *Tesc, Fos, Klf6, Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Tnfrsr17, NfKB2, PerP, Tox2, Tmem176b* and *Mt2*. (C) The table details the cumulative percent of cells per group expressing n or more plasma cell genes.

Figure 4. BAFF is a key survival factor for splenic plasma cells in the context of B-cell depletion in AID-Cre-EYFP mice.

(A) BAFF concentration was quantified by ELISA in supernatants after 3 days of culture of 4 × 10^6 total spleen cells from control and anti-CD20 treated mice. (B-C) Comparison by FACS analysis at the nadir of B-cell depletion in controls, anti-CD20, anti-CD20/ anti-BAFF and anti-BAFF treated mice of EYFP⁺ B220⁺ cells (B) and EYFP⁺ B220⁻ plasma cells number per spleen (C). Results are represented with logarithmic scale for EYFP⁺ B220⁺ cells depletion. (D) Number of EYFP⁺B220⁻ plasma cells per spleen with repartition of isotypes IgG1, IgA and IgM in controls (n=4), anti-CD20 (n=4) and anti-CD20/ anti-BAFF (n=4) treated mice. Significant differences are estimated by Mann-Whitney test or one-way ANOVA, Dunn test for multiple comparisons (* *P* < 0.05, *** *P* < 0.001). Mean values are indicated.

Figure 5. BAFF-producing neutrophils in splenic PC microenvironment.

(A) Analysis of the co-localization of EYFP⁺ plasma cells (green) and $Gr1^+$ cells (red) in the spleen of a representative anti-CD20 treated mouse by four-color confocal microscopy with an objective ×40. Scale bar: 150 µm (B) EYFP⁺ plasma cells interact more often with $Gr1^+$ cells in the spleen upon B-cell depletion condition compared with controls. Spleens from 3 mice per group were analyzed, corresponding to about 600 EYFP+ PC in control group and 300 EYFP+ PC in

anti-CD20 group. Interactions between EYFP⁺ plasma cells and Gr1⁺ cells were calculated by using Image J Software. (C) Neutrophils (Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁺ cells) are the predominant source of BAFF production in the spleen compared with other Gr1⁺ cells and CD4⁺ T-cells (P < 0.05). CD4⁺ T-cells, Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁻ cells and Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁺ cells were collected from the spleen of 3 immunized mice. About 10000 cells per population per mice were sorted. BAFF cDNA expression was quantified by RT-PCR and normalized to the $\beta 2$ microglobulin expression (Δ Ct). Significant differences are estimated by unpaired *t* test or one-way ANOVA, Kruskal-Wallis test for multiple comparisons (*P < 0.05). Mean values are indicated.

Figure 6. CD4⁺ T-cells contribute to the persistence of splenic long-lived plasma cells in AID-Cre-EYFP mice.

(A-B) Analysis of the interaction between EYFP⁺ plasma cells (green) and CD3⁺ T-cells (blue) in the spleen upon B cell depletion condition. Images were acquired by confocal microscopy with a LSM 700 (Zeiss) with an objective ×40. Scale bars: 150 μ m (A), 18 μ m (B) (C) By FACS analysis at the nadir of B-cell depletion , number of EYFP⁺ B220⁻ plasma cells per spleen significantly decreases in anti-CD20/ anti-CD4 treated mice compared with controls and anti-CD20 treated mice (D) Splenic EYFP⁺ plasma cells survival increases *in vitro* when co-cultured for 5 days with CD4⁺ T-cells from anti-CD20 treated mice compared with CD4⁺ T-cells from controls mice. Splenic EYFP⁺ plasma cell survival was tested in *vitro* after sorting from 5 immunized mice, with a co-culture CD4⁺ T-cells to PC ratio 5:1. CD4⁺ T-cells were collected from immunized untreated or anti-CD20 treated mice (5 days after second anti-CD20 injection). Assays were performed in duplicates per condition per mouse. Significant differences are estimated by paired *t* test or one-way ANOVA, Dunn test for multiple comparisons (* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01). Mean values are indicated.

Figure 7. Splenic long-lived plasma cells depend upon BAFF in the context of B-cell depletion in NZB/W mice.

(A) Gating strategy for sorting antibody-secreting cells (ASC) from NZB/W mice for single cell analysis. ASC from 27-week-old NZB/W mice were sorted by using dump staining CD3/CD4/Gr1/Cd11b and separated after purification in CD138^{hi}B220⁻ and CD138^{hi}B220^{lo} fractions. ASC were collected in the spleen (CD138^{hi}B220⁻, CD138^{hi}B220^{lo}) and the bone-marrow (CD138^{hi}B220⁻) from 2 untreated and 4 anti-CD20 treated mice at the nadir of B-cell depletion. (B) Heatmap clustering of genes from the comparison of splenic CD138^{hi}B220^{lo} cells and CD138^{hi}B220⁻ cells of untreated mice, splenic CD138^{hi}B220⁻ cells of anti-CD20 treated mice, and bone marrow CD138^{hi}B220⁻ plasma cells of untreated mice (BM-PC). About 100 cells per group were analyzed. Percent of positive cells for each gene expression (<25 cycles) per group was then

calculated and compared to other groups using Wilcoxon test. Heatmap is based on normalized log2 intensities which were probe-wise mean centered across all compared conditions. Genes upregulated are in red and downregulated in blue. (**C**) Percent of cells per population expressing n plasma cell genes/cell (CD138^{hi}B220^{lo} cells (blue), CD138^{hi}B220⁻ cells (green), CD138^{hi}B220⁻ Anti-CD20 cells (orange), BM-PC (purple)). About 100 cells per group were analyzed. Plasma genes included: *Tesc, Fos, Klf6, Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Tnfrsr17, NfKB2, PerP, Tmem176b* and *mt2*. (**D**) The table details the cumulative percent of cells per group expressing n or more plasma cell genes. (**E**) Comparison at the nadir of B-cell depletion by FACS analysis of CD138^{hi}B220⁻ cells number in the spleen in controls, anti-CD20, anti-CD20/ anti-BAFF and anti-BAFF treated mice. Number of cells is expressed per 10⁶ cells. Significant differences are estimated by one-way ANOVA, Dunn test (**P* < 0.05). Mean values are indicated.







- Metabolic pathways
- Reorganization of actin cytoskeleton
- Signal transduction
- Membrane receptors
- Ion transport
- Transcription factors
- Intracellular trafficking
 - Transcriptionnal regulation
- Anti-apoptotic factors
- Other



Figure 1

Α

С





В

С

Α



















В

Ε

Anti-BAFF
Supplemental Figure legends

Supplemental Figure 1: Experimental protocols in AID-Cre-EYFP mice.

Experimental procedures about immunization by sheep red blood cells (SRBC), Tamoxifen administration and depleting treatment schemes in AID-Cre-EYFP mice. All mice were analyzed at the nadir of B-cell depletion (or theoretical time of B cell depletion for untreated mice), corresponding to day 50 after first anti-CD20 injection (ie D110 after first immunization).

Supplemental Figure 2: Expression profile of specific genes linked with the plasma cell program in newly generated and mature splenic EYFP⁺ plasma cells.

We selected from our transcriptomic data a set of genes encoding transcription factors and chromatin-associated proteins that were recently identified as specifically expressed in antibody secreting cells (20) and compared their expression in newly generated (D6, n=3) and mature (M3, n=4) splenic EYFP⁺ plasma cells. Medians values are indicated.

Supplemental Figure 3: Heat map representation of single-cell gene expression analysis in AID-Cre-EYFP mice.

Heat map representation of multiplex single-cell RT-PCR performed with the Fluidigm Dynamic Array on PB, Ctl-PC, anti-CD20 PC and BM-PC using 21 genes (*Prdm1, MKi67, Chek1, Bub1, Aurka, Ccnd2, Bcl2l11, CXCR3, Rrm2b, Tesc, Fos, Klf6, Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Tnfrsf17, Nfkb2, PerP, Tox2, Tmem176b, Mt2*) allowing to distinguish plasmablasts from long-lived plasma cells, and 1 control gene (*B2 microglobulin*). Columns represent individual gene probes, rows single cells, with color relative to the Ct expression value (scale bar at the right).

Supplemental Figure 4: Targeting BAFF in the context of B-cell depletion slightly impacts on the BM-PC in AID-Cre-EYFP mice.

(A) Expression of BAFF receptor (BAFF-R), transmembrane activator and CAML interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA) on splenic PC by flow cytometry. Splenic plasma cells were identified after a dump staining dump staining CD3/CD4/Gr1/Cd11b/B220 as B220⁻ CD138^{hi} in C57BL/6 mice (**B**) Early increase of BAFF level in the sera after first anti-CD20 injection. 4 immunized wild-type mice received 250 μ g intravenously of anti-CD20 antibody. BAFF level was measured by ELISA before and 5 days after treatment (**C**) The increased level of BAFF in the sera upon B-cell depletion is efficiently suppressed with the anti-CD20/anti-BAFF therapy. (**D**) Comparison by FACS analysis of EYFP⁺B220⁻ plasma cells number in the bone

marrow with repartition of isotypes IgG1, IgA and IgM in controls (n=4), anti-CD20 (n=4) and anti-CD20/ anti-BAFF (n=4) treated mice. Number of plasma cells is expressed per 10^6 cells. (E-G) Evolution of IgM (E), IgG1 (F) and IgA (G) levels in the sera upon anti-CD20/anti-BAFF therapy. IgM, IgG1 and IgA levels were measured by ELISA before and 50 days after first injection of combination therapy. Significant differences are estimated by Mann-Whitney test (* *P* < 0.05). Mean values are indicated.

Supplemental Figure 5: $Ly6G^+$ depletion induces a BAFF-producing $Gr1^+$ compensatory population in the spleen

(A) Analysis of the co-localization of EYFP⁺ plasma cells (green) and Gr1⁺ cells (red) in the spleen of a representative anti-CD20 treated mouse by four-color confocal microscopy with an objective ×40. Scale bar: 150µm (**B**) Increase of all Gr1⁺ populations in the spleen in context of B-cell depletion. Cells were stained with Gr1, Cd11b and Ly6G and separated into Gr1⁺ Ly6G⁻ (corresponding to monocytes, dendritic cells, macrophages) and Gr1⁺Ly6G⁺ (corresponding to neutrophils). Absolute number of Gr1⁺ cells was quantified by flow cytometry. (**C**) No change of BAFF level in the sera upon anti-CD20/ anti-Ly6G therapy. BAFF level was measured by ELISA before and 50 days after first injection of combination therapy. (**D**) Depletion with anti-Ly6G paradoxically induces the expansion of a granulocyte Gr1⁺Cd11b⁺ population producing BAFF that is not present in normal condition. After sorting different subsets of Gr1⁺ population in untreated mice (n=3) and anti-CD20/ anti-Ly6G mice (n=3), BAFF cDNA expression was measured in each Gr1⁺ sub-population and quantified by qRT-PCR. About 10000 cells per population per mice were sorted. Measure of BAFF cDNA expression was normalized to $\beta 2$ *microglobulin* expression for each population (Δ Ct). Significant differences are estimated by Mann-Whitney test (* *P* < 0.05). Mean values are indicated.

Supplemental Figure 6: CD4⁺ T-cell depletion in the spleen in AID-Cre-EYFP mice.

 $CD4^{+}T$ cells number per spleen decreases similarly upon anti-CD4 and anti-CD20/anti-CD4 therapies. Significant differences are estimated by Mann-Whitney test (* P < 0.05). Mean values are indicated.

Supplemental Figure 7: Experimental protocols in NZB/W mice.

Treatment schemes in NZB/W F1 mice. All mice were analyzed at nadir of B cell depletion, corresponding to day 50 after first injection of anti-CD20.

Supplemental Figure 8: Effect of B-cell depletion and BAFF targeting in NZB/W mice.

(A) Comparison at the nadir of B-cell depletion by FACS analysis of B220⁺ cells numbers in the spleen in controls, anti-CD20, anti-CD20/ anti-BAFF and anti-BAFF treated mice. (**B**). Heat map representation of multiplex single-cell RT-PCR performed with the Fluidigm Dynamic Array on splenic CD138^{hi}B220^{lo} and CD138^{hi}B220⁻ populations using 21 genes (*Prdm1, MKi67, Chek1, Bub1, Aurka, Ccnd2, Bcl2111, CXCR3, Rrm2b, Tesc, Fos, Klf6, Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Tnfrsf17, Nfkb2, PerP, Tmem176b, Mt2*) allowing to distinguish plasmablasts from long-lived plasma cells, and 1 control gene (*B2 microglobulin*). Columns represent individual gene probes, rows single cells, with color relative to the Ct expression value (scale bar at the right). (**C**) Comparison at the nadir of B-cell depletion by FACS analysis of CD138^{hi}B220^{lo} cells numbers in the spleen in controls, anti-CD20, anti-CD20/ anti-BAFF and anti-BAFF treated mice. (**D**) Number of CD138^{hi}B220⁻ plasma cells in the bone marrow does not differ between the four groups. Numbers are expressed per 10⁶ cells. Significant differences are estimated by one-way ANOVA, Dunn test (**P* < 0.05). Mean values are indicated.







Plasmablast genesPlasma cell genes













Splenic B220⁻ CD138^{hi}PC Splenic B220^{lo} CD138^{hi}PC

В

D





Supplemental Table 2: Antibody list

Antibodies	Clone	Origine
Flow cytometry		
Primary antibodies		
B220-APC eF780	RA3-6B2	eBisocience
GL7-A647	GL.7	eBisocience
CD138- PE	281-2	BecktonDickinson
CD138- Biotin	281-2	eBisocience
CD3-APC	CD3e	BecktonDickinson
CD4-PE	RM4-5	BecktonDickinson
Gr1-PE	RB6-8C5	BecktonDickinson
Cd11b-PerCP Cy5.5	M1/70	BecktonDickinson
Ly6G-APC	1A8	Biolegend
IgG1-APC	X56	BecktonDickinson
IgA-PE	-	Southern Biotech
IgM-PerCP-Cy5.5	R6-60.2	BecktonDickinson
BAFF-R	7H22-E16	BecktonDickinson
TACI	ebio8F10-3	eBisocience
ВСМА	FAB593F	R&D Systems
Secondary antibody		
SAV-PE-Cy7		BecktonDickinson
Immunohistochemistry		
Primary antibodies		
B220-A647	RA3-6B2	BecktonDickinson
CD3 purified	CD3e	BecktonDickinson
CD4- Biotin	RM4-5	BecktonDickinson
Gr1-A700	RB6-8C5	BecktonDickinson
Chicken anti-GFP	polyclonal	Abcam
Secondary antibodies		
		DaaktanDiakingan
SAV-PE-Cys	1 1 1	BecktonDickinson
goat anti-hamster A568	polyclonal	Molecular Probes

goat anti-chicken A488	polyclonal	Molecular Probes
ELISA		
Coating antibody		
Goat anti-Ig	polyclonal	Southern Biotech
Secondary antibodies		
Ig1-HRP	polyclonal	Southern Biotech
IgA-HRP	polyclonal	Southern Biotech
IgM-HRP	polyclonal	Southern Biotech

Gene	Primer	
Single-cell analysis		
B2M	Mm00437762_m1	
XBP1	Mm00457357_m1	
Prdm1	Mm00476128_m1	
MKi67	Mm01278617_m1	
Chek1	Mm01176757_m1	
Bub1	Mm00660135_m1	
Aurka	Mm01248177_m1	
Ccnd2	Mm00438070_m1	
Bcl2l11	Mm00437796_m1	
CXCR3	Mm99999054_s1	
Rrm2b	Mm01165706_m1	
Tesc	Mm00498717_m1	
Fos	Mm00487425_m1	
Klf6	Mm00516184_m1	
Tnfaip3	Mm00437121_m1	
Bcl2	Mm00477631_m1	
Runx2	Mm00501584_m1	
Tnfrsf17	Mm00495683_m1	
NFKB2	Mm00479810_g1	
PerP	Mm00480750_m1	
Tox2	Mm00455231_m1	
Tmem 176b	Mm01328550_m1	
mt2	Mm00809556_s1	
Cd4	Mm00442754_m1	
CD3e	Mm00599684_g1	
RT-PCR		
Tnfsf13b (BAFF)	Mm00446347_m1	
β2 microglobulin	Mm00437762_m1	

Supplemental Table 3: Taqman primers list (Life Technologies)

III-DISCUSSION

Depuis les années 2000, l'usage de l'anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) a profondément bouleversé la prise en charge des maladies auto-immunes médiées par les cellules B, avec cependant des résultats mitigés voire décevants dans certaines indications. Suite à l'analyse des rates de patients atteints de purpura thrombopénique (PTI) ou d'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) non répondeurs au rituximab, le laboratoire a émis l'hypothèse que le traitement anti-CD20 induit de façon paradoxale la différenciation des plasmocytes de la rate en plasmocytes de longue vie. Certains des plasmocytes devenus à longue vie étaient auto-réactifs, pouvant expliquer l'échec au rituximab et la réponse à la splénectomie (Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2015).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à déterminer si le processus de différenciation plasmocytaire est un processus général ou non et à identifier quelles modifications dans l'environnement splénique induites par le traitement anti-CD20 sont impliquées dans le maintien et la survie des plasmocytes chez la souris. L'objectif final de ce projet translationnel était de pouvoir mettre au point une nouvelle stratégie thérapeutique comprenant le traitement anti-CD20 qui soit plus efficace au cours des cytopénies auto-immunes, voire plus largement au cours des maladies auto-immunes.

A/ Programme transcriptionnel des plasmocytes de la rate à l'état normal et lors de la déplétion lymphocytaire B chez la souris

1-Identification et tri des plasmocytes dans le modèle AID-Cre-EYFP

Les plasmocytes (PCs) sont une composante essentielle de l'immunité humorale mais forment pourtant une population rare, difficile à identifier et à isoler. Notre projet étant essentiellement basé sur l'analyse du programme transcriptionnel des PCs chez la souris, dans différents organes (rate et moelle osseuse), et sous différentes conditions, il était primordial de pouvoir les caractériser de façon sensible et spécifique. Or les marqueurs habituellement utilisés pour identifier les PCs de la moelle, tels que Syndecan-1 (CD138), CD93 ou CD43, sont exprimés de façon hétérogène sur les PCs spléniques. Nous avons donc choisi de nous affranchir de ces marqueurs en utilisant le modèle AID-Cre-EYFP qui permet de marquer de façon irréversible par la protéine EYFP les cellules B entrées dans un centre germinatif (GC) suite à une immunisation par un antigène T-dépendant et un gavage à un temps donné par du tamoxifène (Dogan I, et al 2009). Les cellules B EYFP⁺ qui se différencient en PCs conservent le marquage EYFP, permettant donc de dater les PC EYFP⁺, de les suivre in vivo pendant une longue période de temps et de les analyser précisément. La robustesse de ce système permet d'identifier les plasmocytes B220⁻EYFP⁺ avec une spécificité de 100% comme en témoigne l'expression constante des deux masters gènes des PC Xbp1 et Prdm-1 dans cette population. Toutefois, il n'a pas été aisé d'isoler les PC spécifiquement. Pour obtenir une spécificité de 100%, il a fallu enrichir dans un premier temps la population B220⁻EYFP⁺ avant de la purifier. Sans la phase d'enrichissement, l'analyse des PC a été gênée par la présence de cellules contaminantes, ce qui fut le cas pour l'étude du transcriptome des PC de la moelle et de la rate chez les souris traitées par anti-CD20. Or le tri en 2 étapes est difficile dans les situations où le nombre de cellules est limité et quand l'analyse nécessite une quantité de matériel importante, comme dans le cas du trancriptome. Non restreinte par la quantité de matériel nécessaire, l'analyse en single-cell après le tri en 2 temps des PC de la moelle et de la rate après déplétion B a été plus aisée. De façon intéressante, la présence de cellules contaminantes lors du tri des PC pour le transcriptome indiquait leur étroit contact avec les PC, leur nature pouvait donc nous orienter sur les cellules jouant un rôle dans le maintien des PC localement. Les cellules contaminantes dans la moelle correspondaient majoritairement à des macrophages, des mégakaryocytes et des cellules stromales, dont on connait l'importance dans la niche plasmocytaire médullaire, tandis que dans la rate, nous avons identifié principalement des neutrophiles et des T CD4⁺, concordant avec les résultats obtenus par ailleurs sur la niche plasmocytaire splénique, que nous discuterons plus en détails dans la partie B.

2-Programme transcriptionnel des plasmocytes chez la souris AID-Cre-EYFP

Analyse du transcriptome des PC matures de la rate à l'état normal

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au programme transcriptionnel des plasmocytes (PC) matures (3 mois après l'immunisation) de la rate à l'état normal, que nous avons comparé au programme des PC nouvellement générés (6 jours après l'immunisation). Les PC

nouvellement générés n'exprimaient plus de gènes de prolifération, hormis Chek 1, et avaient le même niveau d'expression des facteurs de transcription plasmocytaires Xbp1 et Irf4, et du facteur de survie plasmocytaire *Mcl1* que les plasmocytes matures. Ces résultats indiquent donc que la sortie du cycle cellulaire par les cellules sécrétrices d'Ac suite à une ré-immunisation est rapide et que l'acquisition du programme plasmocytaire est précoce. Le programme de maturation plasmocytaire dans la rate a peu été étudié. En comparant les PCs nouvellement générés et les PC matures (3 mois après 2 immunisations), nous avons observé que le programme de maturation plasmocytaire, caractérisé par une augmentation de l'expression de Blimp-1, comprenait une surexpression (fold > 4, P < 0.05) par les PC matures de facteurs anti-apoptotiques (*Tnfaip3*, Bcl2), de facteurs de transcription (Nfkb2, Runx2, Tox2, Klf2) et de facteurs impliqués dans le métabolisme ou la signalisation cellulaires (S100a6, Mt2, Btla, Tnfrsf17). Les modifications du métabolisme des lipides, de la glycosylation, et du cytosquelette d'actine traduisent le changement morphologique et cellulaire très important qui survient pour rendre pérenne la sécrétion d'anticorps de façon stable et prolongée dans le temps. De telles modifications dans le métabolisme cellulaire lors de la maturation plasmocytaire ont été aussi rapportées par Shi et al (Shi W, et al 2015).

Analyse en cellule unique des PC de la rate et de la moelle, sans et après traitement par anti-CD20

A partir de cette analyse transcriptomique, et sur la base des données obtenues chez l'homme, nous avons sélectionné un set de gènes diagnostic permettant de discriminer en cellule unique la signature plasmablastique (*Chek1, Bcl2l11, CXCR3, Mki67, Bub1, Aurka, Ccnd2, Rrm2b*) de la signature plasmocytaire, et en particulier du programme à longue durée de vie des PC médullaires (*Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Nfkb2, Tox2, Mt2, Tesc, PerP, Tnfrsf17, Tmem176b, Fos, Klf6).* Les résultats de l'analyse à l'échelle unicellulaire des PC spléniques des souris contrôles à 3 mois sont étonnants, car ils sont caractérisés à la fois par une absence de prolifération (comme mis en évidence par l'analyse du transcriptome) et une faible expression des gènes de PC à longue durée de vie. Dans le modèle AID-Cre-EYFP, les PC EYFP⁺ sont sélectionnés puisqu'ils ont été générés 3 mois auparavant. Nous aurions donc pu nous attendre à observer un programme proche des PC de longue vie. De plus, le programme cellulaire qui différencie un PC de la moelle d'un PC de la rate fait intervenir un faible de nombre de gènes. Shi *et al*, en étudiant l'analyse transcriptomique de la réponse endogène dans le modèle murin Blimp-1^{gfp}, n'avaient retrouvé que très peu de différences entre les PC de la moelle et de la rate. Si certains des gènes surexprimés dans la moelle comparé à la rate sont communs entre nos 2 études, tels que *Tnfrsf 17, Fos, Tmem176b et Mt2*,

d'autres n'ont été retrouvés que dans la nôtre, par exemples *Klf6, Tnfaip3, Bcl2, Runx2, Nfkb2* ou *Tox2* (Shi W, *et al* 2015). L'analyse en cellule unique révèle donc l'hétérogénéité et le faible nombre de gènes de PC de longue vie exprimés par cellule au sein des PC matures des souris contrôles, ce que n'avait pas mis en évidence l'analyse transcriptomique globale.

Les PC des souris traitées par anti-CD20 ont été analysés au nadir de la déplétion B, soit à J50 après la première injection d'anti-CD20. En utilisant l'anti-CD20 murin IgG2a (clone 18B12, Genentech) avec un schéma de 3 injections 250µg/injection, nous avons observé un taux résiduel de cellules B d'environ 2% dans la rate au pic de la déplétion B, un taux proche de celui observé dans la rate des patients traités par anti-CD20 pour un PTI ou une AHAI (Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2015). Les PC de la rate des souris traitées par anti-CD20 analysés en cellule unique diffèrent clairement des PC de la rate des souris contrôles et expriment de façon homogène de nombreux gènes caractéristiques de PC de longue vie, analogues aux PC de la moelle osseuse. Le traitement par anti-CD20 modifie de façon non significative, d'un facteur inférieur à 2, le nombre de PC de la rate. Compte tenu des différences de programme entre les PC des souris traitées par anti-CD20 et les PC contrôles (66% des PC anti-CD20 expriment au moins 4 gènes de PC de longue vie versus 14% dans le groupe contrôle soit un taux 4 fois supérieur), il est très peu probable qu'il s'agisse d'un effet de sélection, il existe donc une modification intrinsèque du programme transcriptionnel des PC des souris traitées par anti-CD20, similaire à ce qui a été rapporté chez l'homme (Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2013, Mahevas M, *et al* 2015).

Intrication de la réponse antigénique exogène avec la réponse endogène dans le modèle AID-Cre-EYFP, conséquences sur l'interprétation des résultats

L'une des difficultés de l'analyse des PC EYFP⁺ dans le modèle AID-Cre-EYFP est l'intrication entre la réponse induite par l'immunisation par SRBC, majoritairement IgG1, et la réponse endogène, comme dans le modèle Blimp-1^{gfp} de Shi *et al*, essentiellement issue des GC des plaques de Peyer, dont proviennent la majorité des PC IgM et IgA de la rate. En effet, une fois que la protéine EYFP est exprimée suite à l'activation de la Cre-ERT2 grâce au tamoxifène, elle ne marque pas de façon exclusive les PC issus de la réponse au SRBC mais aussi toutes les cellules issues de la réponse endogène. Un récent travail du laboratoire (prochainement soumis à publication) s'est intéressé particulièrement à la réponse endogène. Il est présenté en annexe du manuscrit car j'ai participé à la réalisation et à l'analyse de plusieurs des expériences résumées ciaprès. En utilisant le modèle AID-Cre-EYFP, l'ingestion de tamoxifène sans immunisation préalable permet de marquer par la protéine EYFP les cellules B entrant dans un centre germinatif spontané. Les GC des plaques de Peyer sont le principal site où se déroule la réponse endogène,

majoritairement stimulée par les germes de la flore commensale, et donnant lieu à des B mémoires et des PC IgA et IgM qui passent ensuite dans la circulation pour se localiser dans la rate et la moelle. L'analyse des relations clonales entre les populations EYFP⁺ plasmocytaires et mémoires IgA et IgM des plaques de Peyer, de la rate et de la moelle osseuse a révélé d'étroites similitudes, signifiant leur provenance de clones communs. De plus, après avoir déplété avec le traitement anti-CD20 les cellules B, comprenant les cellules B mémoires EYFP⁺ de la rate, nous avons observé au moment de la reconstitution immunitaire B une réaugmentation du nombre des cellules B mémoires EYFP⁺ IgA et IgM spléniques pour atteindre un taux proche d'avant traitement. A l'inverse des cellules B de la rate qui sont sensibles au traitement anti-CD20, les cellules B des GC des plaques de Peyer sont relativement résistantes, confortant l'hypothèse d'un renouvellement des cellules EYFP⁺ de la rate depuis les GC des plaques de Peyer. Enfin, les expériences avec le BrdU tendaient dans le même sens, suggérant que le taux constant de cellules EYFP⁺ observé dans la rate à distance de l'ingestion de tamoxifène provient d'un renouvellement continu et non pas du maintien prolongé localement de ces cellules. Le renouvellement des PC IgA et IgM issus de la réponse endogène est toutefois moins rapide que celui des B mémoires.

Lors d'une immunisation par SRBC, tandis que les PC IgA proviennent quasi-exclusivement de la réponse endogène, 1/3 des PC IgM sont générés en réponse au SRBC et les PC IgG1 sont spécifiques de la réponse au SRBC. Après 2 immunisations par SRBC, les PC IgG1 représentant environ 20 à 30% de l'ensemble des PC. L'étude du programme des PCs par sous-classes d'isotypes aurait pu permettre de distinguer si les plasmocytes IgA avaient un profil différent. Ceci était difficile compte-tenu de leur faible nombre et de la nécessité d'une perméabilisation cellulaire préalable, incompatible avec l'analyse ultérieure en ARN. De plus, la répartition des isotypes était sensiblement similaire entre les conditions contrôle et anti-CD20, limitant le risque de biais dans la comparaison des résultats.

Au final, la réponse endogène mime d'une certaine façon la réponse auto-immune, au cours de laquelle des centres germinatifs répondent aux antigènes du soi, tandis que dans la réponse endogène, des antigènes de la flore commensale stimulent les plaques de Peyer. Ceci explique probablement les 10% de PC EYFP ⁺ chez les souris contrôles 3 mois après immunisation exprimant encore des gènes de prolifération. De plus, il existe une réponse GC suite à l'immunisation au SRBC qui peut persister au niveau de la rate plus de 6 mois après, pouvant aussi contribuer à la génération de plasmablastes (Dogan I, *et al* 2009). La réponse endogène aurait pu altérer l'analyse du programme des plasmocytes des souris ayant reçu l'anti-CD20 en diluant la fraction de plasmocytes à longue durée de vie avec des plasmocytes nouvellement formés. De façon étonnante, les PC des souris ayant reçu l'anti-CD20 n'exprimaient pas de gènes

de prolifération, composant une population homogène ayant clairement modifié son programme, renforçant encore plus la différence avec le groupe contrôle.

3-Analyse en cellule unique des plasmocytes de la rate et de la moelle sans et après traitement par anti-CD20 dans le modèle NZB/NZW

Dans le modèle AID-Cre-EYFP, la réponse GC dans la rate n'est pas aussi intense ni continue suite à une immunisation que dans les maladies auto-immunes (MAI). L'absence de GC spontanés présents en grand nombre et de génération continue de plasmablastes secondairement différenciés en PC pouvait constituer une limite et une critique à notre travail puisque ne mimant pas la réponse immune observée chez l'homme au cours des MAI, que ce soit le PTI, l'AHAI ou le lupus. Nous avons donc complété cette étude par une analyse des PC sur un modèle murin autoimmun. Le modèle NZB/NZW se caractérise par le développement spontané de manifestations cliniques et immunologiques proches de celles du lupus chez l'homme. Il existe plusieurs modèles de lupus murins mais le modèle NZB/NZW est celui qui développe la maladie rénale la plus proche de la néphrite lupique de l'homme. De nombreuses études ont utilisé et validé ce modèle pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques, les phases de développement de la maladie lupique ainsi que la réponse aux traitements. En particulier, une étude s'était déjà intéressée au compartiment plasmocytaire de la rate et avait suggéré la présence de 2 populations distinctes, l'une de longue durée de vie générée précocément avant l'apparition des signes cliniques et représentant environ 40% des PC à partir de l'âge de 10 semaines, et l'autre, de courte durée de vie, générée en continu. Ces 2 fractions ont en commun de contenir des PC auto-réactifs, sécréteurs d'auto-anticorps pathogènes (Hoyer BF, et al 2004).

Les PC n'exprimant pas la protéine EYFP dans le modèle NZB/NZW, nous avons choisi de les identifier avec le marqueur le plus utilisé dans la littérature, Syndecan-1 (CD138), malgré une probable hétérogénéité de son expression sur les PC de la rate et comme en témoignent nos résultats sur le modèle AID-CRE-EYFP (Kallies A, *et al* 2004). Nous avons séparé les fractions CD138^{hi} en B220^{lo} et B220⁻ en supposant distinguer de cette façon les fractions plasmablastique et plasmocytaire. Cette distinction nous avait paru d'autant plus intéressante que l'on avait observé une quasi-disparition de la population CD138^{hi}B220^{lo} sous anti-CD20 tandis que la fraction CD138^{hi}B220⁻ persistait. Malgré tout, l'analyse en cellule unique du programme cellulaire des PC a mis en évidence un mélange de plasmablastes et de PC dans le compartiment CD138^{hi}B220⁻.

Alors que les données de la littérature suggéraient l'existence, sur la base d'expériences menées avec le BrdU, d'une population plasmocytaire de longue durée de vie dans la rate représentant 40 % des PC, et ce dès le plus jeune âge chez les souris NZB/NZW, nous n'avons pas mis en évidence ce programme, avec les limites inhérentes à notre approche qui comporte un nombre restreint de gènes. Moins de 2% des PC CD138^{hi}B220⁻de la rate de la souris NZB/NZW ont un profil de longue vie, en comparaison avec les 40% dans la moelle et dans la rate après traitement anti-CD20. Une telle différence de proportion dans la condition anti-CD20, dans le même compartiment CD138^{hi}B220⁻, sans que le nombre absolu ne varie, rend peu probable l'hypothèse d'un enrichissement de la population à longue durée de vie par le traitement anti-CD20. Néanmoins, notre analyse n'étudie pas stricto sensu la durée de vie des cellules, mais leur programme. La notion de programme « à longue durée de vie » doit être utilisée avec prudence car, si les évolutions observées reflètent bien un changement du programme transcriptionnel, nous n'avons pas la preuve qu'un PC d'une souris contrôle et celui d'une souris traitée par anti-CD20 aient une durée de vie effectivement différente. Ces résultats révèlent néanmoins un comportement très particulier des PC, qui présentent une plasticité de leur programme d'expression génique dictée par les modifications de leur microenvironnement.

En effet, les résultats obtenus dans le modèle transgénique AID-Cre-EYFP suggèrent que la modification du profil transcriptionnel des PC après traitement par anti-CD20 est en partie liée à la modification du milieu.

B-Niche plasmocytaire splénique dans le contexte de déplétion B

1-Le rôle majeur de la cytokine BAFF

Nous avons observé une augmentation du taux de BAFF à la fois dans le serum et les surnageants de splénocytes après traitement par anti-CD20. De plus, l'analyse en cellule unique du programme des PC des souris AID-Cre-EYFP et NZB/NZW après traitement par anti-CD20 a mis en évidence une augmentation de l'expression de l'effecteur de la voie non canonique NFK*B*2,

impliqué dans la survie cellulaire, en comparaison avec les souris contrôles. Or, cette voie peut être activée par l'interaction de BAFF avec BAFF-R (Gardam S, *et al* 2014).

BAFF est un facteur de survie essentiel des cellules B mais aussi des PC de la moelle. Son effet sur les PC médullaires est néanmoins plus modeste et redondant comparé à APRIL (Ingold K, *et al* 2005, Benson MJ, *et al* 2008). Ici, nous avons montré que BAFF était le facteur de survie principal des PC de la rate dans le contexte de déplétion B. En effet, alors que le traitement anti-CD20 seul promeut la différenciation en PC spléniques de longue vie, l'association au traitement anti-BAFF interfère sur ce processus et empêche leur maintien.

De façon intéressante, si BAFF semble être primordial dans le contexte de déplétion B, le traitement anti-BAFF seul impacte beaucoup plus modestement les PC. Une hypothèse à cette observation serait en amont un effet synergique de l'anti-BAFF avec l'anti-CD20 sur la déplétion des cellules B, notamment sur les GC, permettant ainsi de bloquer plus complètement l'alimentation des plasmablastes à partir des GC, secondairement différenciés en PC. La déplétion des cellules B étant moins efficace avec l'anti-BAFF seul, son impact serait donc moindre sur le blocage de la génération des PC à partir des GC persistants. Cependant, si une déplétion B profonde affecte le nombre de plasmablastes et de PC à courte durée de vie, le pool des PC à longue vie n'est pas impacté, comme l'atteste l'absence d'effet de l'anti-CD20 ou de l'irradiation sur les PC de longue vie de la moelle (Slifka MK, *et al* 1998, Ahuja A, *et al* 2008). Notre analyse ayant montré dans la rate des souris traitées par anti-CD20 un profil de PC à longue vie, similaire à celui des PC de la moelle osseuse, l'effet de l'anti-BAFF semble donc plutôt primer directement sur la survie des PC. L'effet différentiel entre le traitement par anti-BAFF seul et la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF suggère donc une dépendance accrue des PC de la rate à BAFF dans le contexte de déplétion B.

Dans la niche médullaire, plusieurs composants cellulaires et cytokiniques sont essentiels, comprenant APRIL et IL-6, avec une certaine redondance puisque par exemple un déficit en IL-6 ne suffit pas à déstabiliser la niche et à faire chuter le nombre de PC dans la moelle (Cassesse G, *et al* 2003). Au vu de nos résultats, la niche splénique diffère nettement puisque BAFF apparait comme le facteur de survie prépondérant, APRIL et IL-6 semblent bien plus secondaires que dans la moelle et ne compensent pas le défaut de BAFF. Cette observation est importante dans la perspective d'une application clinique puisque cibler BAFF permettrait de déstabiliser spécifiquement la niche splénique sans impacter les PC protecteurs de la moelle. Dans notre modèle AID-Cre-EYFP, le taux d'IgG1 dans le sérum n'a pas diminué à la fin du traitement anti-CD20/ anti-BAFF. Dans le modèle NZB/NZW, nous avons aussi observé une diminution significative du nombre de PC de longue vie dans la rate avec la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF, sans impacter les PC de la moelle.

Nous avons choisi d'analyser les souris NZB/NZW à un âge relativement jeune, 27 semaines, afin d'observer plus aisément le processus de différenciation des PC sous anti-CD20. Aussi, nous n'avons pas pu observer d'effet sur la progression rénale puisque les souris n'avaient pas encore développé de néphrite lupique, le pic de la maladie se situant plutôt aux environs de 38 semaines. Nous projetons donc de tester prochainement la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF chez des souris NZB/NZW à un âge plus avancé, lorsque les lésions rénales seront déjà apparues, afin d'en évaluer son efficacité curative. Toutefois, deux études antérieures ont déjà testé la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF par blocage de BAFF-R (anti-BR3) dans le modèle NZB/NZW avec des résultats positifs sur l'évolution de la maladie rénale associée à une baisse plus importante des titres d'auto-Ac comparé aux monothérapies (Bekar KW, et al 2010, Lin W, et al 2015). Notre étude permet donc d'apporter une explication mécanistique à cet effet bénéfique de la combinaison, via notamment une dépendance des PC spléniques à BAFF pour survivre que permet de cibler l'anti-BAFF dans le contexte de déplétion B. En revanche, nous ne pouvons pas répondre à la question d'un effet direct de la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF sur la déstabilisation de la niche rénale compte-tenu de l'intrication avec l'alimentation depuis la rate. Wang et al avaient décrit plusieurs facteurs de survie dans les reins inflammatoires, comprenant BAFF, mais aussi APRIL et IL-6 (Wang W, et al 2014). Ces études suggèrent que les PC des reins sont sous la dépendance prédominante de BAFF et/ou qu'ils sont majoritairement alimentés par les PC de la rate, qui sont eux clairement dépendants de BAFF dans le contexte de déplétion B.

2-Les neutrophiles, principale source de production de BAFF dans la niche splénique

Il a récemment été montré que les neutrophiles spléniques pouvaient favoriser la survie des cellules B et la différenciation des PC au cours d'une réponse T-indépendante, via leur production de BAFF (Puga I, *et al* 2011). Dans notre étude, nous avons identifié les neutrophiles comme étant la principale population de la rate productrice de BAFF, en conditions normales et chez les souris traitées par anti-CD20. Ceci concorde avec l'étude de Coquery *et al* qui avait aussi identifié les neutrophiles spléniques comme une source locale importante de BAFF dans le modèle NZB/NZW (Coquery CM, et al 2014). De façon intéressante, nous avons observé un doublement de la population granuleuse Gr1⁺ (comprenant les neutrophiles) dans la rate des souris traitées par anti-CD20, pouvant expliquer l'augmentation de BAFF observée après déplétion B, en plus d'une plus grande disponibilité de BAFF soluble. Le doublement de la population Gr1⁺ était associé à l'observation d'une augmentation du nombre de leurs interactions avec les PC EYFP⁺ dans la rate

en microscopie confocale. De telles interactions avaient aussi été observées dans la rate de patients PTI et AHAI. Nous avons donc cherché à dépléter les neutrophiles avec un anticorps spécifique (anti-Ly6G) par des injections répétées, associées à l'anti-CD20. De façon inattendue, la déplétion des neutrophiles Ly6G⁺ a induit l'apparition d'une population compensatrice au sein des granuleux Gr1⁺Cd11b⁺Ly6G⁻, productrice de BAFF, similaire aux neutrophiles, qui ne produisait que peu de BAFF dans la condition contrôle. Il est possible que les neutrophiles aient modulé l'expression de Ly6G sous l'influence de l'anticorps déplétant. Ainsi, bien que plusieurs éléments convergent vers l'hypothèse d'un rôle des neutrophiles dans le maintien et/ou la différenciation plasmocytaires dans la niche splénique, les expériences in vivo ne sont pas aisées. D'autres équipes ont utilisé le même clone 1A8 anti-Ly6G afin de mettre en évidence d'autres fonctions des neutrophiles. Si la plupart de leurs expériences ne nécessitaient qu'une ou 2 injections, ce qui est impossible dans notre cas, l'apparition extrêmement précoce de la population compensatrice, dès les premières 24 heures, incite toutefois à la prudence dans l'interprétation des résultats des études menées avec ce traitement.

3-Le rôle des T CD4⁺ dans le maintien des plasmocytes dans la rate

Récemment, plusieurs travaux ont suggéré un rôle des lymphocytes T-CD4⁺ dans la survie des PC provenant du sang périphérique ou des amygdales de l'homme, mais pas de la moelle. Cet effet a été observé à la fois in vivo après déplétion de l'ensemble des lymphocytes T-CD3⁺ chez des souris xénogreffées et in vitro avec des T CD4⁺ (Withers DR, et al 2007, Rodriguez-Bayona B, et al 2013, Ramos-Amaya A, et al 2015). De façon intéressante, nous avons observé de la même façon que dans les rates humaines de PTI et d'AHAI, des interactions étroites entre les PC EYFP⁺ et les T CD4⁺ dans la rate des souris AID-Cre-EYFP. Ceci concernait environ 1/3 des PC EYFP⁺. Enfin, les expériences de déplétion des T CD4⁺ in vivo dans le modèle AID-Cre-EYFP ont montré une diminution significative du nombre de plasmocytes à longue vie EYFP⁺, spécifiquement dans le compartiment splénique. De façon étonnante, le traitement anti-CD4 seul n'a eu aucun effet sur les PC. Withers et al avaient rapporté un effet de l'anti-CD3 sans l'associer à un anti-CD20 mais sur des souris génétiquement déficientes en B (Withers DR, et al 2007). Il est donc possible qu'un déficit en cellules B, inné ou acquis, ait un effet indirect sur l'activation des T CD4⁺, plus aptes alors à favoriser la survie des PC. Plusieurs études ont rapporté une activation directe des T CD4⁺ par BAFF via BAFF-R (Huard B, et al 2001, Huard B, et al 2004, Ng LG et al 2004). Or BAFF augmente dans le contexte de déplétion B, à la fois du fait d'une augmentation du

BAFF soluble mais aussi comme mécanisme de compensation, pour pallier au déficit en B. Ceci pourrait expliquer que BAFF soit un facteur aussi primordial pour la survie des PC dans le contexte de déplétion B, à la fois en agissant directement via ses 3 récepteurs exprimés sur les PC, et indirectement via l'activation des T CD4⁺. Les expériences de co-culture in vitro de PC EYFP⁺ spléniques avec des T CD4⁺ au préalable primés pendant 12 heures avec BAFF à différentes concentrations n'ont pas mis en évidence de différence sur la survie des PC EYFP⁺, en comparaison avec des T CD4⁺ non primés (résultats non montrés). Il est possible que l'effet du BAFF soluble n'active pas de la même manière les T-CD4⁺ que le BAFF membranaire directement capté à partir des cellules productrices, par exemple les neutrophiles dont le nombre double après anti-CD20. Cette hypothèse est corroborée par l'observation d'une activation et d'une prolifération des T CD4⁺ en présence de neutrophiles spléniques producteurs de BAFF dans le modèle NZB/NZW par Coquery et al (Coquery CM, et al 2014). Si cette hypothèse s'avérait exacte, l'association d'un anti-BAFF au cours des MAI présenterait un intérêt supplémentaire, en inhibant aussi les T-CD4⁺. En effet, si les expériences avec les T-CD4⁺ activés par BAFF se sont révélées négatives, en revanche, d'autres expériences de co-culture que nous avons faites ont indiqué une meilleure survie des PC en présence de T-CD4⁺ de rate provenant de souris traitées par anti-CD20 comparé à des T-CD4⁺ de souris contrôles. Ces résultats tendent donc dans le même sens que ceux obtenus in vivo et indiquent peut-être indirectement l'implication de BAFF, bien que d'autres signaux provenant de l'environnement splénique post-anti-CD20 ne puissent être exclus.

Le schéma ci-après illustre notre hypothèse concernant l'activation des T CD4⁺ dans le contexte de traitement par anti-CD20 et leur rôle sur la survie des PC de la rate. L'activation des T CD4⁺ serait médiée par BAFF dont le rôle sur la survie serait donc double, à la fois direct et indirect.



Enfin, le mécanisme par lequel les T-CD4⁺ induisent un effet sur la survie des PC n'est pas clair. Le taux de BAFF dans le sérum n'était pas diminué après traitement par anti-CD20/ anti-

CD4 suggérant que l'effet des T-CD4⁺ sur la survie des PC ne passe pas principalement par la production de BAFF, bien qu'une production locale dans la rate de BAFF par les T CD4⁺ ne puisse être exclue (Goenka R, *et al* 2014). Compte-tenu des données de la littérature et de nos observations en microscopie confocale, il est probable que le contact cellulaire entre les T CD4⁺ et les PC soit l'élément clé (Withers DR, *et al* 2007, Rodriguez-Bayona B, *et al* 2013, Ramos-Amaya A, *et al* 2015). Les PC de la rate expriment plusieurs molécules nécessaires à l'interaction avec les cellules T telles que CD40, ICOS-L, PDL-1 ou CD80. Cependant, dans l'étude menée par Withers *et al*, le blocage de CD40-CD40L n'a pas eu d'effet majeur sur la survie des PC, ni in vivo ni in vitro (Withers DR, *et al* 2007). Compte-tenu des nombreuses molécules de co-stimulation exprimées sur les PC, d'autres interactions sont possiblement impliquées. La question reste donc ouverte.

C-Confrontations aux données chez l'homme et perspectives de recherche

1-Le processus de différenciation plasmocytaire dans le contexte de déplétion B

Dans l'ensemble, nous avons observé de grandes similitudes entre l'homme et la souris, validant la possibilité de transposer nos résultats à ce qui pourrait se passer chez l'homme. En effet, alors que la déplétion B est habituellement décrite comme moins bonne par le traitement anti-CD20 chez la souris que chez l'homme, celle-ci était néanmoins satisfaisante puisque le taux de B résiduels était quasiment indétectable dans le sang au pic de déplétion B et de l'ordre de 2% dans la rate, la majorité des LB persistants correspondant à des GC. Bien que les GC soient plus résistants au traitement anti-CD20 chez la souris que chez l'homme, cette résistance est toutefois relative puisque le nombre de GC est diminué d'un facteur supérieur à 35 comparé à des souris non traitées. De plus, la déplétion B est habituellement moins efficace dans les modèles murins auto-immuns, en particulier dans le modèle NZB/NZW. Cependant, comme précédemment rapporté dans la littérature, la déplétion B continue par des injections répétées d'anti-CD20 a permis d'obtenir une déplétion B profonde proche de celle observée dans la modèle AID-Cre-EYFP (Bekar KW, *et al* 2010). Enfin, nous n'avons pas observé de diminution significative du nombre de PC sous traitement par anti-CD20, de façon similaire à ce qui avait été rapporté chez l'homme. Surtout, nos résultats confortent ceux observés au cours du PTI et de l'AHAI sur le

processus de maturation plasmocytaire paradoxale sous anti-CD20, indiquant qu'il s'agit bien d'un processus général.

Cette conclusion soulève plusieurs questions. En effet, le traitement anti-CD20, s'il est le plus spécifique, n'est pas le seul à induire une déplétion B. Aussi peut-on se demander si d'autres traitements immunosuppresseurs, tels que le cyclophosphamide ou le mycophénolate mofétil, eux aussi pourvoyeurs de lymphopénie B, induisent ce même phénomène de différenciation plasmocytaire. Comme nous l'avons vu, les PC de longue vie ne semblent pas exister à l'état normal dans la rate de souris. Or, les seuls papiers ayant rapporté l'existence de tels PC chez la souris ont porté sur des modèles de déplétion B, soit après traitement par anti-CD20, donc concordants avec nos résultats, soit après irradiation (Slifka MK, et al 1998, Ahuja A, et al 2008, DiLillo DJ, et al 2008). Ceci pourrait signifier que la déplétion B, quel que soit son mécanisme, favorise ce processus de différenciation. Savoir si d'autres traitements immunosuppresseurs peuvent interférer de la même façon sur les PC, notamment auto-réactifs, nous semble important puisque ces traitements sont encore largement utilisés en routine, dans de nombreuses indications, avec des résultats variables, donc pouvant être optimisés. Enfin, nous avons rapporté ce processus de différenciation dans la rate, mais comme décrit dans l'introduction, les PC pathogènes se localisent aussi dans les tissus inflammatoires. Il serait donc intéressant de savoir si ce processus de différenciation peut aussi avoir lieu dans ces sites, en particulier au niveau des reins au cours du lupus. En effet, bien qu'une partie des PC observés dans les reins lupiques proviennent de la rate, l'observation de structures lymphoïdes tertiaires dans les reins suggère aussi la possibilité d'une différenciation plasmocytaire in situ (Wang W, et al 2014, Chang A, et al 2011). Nous avons souhaité analyser le profil des PC des reins des souris NZB/NZW. Cependant, les ayant analysées à un âge relativement jeune, 27 semaines, les lésions rénales n'étaient pas encore apparues, les PC triés dans les reins étaient encore trop peu nombreux pour être analysés. Comme mentionné plus haut, nous souhaitons tester la combinaison anti-CD20/anti-BAFF chez des souris NZB/NZW plus âgées, que nous comparerons à des souris traitées par anti-CD20 seul et non traitées. Nous pourrons alors trier des PC des reins au stade de néphrite lupique et comparer leurs profils dans les conditions contrôle et anti-CD20. Chez l'homme, une étude est en cours par notre laboratoire, visant à analyser et comparer le profil des PC triés à partir de biopsies rénales de patients lupiques présentant une glomérulonéphrite de stade IV ou V, à différents temps correspondant à l'état naïf avant l'introduction de tout traitement, ou après échec de l'anti-CD20 ou d'autres traitements immunosuppresseurs. Cette étude pourrait permettre de savoir à la fois si le mécanisme de différenciation plasmocytaire a lieu aussi dans les reins, et s'il est exclusif ou non de l'anti-CD20. Les premiers résultats semblent indiquer un processus similaire dans le rein et dans la rate, et induit non pas que par l'anti-CD20 mais aussi par d'autres immunosuppresseurs tels que le cyclophosphamide et le mycophénolate mofétil. D'autre part, des études de clonage sont en cours pour savoir si certains de ces PC différenciés sont auto-réactifs. Enfin, l'analyse des glandes salivaires au cours du Syndrome de Gougerot-Sjogren avait aussi révélé la présence de structures lymphoides tertiaires, comprenant notamment des PC auto-réactifs. Aussi peut-on se demander si un tel processus de maturation plasmocytaire in situ pourrait avoir lieu, compte-tenu de l'échec du rituximab dans un large essai prospectif dans cette indication (Devauchelle-Pensec R, *et al* 2014).

2-La combinaison anti-CD20 + anti-BAFF en application clinique

Chez la souris, à la fois dans les modèles AID-Cre-EYFP et NZB/NZW, nous avons observé une diminution nette des PC de longue vie de la rate avec le traitement anti-CD20/ anti-BAFF. Au cours des cytopénies auto-immunes, la rate est le principal site de production des auto-Ac pathogènes, permettant donc d'espérer que la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF puisse cibler l'ensemble, ou au moins la grande majorité, des PC auto-réactifs, sans avoir recours à la splénectomie. En revanche, au cours du lupus, les PC auto-réactifs, qui se localisent pour une partie significative dans la moelle et ne sont pas ciblés par les thérapeutiques habituelles telles que l'anti-CD20 ou le cyclophosphamide, sont déjà probablement à programme de longue vie. Compte-tenu de nos résultats, il est probable que l'association avec l'anti-BAFF impacte peu ce compartiment d'où un risque de moindre efficacité. Toutefois, la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF présente d'autres bénéfices potentiels. En premier lieu, elle permet une meilleure déplétion B que l'anti-CD20 seul chez la souris. Il est possible que ce bénéfice ne soit pas aussi net chez l'homme compte-tenu de l'efficacité de l'anti-CD20 seul. En revanche, BAFF tient un rôle important dans la rupture de tolérance B et favorise l'émergence de clones auto-réactifs. Etant donné son augmentation après déplétion B, BAFF pourrait avoir un rôle dans le taux de rechutes élevé observé post anti-CD20, d'où l'intérêt de lui associer l'anti-BAFF, de façon décalée. Dans notre situation, en raison de l'observation d'une augmentation précoce de BAFF, dès 5 jours après le début de l'anti-CD20, et du processus de différenciation des PC, nous avons choisi de les combiner d'emblée afin de s'assurer de l'absence de résistance ultérieure. Aussi, il est probable qu'une association combinée suivie d'un traitement d'entretien par anti-BAFF soit la plus pertinente, à la fois pour empêcher l'émergence de PC auto-réactifs de longue vie et pour éviter les rechutes. Un tel schéma a été choisi pour un essai clinique au cours du PTI chronique, avec l'objectif d'obtenir un taux plus élevé de réponse complète qu'avec l'anti-CD20 seul, et qui soit persistant. Il s'agit d'un essai de phase II, visant aussi à en évaluer sa tolérance, et qui débutera prochainement dans le service de Médecine Interne du CHU Mondor, centre de référence des cytopénies auto-immunes de l'adulte. Par ailleurs, plusieurs essais dont un essai contrôlé testant la combinaison anti-CD20/ anti-BAFF dans le lupus chez l'homme sont aussi en cours, avec un schéma différent, le traitement anti-BAFF étant décalé et administré après l'anti-CD20 (essai Explorer)

En conclusion, les plasmocytes forment une population rare mais extrêmement importante et complexe. De façon étonnante, les plasmocytes possèdent la capacité singulière de transformer leur programme transcriptionnel sous l'influence des modifications environnementales. La haute dépendance aux facteurs de survie externes est probablement le talon d'Achille des plasmocytes, les en priver suffit à les éliminer. Dans le traitement des maladies auto-immunes, et en particulier dans le contexte du traitement anti-CD20, ce concept unique en immunologie, propre aux plasmocytes, prend tout son intérêt et ouvre la perspective à de nouvelles approches thérapeutiques.

IV-ANNEXE

A systemic IgM memory subset harboring mutated Ig genes is generated in nonimmunized mice from persistent gut immune responses.

Simon Le Gallou¹, Lan-Huong Thai^{1,*}, Remi Fritzen^{1,*,#}, Jérôme Mégret², Philip Yu³, Takuya Nojima⁴, Daisuke Kitamura⁴, Emmanuelle Bille⁵, Xavier Nassif⁵, Alain Charbit⁵, Sandra Weller¹, Jean-Claude Weill^{1§} and Claude-Agnès Reynaud^{1§}

¹Team "Development of the immune system", Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
²Flow cytometry core facility, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24-CNRS UMS 3633, Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
³Institute of Immunology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany
⁴Division of Molecular Biology, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba, Japan
⁵Team "Pathogeny of systemic infections", Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR 8253, Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Context, Paris Pathogeny of Systemic infections", Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151-CNRS

Paris, France

[#] Current Address: College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, UK

* equal contribution

§ Corresponding authors

jean-claude.weill@inserm.fr, claude-agnes.reynaud@inserm.fr

Summary

We describe here, based on an inducible AID fate mapping mouse model, a new splenic memory B cell population, including mainly IgM⁺ B cells, together with IgA⁺ B and plasma cells, which is generated in mice in the absence of deliberate immunization. While the IgA component is dependent upon the gut flora, IgM memory B cells are still generated in germfree mice, albeit with minimal Ig gene diversification. Clonal relationships, renewal kinetics after anti-CD20 treatment, and BrdU labeling reveals that persistence of this population is essentially maintained by constant output from Peyer's patches of clones persisting in germinal centers. IgM-secreting hybridomas established from IgM memory B cells showed reactivity against gut luminal content, Gram⁺ and Gram⁻ bacterial isolates and endogenous retroviruses, thus indicating that ongoing activation of gut-associated B cells generates a large systemic compartment showing long-lasting clonal persistence in the absence of inflammatory conditions and an antigenic specificity endowing them with a capacity of activation upon encounter of systemic bacterial infections.

Introduction

Protection against infection is achieved by a multi-layered immune system, mobilizing, within a different timing, the fast-responsive elements of the innate immune system recognizing universal pathogens motifs or danger elements, and the late-emerging effectors of the adaptive immune response harboring unique specificities. However, multiple immune effectors exist in-between, and achieve diverse functions with an intermediate kinetics, either due to their pre-activation status and/or repertoire restriction linked with large clonal dominance. B1, MZ or memory B cells represent such rapid effector subsets of the humoral response (Martin and Kearney, 2002).

Memory B cells themselves compose a compartment whose complexity only begins to be deciphered. Within memory responses that are classically linked with AID expression and the induced modifications in the specificity of antigen recognition and effector function of the B-cell receptor, different subsets have been identified, and their distinct activation potential has been correlated with either their differentiation profile or their Ig isotype (Dogan et al., 2009; Laffleur et al., 2015; Zuccarino-Catania et al., 2014). Recently, an AID-dependent, pre-GC compartment has also been described, constituted by expanded clones showing long-lasting persistence in the absence of affinity maturation (Kaji et al., 2012; Taylor et al., 2012). In humans, the existence of multiple subsets with distinct functions is also increasingly documented, even though the precise ontogeny of the different effector subsets is still a matter of debate (Bagnara et al., 2015; Berkowska et al., 2011; Seifert et al., 2015).

Chronic activation in gut-associated lymphoid tissues represents an additional layer of activation, leading to major clonal expansion within IgA plasma cells driven by the gut microbiota in the absence of external challenges (Lindner et al., 2012). To what extent the compartmentalization of the mucosal immune system is achieved - at least in laboratory mice from clean animal facilities - is still a matter of debate, and this question more specifically pertains to the behavior of antigen-experienced cells that have undergone activation by gut-associated antigens (Belkaid et al., 2013). While mesenteric lymph nodes appear to play an important role as a firewall preventing excessive presentation of antigens sampled from the gut lumen through restriction of dendritic cell traffic (Macpherson et al., 2012), recent data nevertheless suggest that bacterial antigens or their immune complexes may actually migrate to peripheral lymphoid sites in non-inflammatory conditions (Budeus et al., 2015; Gomez de Aguero et al., 2016; Proietti et al., 2014; Zeng et al., 2016).

Using lineage tracing of AID-experienced cells, we report here that in healthy, non-immunized mice raised in a clean animal facility, a large splenic IgM (and smaller IgA) compartment harboring mutated Ig genes and specificities against antigens from bacteria and endogenous retroviruses, is maintained through the constant input of B cell clones persisting in Peyer's patch germinal centers.

Results

A large, persistent AID-labeled B-cell population in non-immunized mice.

The AID-Cre-ERT2xROSA26-loxP-EYFP mouse (hereafter named AID-Cre-EYFP) allows the labeling of AID-expressing B cells engaged in an immune response, upon simultaneous immunization and tamoxifen feeding (Dogan et al., 2009). In our previous work in which a sheep red blood cell (SRBC) response was followed, an experimental scheme of 3 tamoxifen ingestions was used, corresponding approximately to a 15 days labeling period (Fig.1A)(Jarjour et al., 2014). Surprisingly, a large B cell population was labeled in the absence of immunization upon similar tamoxifen feeding and persisted several months after the initial labeling (Fig.1B and C). This population comprised memory B cells and plasma cells in the spleen in an approximately 4:1 ratio. Memory B cells were mainly IgM⁺, with a smaller IgA fraction, while the proportions were reversed for plasma cells. In the bone marrow, IgA⁺ plasma cells dominated(Fig.1B and D).

SRBC immunization generates a potent and robust response. When analyzed 3 months after the last tamoxifen labeling, the "endogenous response" appears surprisingly to account for 2/3 of the cells labeled during parallel SRBC immunization, i.e. represent the mobilization and persistence of twice as many B cells as in the SRBC memory response. The SRBC response resulted nevertheless in the distinct formation of IgG1 memory B cells in the spleen and IgG1 plasma cells in spleen and bone marrow. Concerning IgM memory B cells, approximately one-third of them are SRBC-specific. Most IgA-positive cells labeled during SRBC immunization represent in contrast the endogenous response.

While ongoing AID activation has been described in spontaneous/chronic germinal centers, the persistence of the B cell population labeled during a 15 days scheme appears very surprising, with little decay observed until one year after the labeling period in spleen, and a two-fold decay after one year in Peyer's patches (Fig. 1E and F). Whereas the frequency of EYFP⁺ labeled cells is highest in Peyer's patches (around 1-2% after 3 months compared to 0.2% in spleen), total cell numbers are more important in spleen, approximately 200 000 cells compared to 35 000 in Peyer's patches. These numbers should also be corrected for the labeling efficiency, 20 to 50% of AID-expressing cells at a given time becoming EYFP⁺ (Dogan et al., 2009; Tas et al., 2016)

Insertion of the Cre recombinase disrupted the *Aicda* locus, making the reporter line haploinsufficient for AID. We therefore designed a new reporter model in which the same targeting construct was used to modify a bacterial artificial chromosome including 200 kb around the *Aicda* gene, and obtained two transgenic lines with one copy each. While EYFP-labeled B cell numbers were slightly lower 3 months after labeling, compared to the knock-in mouse, this difference was leveled 5 months after labeling, clearly indicating that *Aicda* haploinsufficiency has only a minor impact on this AID-dependent spontaneous response (Fig. 1G).

The endogenous response originates from B2 cells.

B1 B cells are considered to be the main providers of natural antibodies, and, more globally, to be spontaneously activated cells. To ask whether the endogenous response observed is of B1 or B2 origin, we restored sub-lethally irradiated mice with mixtures of cells from bone marrow and peritoneal cavity, coming from wild-type or AID-Cre-EYFP mice, in either of the two combinations (Fig. 2A).

A large memory B cell subset was labeled when bone marrow cells from AID-Cre-EYFP mice were used in the transfer, while minimal labeling was observed when the reporter line was used as source of peritoneal cavity B cells (Fig. 2B). Interestingly, a distinct labeling a B1b cells in the peritoneal cavity was observed upon restoration with AID-Cre-EYFP bone marrow cells and also in control AID-Cre-EYFP fed with tamoxifen, indicating that a fraction a B1b cells can express AID (Fig. S1). The endogenous response thus appears to have mainly a B2 origin.

Diverse localizations of memory B cells and plasma cells in the spleen

The EYFP reporter allows the easy localization of AID-labelled cells by confocal microscopy. Using four-color staining for IgM, IgA, B220 and EYFP, we observed that IgM memory B cells were surprisingly dispersed among naive B cells within splenic follicles, and in the marginal zone as well (Fig.3A-C, inset a). IgM plasma cells were essentially in the red pulp, located within IgM plasma cell clusters (Fig. 3C, inset c), while IgA plasma cells were equally distributed between red pulp and T-cell zones (Fig. 3C, insets b and c).

The endogenous response originates from germinal center B cells

Mouse transitional B cells have been described as expressing low, but distinct levels of AID (Kuraoka et al., 2011), and we therefore studied at which stage of B-cell development the Cre-ERT2 enzyme was activated. To this end, we analyzed splenic B cells 48 hrs after a single tamoxifen feeding. Eighty per cent of spleen EYFP⁺ B cells were GL7⁺ and localized in germinal center structures (Fig. 4A and data not shown). We performed the same short-term labeling on 18 day-old animals, at which stage the vast majority of spleen B cells is composed of immature B cells. In these conditions, the labeling was marginal, clearly indicating that AID expression level at the transitional stage is insufficient to allow for Cre recombinase activity at the reporter locus (Fig. 4B). EYFP labeling thus marks cells engaged in spontaneous germinal centers.

The follow-up of GL7 labeling with time showed a rapid decay, indicating rapid maturation of labeled cells in the spleen (Fig. 4A). In contrast, analysis of Peyer's patches revealed a persistent $EYFP^+$ GL7⁺ population, indicating a long-lasting persistence of clones induced by chronic responses within germinal centers. Interestingly, whereas GL7⁺ labeling dropped down rapidly in the spleen, the splenic EYFP⁺ memory population increased from day 2 to 3 months after labeling (Fig. 1F), suggesting that other sites of EYFP⁺ B cell formation may contribute to the accumulation of the splenic memory pool (see below).
Mutations estimated on J_H4 intronic sequences indicated a modest, but distinct level of mutations in the IgM pool (0.62%), with 27% of unmutated sequences in this AID-labeled subset, and 3-fold higher values for spleen IgA⁺ B cells (1.82%) (Fig. 4D). Mutation frequency increased from day 2 to 3-5 months after labeling. Mutation frequency 2 days after the last tamoxifen was also higher in animals fed at older ages (8 months instead of 2-3 months in most experiments shown), suggesting accumulation of mutation with age in the AID-expressing population.

A large IgM memory B cell pool accumulates with age and requires T-cell and TLR-dependent signals

Interestingly, all EYFP⁺ B cells harbored a double CD73⁺CD80⁺, thus showing no maturation gradient for CD80 expression, as opposed to what was described in a mouse transgenic model of B cell memory (Zuccarino-Catania et al., 2014). By setting a gate on the EYFP⁺ population, we could estimate the proportion of spleen CD80⁺CD73⁺ B cells at various time points (Fig. 5A). The CD73⁺CD80⁺ compartment appears to increase markedly up to 5 months of age (6% of total B220⁺ B cells), while reaching progressively a plateau at later time points (7.9 and 8.7 at 8 and 15 months, respectively)(Fig. 5B). Mutations were analyzed in the IgM⁺CD73⁺CD80⁺ population sorted with a pre-set gate on EYFP⁺ cells. The higher proportion of unmutated sequences suggests that some naive B cells are included in this gate (approximately 25%), leading to a corresponding slight overestimation of the CD73⁺CD80⁺ B cell pool (Table 1). When mutated sequences are considered, the frequency is slightly lower than the one of mutated sequences from the IgM⁺EYFP⁺ subset (0.66 vs. 0.85%, Table 1 and Fig.4D).

Using a preset gate on EYFP⁺ B cells from a reference mouse, we also estimated the frequency of CD73⁺CD80⁺ B cells in CD3 ϵ -, MyD88xTrif- and TLR7-deficient mice (Fig. 5C), and compared it to wildtype mice. This population was impacted in both cases, most strongly in T-cell deficient mice, indicating that both T-cell and TLR-derived signals contribute to the formation of this mutated subset.

IgM diversification and switching to IgA requires the gut flora.

The spontaneous appearance of EYFP⁺ B cells in the spleen compartment raises the question of their origin, and the mucosal lymphoid tissues, with their persistent germinal center clones appears as a prime candidate. We therefore studied the presence of EYFP⁺ in germfree mice. Tamoxifen feeding proved to be not practicable, with systematic bacterial colonization of the gut observed after a few weeks. We therefore resorted to sterile, irradiated tamoxifen-containing food. A two-week feeding protocol was chosen as giving similar labeling efficiencies. However, a large variability was observed between mice, possibly linked to the unpleasant taste of the food and its intermittent consumption. Conventional housed animals fed with the same diet were used as controls.

The most drastic impact on EYFP⁺ cells was on the IgA-positive subset, both IgA memory and IgA plasma cells in spleen and bone marrow (Fig.6). For the IgM subset, a significant reduction in cell numbers was observed, and, most strikingly, in the mutation frequency of the IgH locus (Fig. 4C),

indicating that, whereas spontaneous AID activation still occurs in germfree mice, the germinal center reaction that gives rise to EYFP⁺ B cells might be transient. This differential mutation load was confirmed by the V_H sequencing of hybridomas generated from EYFP⁺ IgM⁺ cells of conventional and germfree mice (see below). Reduction of the total splenic pool of CD73⁺CD80⁺ B cells was accordingly observed (3.9 vs. 6.6%) (Fig. 6A).

Similar clones contributes to the PP, splenic and bone marrow IgM/IgA memory and plasma cell pool.

To delineate the relationships between the different compartments, we sequenced different B cell subsets to uncover clones shared between them.

We isolated five different EYFP fractions from two mice, one year after tamoxifen labeling: IgA memory B cells from Peyer's patches, IgM and IgA memory B cells as well as IgA plasma cells from spleen, IgA plasma cells from bone marrow. Approximately 60 sequences were obtained for each subset, i.e. 309 and 313 total sequences from each mouse. These 622 sequences segregated into 250 clones, with several ones showing considerable clonal expansion (a clone distribution per subset is represented in Fig. 7A). Interestingly, in spite of the modest number of sequences collected from each subset, approximately 12% of the clones observed comprised sequences from originating from different tissues and/or harboring different isotypes. The clonal relationships observed are displayed in fig. 7B, and concern all subsets, in various combinations, including clones present in three, four or all subsets. Number of clonal relationships observed are listed on the left side of Fig. 7B, with numbers on the right side corresponding to the total number of two-by-two relationships decomposed from complex clones.

These results strongly support a common origin of EYFP⁺ cells from these different tissues, isotypes and differentiation stages.

Constant renewal from persistent clones rather than B-cell longevity accounts for the persistence of $EYFP^+$ cells in the spleen.

The relative plateau of CD73⁺CD80⁺ B cell accumulation with time, the persistence of EYFP⁺ cells in Peyer's patch germinal centers, the impact of the gut flora and the clonal relationships observed between Peyer's patch, spleen and bone marrow EYFP⁺ cells suggest that constant output from mucosal tissues linked with constant decay, rather than cell longevity, may account for the long-term persistence of EYFP cells at the periphery. Such an observation was recently reported for lamina propria plasma cells, which were shown to be generated by memory B cell clones displaying longitudinal persistence and ongoing diversification (Lindner et al., 2015).

We used B cell depletion by anti-CD20 antibody to address this issue, taking advantage of the fact that anti-CD20 treatment in the mouse, as opposed to humans, is rather inefficient at depleting germinal center B cells (Baumjohann et al., 2013; Mahevas et al., 2013). We treated mice by 3 anti-CD20 injections five days apart, one month after tamoxifen feeding. Mice were analyzed either at day

50, which represents the nadir of B cell depletion, or at day 90, at which time the B cell compartment is largely reconstituted. Accordingly, most EYFP⁺ B cells resisting anti-CD20 depletion at day 50 in Peyer's patches had a germinal center phenotype (Fig. 8A, C), while plasma cells were the main subset surviving the treatment in the spleen (Fig. 8B, D). Rather strikingly, the restart of lymphopoiesis was accompanied by the re-appearance of memory EYFP⁺ cells in the spleen, consistent with a Peyer's patch ongoing export upon termination of drug activity.

Eight days of BrdU labelling was also performed, two months after tamoxifen feeding, and EYFP⁺ cells were enriched by sorting, a procedure that allows unambiguous identification of the intrinsic EYFP fluorescence after the treatments required for BrdU staining (Fig. 8E). A fraction of newly-formed B cells was identified in the splenic EYFP⁺ compartment, for both plasma cells and memory B cells, being slightly higher for IgA⁺ cells than for IgM⁺ (16% and 26% for IgM and IgA memory B cells, respectively, and 27.5% for plasma cells)(Fig. 8F, G).

These two approaches clearly supports the notion that constant input of persistent clones derived from mucosal immune reactions feed the IgM and IgA peripheral pool several months after their initial AID-dependent labeling.

Spleen $EYFP^+$ IgM^+ B cells show reactivity against commensal and infectious bacterial strains.

To study the specificities of the IgM memory compartment, we took advantage of the two-step culture system of Nojima et al., which allows clonal expansion, and if pursued in presence of IL-21, plasma cell differentiation (Nojima et al., 2011). Ten-days cultures were used to test the specificities of secreted Ig present in the culture supernatant from spleen naive, peritoneal cavity B1 and spleen IgM⁺ EYFP⁺ B cells (50,000 sorted cells). Short-term cultures (4 days with IL-4) were used to expand and activate EYFP⁺ cells for generating hybridomas. Two different cultures were generated in each condition. Two different hybridoma fusions were performed from cultures of cells from conventional mice, while two cultures corresponding to cells isolated from 4 axenic mice were pooled in a single fusion. Thirty-eight hybridomas stably secreting IgM were obtained from EYFP⁺ B cells from conventional mice, and 37 from germfree mice.

Supernatants from bulk cultures or from individual hybridomas were tested for their reactivity against luminal antigens (a global extract of intestinal content, including food and bacterial antigens), against defined human bacterial isolates representing mouse commensal, opportunistic and pathogenic species, as well as against mouse endogenous retrovirus (supernatant of the Baki-1 cell line)(Yu et al., 2012).

Strong reactivity was observed against luminal antigens for supernatants from conventional mice, and much less so for germfree mice (Fig. 9A). The profile of bacterial antigen recognition differed between conventional and germfree mice, a pattern confirmed at the level of individual hybridomas (Fig. 9B). Reactivity against endogenous retroviral antigens was altogether low (not shown).

Hybridomas showed different patterns of bacterial antigen recognition, linked or not with positivity for luminal antigens (Fig. 9C). Several cases of reactivity against retroviruses were also observed, but always co-segregated with a positive bacteria or luminal reaction. Recognition of multiple bacterial isolates suggested that common bacterial structures may be targeted. Moreover, hybridoma supernatants that recognized the 8 bacterial species tested were also reactive against luminal content and ERVs, which could correspond to conserved glycosylated motifs (e.g. E9). Interestingly, similar bacterial patterns could be observed that mobilized different V_H genes (e.g. E9 and 1B5 from conventional mice, see Table S1) or the same V_H with different junctions (e.g. H10 and 1G9) and originated in both cases from different animals. Altogether, 15 out of 38 hybridomas from conventional mice showed positivity against the selected set of antigens (40%), and 10 out of 37 (27%) for germfree mice (Fig. 9C, D).

 $V_{\rm H}$ gene usage, N addition, CDR3 length, mutation load were determined for each hybridoma with positive reactivity in Table S1. The V_H6-3 gene (J606 family) was frequently represented, with various junctions and mutation load. Six cases of identical clones, most likely generated by in vitro clonal expansion, were observed, which accordingly displayed similar recognition profile. The mutation load clearly differed between hybridomas from conventional and germfree, while it was globally higher than in the J_H4 intron sequence, possibly suggesting positive selection for mutation in functional V_H genes.

Interestingly, bacterial recognition was shifted towards infectious species (*Citrobacter, Franciscella*) in hybridomas from germfree mice (Fig. 9D). This reactivity was mediated by different $V_{\rm H}$ genes, including $V_{\rm H}$ 6-3, which, in A6 hybridoma, was unmutated.

Supernatants from bulk cultures were also tested for their reactivity against autoantigens, using the autoantigen protein array at Southwestern University, Texas, and, apart from dsDNA, did not show consistent autoantigen recognition, and did not performed significantly better than supernatants from B1 cells (data not shown). Hybridoma supernatants were also tested for polyreactivity, and no hybridoma showed co-recognition of insulin and ssDNA (data not shown).

Early response of CD73⁺CD80⁺ B cells to bacterial challenge

Reactivity against *Klebsiell*a was observed in culture supernatants from both germfree and conventional mice. We thus assessed whether CD73⁺CD80⁺ B cells would show specific mobilization upon inoculation of these bacteria. To avoid differentiation into germinal center or plasma cells that would alter their surface phenotype and compromise their identification, we focused on the proliferation induced 3 days after bacterial injection (10⁷ bacteria, intravenous injection). We used only CD73 as marker, because CD80 was not compatible with Ki67 staining. All mice survived the infection, and CD73⁺ B cells showed an increased frequency of Ki67 labeling, compared to control mice (20.6% *vs.* 7.3%, Fig.10A and B) and to naive B cells from the same animals (2.3%, Fig. 10A

and data not shown). The CD73⁺ compartment thus appears as an early responder during bacterial infection.

Discussion

We report here the description of a systemic memory population which is revealed during a two-week labeling period through EYFP expression triggered by tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the AID promoter (Dogan et al., 2009). This B-cell population was observed in the absence of deliberate immunization, persisted over one year and displayed mutated Ig genes. It consists in spleen of a major IgM memory subset, including also IgA memory B cells, as well as a smaller subset of IgA and IgM plasma cells. In bone marrow, IgA plasma cells predominate, together with a smaller subset of IgM-secreting cells.

AID-dependent labeling was acquired during activation in spontaneous GC in both spleen and Peyer's patches. Rather remarkably, EYFP labeling of germinal center B cells remained for up to one year in Peyer's patch, while it waned in the spleen after 2 weeks. Persistence of the EYFP⁺ splenic population appears surprisingly to be achieved, not through its specific longevity, but through dynamic replenishment from B cell clones persisting in GC from Peyer's patches. This was demonstrated by reconstitution of the splenic memory pool after anti-CD20 mediated B-cell depletion from Peyer's patch GC EYFP⁺ B cells that escaped deletion, as well as from BrdU labeling experiments, with somewhat faster kinetics of renewal for IgA- than for IgM-expressing cells. Moreover, Ig gene sequencing performed on different EYFP⁺ B cell subsets showed clonal relationships between cells from different tissues (Peyer's patches, spleen, bonne marrow), isotypes (IgM and IgA) and differentiation stage (memory B cells and plasma cells).

All AID-labeled cells harbored a CD73⁺CD80⁺ phenotype, markers that have been linked previously with a mature memory phenotype (Zuccarino-Catania et al., 2014), and this profile allowed us to estimate the size of the total CD73⁺CD80⁺ subset in the mouse spleen, a population that reaches a plateau around 5 months of age to approximately 4% of the total splenic B cell pool and displays a mutation load comparable to the B220⁺EYFP⁺ subset. This CD73⁺CD80⁺ subset was markedly impacted in T cell-deficient animals, and also reduced in MyD88xTrif and TLR7-deficient mice. It should be stressed however that, while our EYFP labeling procedure allows us to follow cell populations that are long-lasting either by being long-lived or renewed from persistent clones, additional immune reactions may contribute to the splenic C73⁺CD80⁺ IgM⁺ B cell pool without displaying such features. Spontaneous splenic GCs have been previously described by the group of Rahman, who showed that they depended upon IFNy-IFNyR and TLR7 signaling and produced essentially IgG2b and IgG2c (Domeier et al., 2016; Soni et al., 2014). Interestingly, their dependence upon TLR7 signaling was mainly due to the expression of genes responsible for proliferation and survival. The plateau observed for the CD73⁺CD80⁺ population is thus likely to involve a global maintenance of the pool, with constant input and cell death from both GALT-derived persistent clones, but also newly activated ones from spontaneous splenic GC, which fail to show clonal persistence.

Our observation matches recent data from the group of O. Pabst who showed that IgA plasma cells from the lamina propria are constantly seeded from persistent memory B cells from Peyer's patches (Lindner et al., 2015). Our study more specifically identify chronic germinal centers from gut-associated lymphoid tissues as key sites from which constant output of clones activated through gut antigens seed the peripheral B cell compartment, contributing a major mutated IgM memory pool, together with, less unexpectedly, IgA⁺ cells. The IgM compartment is still present, albeit reduced, in germfree mice, while both IgA memory and plasma cells are drastically affected. Interestingly, IgM memory B cells observed in the spleen of germfree animals display a minimal mutation load, suggesting that residual antigen activation in the gut, possibly through food antigens or endogenous triggers like ERVs, may not sustain mutation accumulation.

The antigen specificity of the spleen IgM^+EYFP^+ compartment, studied from supernatants of in vitro B cell cultures as well as through the establishment of hybridomas, showed a broad crossreactivity against antigens from the gut luminal content (which includes both commensals and food antigens), against multiple types of bacteria, as well as against endogenous retroviruses. This indicates that recognition for common bacterial motifs are preferentially selected in the systemic IgM memory pool. It should be noted accordingly that no unique reactivity against ERVs was observed, as it was always linked with bacterial or luminal content recognition, further documenting the cross-reactivity of these IgM antibodies. Interestingly, TLR7 is also a key element of the immune response against endogenous retrovirus and bacterial products are important drivers of their expression (Young et al., 2014; Yu et al., 2012). Rather surprisingly, a large fraction of hybridomas from germfree mice still showed reactivity against these three categories of antigens, with a different profile for bacterial isolates, notably a preferential recognition of pathogenic species like *Francisella tularensis*. Moreover, due to the much lower mutation frequency observed in germfree conditions, bacterial recognition was achieved in some cases by unmutated V_H genes (e.g. V6.3 of the J606 family), thus revealing new cases of germline-encoded anti-bacterial reactivity in the V gene repertoire.

Natural IgMs have multiple roles in immune homeostasis, from scavengers to protection against autoimmune processes (Ehrenstein and Notley, 2010). Their critical role in infectious processes has also been reported (Ochsenbein et al., 1999). B1 cells are important contributors of these spontaneously arising antibodies, but they are clearly not the sole source of circulating IgMs (Reynolds et al., 2015; Thurnheer et al., 2003). Interestingly, monitoring of somatic mutation at the protein level revealed that mutated IgMs accumulated with age in non-immunized animals, an observation that clearly matches our description of a large mutated IgM memory subset in the absence of external challenge (Williams et al., 2000). The large anti-bacterial recognition profile identified within this subset suggests that, in addition to the polyreactivity attributed to B1-derived antibodies, mutated IgM antibodies may represent an additional line of defense against mucosal-derived or external bacterial aggressions.

This work thus describes a new layer of B-cell memory, maintained through ongoing renewal of persistent clones diversifying in the gut and thereafter reaching the systemic immune compartment, where it can be activated by cognate or cross-reactive antigens. Our observation somehow contradicts the notion of a gut-associated firewall, which states that immune reactions taking place in the gut stay confined to this region in a healthy situation, but concur in contrast with a recent report of memory B cell migration from Peyer's patches (Lindner et al., 2015).

Mutated IgM B cells represent a large subset in humans, and their origin, function and diversification is still a matter of debate. It will be obviously not possible to identify a pool of activated B cells generated in the absence of external challenge, but the contribution of IgM B cell clones activated in the gut to the peripheral B cell repertoire is a more testable question, and recognition of common bacterial epitopes has already been suggested for some human memory subsets, like marginal zone or CD27⁻IgD⁻ B cells (Berkowska et al., 2015; Puga et al., 2012). Our observation also pertains to the description of the recruitment of B cell clones recognizing commensal antigens in the anti-gp41 response during HIV infection or vaccine trials, which linked reactivity against epitopes of the gut flora and anti-viral responses (Trama et al., 2014; Williams et al., 2015).

Materials and Methods

Mouse lines.

Heterozygous AID reporter mice were generated by breeding AID-Cre-ERT2 mice with the ROSA26loxP-EYFP reporter mice, and are named "AID-Cre-EYFP" throughout this paper. The *Aicda* and *ROSA26* loci are tightly linked on chromosome 6 and the line used was isolated from a recombination event that brought both reporters on the same chromosome.

MyD88xTrif-deficient mice were kindly given by Catherine Werts and Ivo Gomperts Boneca (Institut Pasteur, Paris), $CD3\varepsilon$ KO mice by Sophie Ezine (INEM, Paris) and TLR7-deficient mice by Isabelle Cremer (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris). All gene-targeted mice were analyzed between 5 and 6 months of age. AID-Cre-EYFP mice were rendered axenic by cesarian transfer at the CDTA (Orléans) and checked regularly for lack of bacterial colonization (under the supervision of Alexandre Diet, coordinator, and Cécile Frémond, veterinary).

All mouse experimental protocols have been approved by the Paris Descartes Ethics Committee, and authorized by the French Ministery of Research.

Generation of the BAC AID-Cre-ERT2 mouse line.

To avoid AID haploinsufficiency linked with targeted insertion of the Cre-ERT2 gene at the *Aicda* locus, we generated a line in which the same targeting event was achieved within a bacterial artificial chromosome (Ochsenbein et al.). DNA from AID-Cre-ERT2 mice was used to amplify a 6 kb Cre-ERT2 fragment flanked with 2 kb sequences from the *Aicda* locus, cloned in vector pLD53 (gift of Nina Papavassiliou, Rockefeller University, NY) and transformed into PIR2 One Shot competent bacteria (Invitrogen). The RP24-68I7 BAC strain (sequence NCBI AC158651) that include 190 kb of the *Aicda* locus was obtained from BACPAC resources (Children's Hospital Oakland Research Institute, CA) and the pSV1-RecA vector containing the Aicda-Cre-ERT2 insert vector used to promote homologous recombination by successive selection steps according to Misulovin et al. (2001). The BAC DNA was extracted according to the Transgenic Animal Web protocol (http://www.med.umich.edu/tamc/BACcol.html) and microinjected into C57BI/6 fertilized eggs. Two independent mouse lines containing each a single BAC copy were obtained, and gave similar EYFP-labeling profiles.

Immunization and tamoxifen administration.

AID-Cre-EYFP mice were immunized intraperitoneally twice at a 30-day interval with 5×10^9 SRBCs (Eurobio). Doses of 10 mg Nolvadex (AstraZeneca) in 500 μ 1 of 20% Clinoleic (Baxter) were administered by gavage on days 7 and 12 after primary immunization and on day 1 after secondary immunization for immunized mice, or every 5 days for non-immunized mice (day 0, 5 and 10). Tamoxifen experiments with young *vs*. adult mice were done with a single dose of tamoxifen. Here the amount of tamoxifen was adjusted to the weight of animal for young mice. Axenic mice received

an irradiated tamoxifen diet during two weeks (400 mg tamoxifen citrate/kg diet, ref. TD55125I, Harlan laboratories Europe), and control mice were fed similarly.

Infection with Klebsiella pneumoniae (10^7 bacteria) was performed intravenously, and Ki67 labeling of splenic B cell subsets performed 3 days after (see below).

Confocal microscopy.

Eight μ m sections were prepared from tissues fixed with 4% PFA and dehydrated overnight in 30% sucrose before freezing in OCT compound. For immunolabeling, samples were saturated with PBS supplemented with 10% (v/v) goat serum, labeled with primary antibodies and secondary reagents, mounted with Fluoromount (Southern Biotechnology Associates) and analyzed with a Zeiss LSM700 confocal microscope.

FACS analysis cell sorting.

Splenic and peritoneal cavity B cell populations were separated using a FACSAria cell sorter (BD Biosciences) for cell culture experiments. Splenic subsets were also sorted for the analysis of mutations in the rearranged J_H4 intronic sequences of the IgH locus. Abs used in this study are summarized in Table S2. For flow cytometry analysis, cells were incubated at 200.10⁶ cells/ml with antibodies in PBS supplemented with 10% (vol/vol) FCS and analyzed with a Becton Dickinson LSRFortessa apparatus.

For Ki67 labeling, cells were fixed in 4% PFA (20 min at 4°C) and permeabilized in 0.5% Triton X-100 (20 min, RT). Cells were then washed and stained for Ki67 in 0.5% Triton X-100.

Adoptive cell transfer.

 3.10^6 total cells from peritoneal cavity as source of B-1 cells and 3.10^6 total cells from bone marrow as source of B-2 cells in 200 μ l PBS were injected intravenously in recipient mice that have been sublethally irradiated with 8.5 Gy 12h before. Recipient mice received 3 doses of tamoxifen 6 weeks after cell injection and were analyzed 8 weeks after the last tamoxifen.

In vitro B cell cultures and supernatant collection.

Purified splenic naïve B cells, peritoneal cavity B1 and splenic EYFP⁺ memory B cells (5.10^4 cells per well) were cultured in 6-well plates in the presence of 40LB cells (3.10^5 cells per well) that had been pretreated with mitomycin C (1mg/ml during 3h; Sigma) in 8 ml RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, $5.5.10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol, 10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin (GIBCO). rIL-4 (1ng/ml; Peprotech) was added to the primary culture for 4 days. On day 4, the cells were replated (5.10^5 cells) onto a new feeder layer treated with mitomycin C (3.10^6 cells) in a 10 cm tissue culture dish and cultured in 40 ml of medium supplemented with rIL-21 (10 ng/ml, Peprotech) for 6 days. Cells were cultured in a humidified

atmosphere at 37°C with 5% CO2. At day 10, 38 ml of supernatant were collected and concentrated using an Amicon Ultra 100000 MCWO (Millipore).

EYFP Hybridomas generation.

5.10⁴ sorted splenic memory EYFP⁺ B cells were amplified during 4 days on the 3T3 40LB feeder layer in presence of IL-4. YFP cells were added to Sp2/O myeloma cell line in a ratio 1:1. Mixed cells were washed tree times in DMEM and then cells were fused using the ClonaCell[™]-HY hybridoma Kit (Stemcell Technologies) (Le Gallou et al., in press).

Analysis of mutations in the J_H4 intronic sequence of the IgH locus and rearranged V_H genes of hybridomas.

The J_H4 intronic sequence flanking rearranged V_H gene segments was amplified by PCR from DNA of sorted B cell subsets. Three PCR were done for each sample with 10,000 freeze-dried sorted cells. The PCR primers used are a mixture of five FR3 primers amplifying most V_H gene families and a primer downstream of J_H4 (Delbos et al., 2005), using a denaturation step of 2 min at 98°C and 40 cycles of 15 s at 98°C, 30 s at 64°C and 30 s at 72°C, with Phusion® DNA polymerase (New England Biolabs). PCR products were cloned with the Zero Blunt cloning kit (Invitrogen) and sequences were determined with an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer. Mutations were identified within 448 base pairs of the J_H4 intron and analyzed with the help of the CodonCodeAligner software.

Clonal relationships were established using CodonCodeAligner (with Build Tree parameters set at -2 for mismatches and -9 for gap penalty), plus manual inspection, notably to discard clonal relationships that would include sequence changes at the V-D or D-J junction. Evaluation of clones was therefore conservative and possibly underestimated.

For hybridoma sequences, total RNA was isolated with the RNeasy Micro Kit (QIAGEN) and reverse transcribed by random priming with the Affinityscript Multiple Temperature cDNA synthesis kit (Agilent Technologies). The following primers amplifying VH1, VH3, VH5, VH11 and VH12 families (in a 5:1.5:1.5:1:1 ratio), together with a reverse $C\mu$ primer were used for amplification: mVH1, AGGTYCAGCTGCARCAGTCT; mVH3, GTGCAGCTTCAGGAGTCAG; mVH5, GAAGTGAAGCTGGTGGAGTC; mVH11, ATGGAGTGGGAACTGATCTTA; mVH12, AGCTTCAGGAGTCAGGACC; $C\mu$, CATGGCCACCAGATTCTTATC. PCR amplification conditions are 94°C 45 sec, 62°C 1 min, 72°C 1.5 min for 35 cycles with GoTaq polymerase (Promega), and 20 pmoles of primers. PCR products were gel-purified and 50 ng were sequenced with the $C\mu$ primer.

BrdU labeling

Cell proliferation was assessed two to three months after tamoxifen labeling. BrdU was given at 0.8 mg/ml in the drinking water for 8 days, with water supply changed every day. Splenic cell suspensions

were stained with the desired antibodies (B220, IgA, GL7) and the LIVE/DEAD® Fixable Aqua Amcyan Dead Cell Stain Kit was used for gating out dead cells. Fixation with cytofix/cytoperm buffer (BrdU APC Kit, Beckton Dickinson) was performed before enrichment of EYFP⁺ cells by cell sorting. This enrichment procedure allows the correct identification of EYFP⁺ after the BrdU staining procedure that lowers the EYFP⁺ signal, while keeping sufficiently EYFP⁻ cells for internal control. BrdU staining was performed on sorted cells (8-15x10⁴ cells) after fixation and permeabilization using the BrdU APC kit, according to the conditions of the supplier, with adaptation of the protocol for low cell numbers (anti-BrdU-APC antibody diluted 1/150e in 50 μ l for about 10x10⁴ cells).

Anti-CD20 depletion

B-cell depletion was performed by 3 injections, 5 days apart, of the 18B12 anti-CD20 antibody (mouse IgG2a, Biogen Idec), one month after tamoxifen labeling. Peyer's patches and spleen lymphocytes were analyzed at day 50 (nadir) or day 90. The efficiency of B cell depletion was checked on blood for all animals at day 50.

ELISA.

Antibody concentrations in supernatants were determined by anti-mouse IgM and IgG1 ELISA using mouse monoclonal IgG1 or IgM as standard (Sigma). Supernatants were used at 1μ g/ml IgM or IgG concentrations and three 1:4 dilutions in PBS. For detection of Ig against bacteria, killed bacteria from human clinical isolates (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter rodentium*, *Francisella tularensis*) were coated at 5μ g/ml. Supernatants were used at 1μ g/ml antibody IgM or IgG concentrations. ELISAs were revealed as above and OD was read at 450nm.

For detection of anti-endogenous retroviral specificities, ERVs purified from supernatants of Baki-1 cell line according to Yu et al. (2012), were used at 5μ g/ml in PBS for coating in 96 well plates.

Statistics

Mann-Whitney tests were used for comparison of EYFP⁺ subsets, as the large variability observed between animals for a two-weeks labeling scheme suggests that a normal distribution cannot be hypothesized. In contrast, mutations frequencies, global representation of CD73⁺CD80⁺ B cells in the spleen or BrdU labeling were analyzed by t-tests (or paired t-test depending upon the analysis).

Figure legends

Figure 1. A spontaneous, persistent immune response in absence of deliberate immunization is observed in the AID-Cre-ERT2xROSA26-loxp-EYFP ("AID-Cre-EYFP") reporter mouse upon tamoxifen ingestion.

(A) AID-Cre-ERT2 mice were immunized and boosted with sheep red blood cells, with tamoxifeninduced labeling of AID-expressing cells according to the schedule described, with control mice being subjected to the same tamoxifen regimen without immunization. (B) Representative FACS profiles of EYFP⁺ cells observed, three months after the last tamoxifen ingestion with ("SRBC") or without ("endo") immunization. From top to bottom, B220⁺EYFP⁺ cells, IgM⁺, IgG1⁺ and IgA⁺ cells (B220⁺EYFP⁺ gated). Gates used to estimate cell numbers represented in (D), top panel, are indicated. (C) Total EYFP⁺ cells present in spleen and bone marrow, three months after tamoxifen labeling. (D) IgM, IgG1 and IgA isotype distribution among spleen EYFP⁺ memory and plasma cells, and bone marrow plasma cells. (E) Protocol used to study the endogenous response throughout this study. (F) Evolution of EYFP⁺ cell numbers with time in spleen and Peyer's patches. Time in months is ± 10 days. (G) Comparison of EYFP⁺ cells labeled according to the protocol described in (E) between knock-in mice (Cre-ERT2 inserted at the Aicda locus, "KI") or mice harboring a BAC transgene with the same knocked-in Aicda locus ("BAC"). *: p<0.05; ** p<0.01, Mann-Whitney test. Mean values are indicated. Percentages are indicated when total cell populations are analyzed, whereas cell numbers are used for B-cell subsets. Each analysis originates from two or more independent tamoxifen-labeling experiments.

Figure 2. The endogenous response originates from B2, not B1 cells.

A. Scheme of restoration with cells from bone marrow and peritoneal cavity from either wild-type or AID-Cre-EYFP origin and time frame of experiment. B. Total number of splenic EYFP⁺ cells observed in restored animals, with tamoxifen-fed animals as controls. Data represent two separate experiments, representative of additional results obtained with different timings.

Figure 3. Localization of memory B cells and plasma cells in the spleen of non-immunized mice.

(A) Analysis of the localization of EYFP⁺ memory and plasma cells by four-color confocal microscopy. (B), same as (A), with only EYFP⁺ labeling. EYFP⁺ clusters correspond to IgM⁺ plasma cell aggregates in the red pulp. (C) The three insets marked in (A) are enlarged, encompassing a follicle (Fo)/marginal zone (MZ) border region (a); a T-cell zone with B220⁻EYFP⁺IgA⁺ plasma cells as turquoise staining (see arrows) (b); a red pulp region with yellow/green EYFP⁺IgM⁺ and turquoise EYFP⁺IgA⁺ plasma cells. Scale bars: 0.5 mm (A, B); 50 μm (C).

Figure 4. Kinetics of AID-dependent labeling within germinal centers show clonal persistence in Peyer's patches, and V_H gene mutation accumulation in spleen.

(A) Fraction of EYFP⁺ with a germinal center phenotype as function of time after tamoxifen labeling (top panel, spleen; bottom panel, Peyer's patches). Day 0 corresponds to the first tamoxifen feeding, the d2 point thus corresponding to a single tamoxifen ingestion. (B) Tamoxifen feeding of three-week-old mice does not mark transitional B cells. Left part, total splenic B220⁺ cells from young mice display a T1 (CD93⁺CD23⁻) and T2 (CD93⁺CD23⁺) phenotype. Right part, number of EYFP⁺ cells 2 days after a single tamoxifen ingestion in young vs. adult mice. (C,D) Mutation frequency and distribution among splenic EYFP⁺ IgM⁺ and IgA⁺ subsets, from mice analyzed between 3-5 months after tamoxifen labeling. 12d (old) represent 8-month-old mice fed three-times with tamoxifen, and (GF), germ-free mice described in Fig. 6. *: p<0.05; ** p<0.01; ****: p<0.0001, Student's t test. Mean values are indicated. All mice analyzed are represented and correspond to two or more independent experiments.

Figure 5. A large mutated IgM memory B cell pool accumulates with age and show T-cell and TLR dependence.

(A) EYFP⁺IgM⁺B220⁺GL7⁻ displays essentially a CD73⁺CD80⁺ phenotype, allowing the identification of the corresponding subset in the non-EYFP⁺ population within the same gate. (B) Evolution of the CD73⁺CD80⁺ compartment with time (gated on the EYFP⁺ subset). Ig gene mutations are shown in Table S1. (C) Frequency of CD73⁺CD80⁺ B cells in T-cell and TLR-deficient backgrounds, compared with wild-type and AID-Cre-EYFP mice (with a pre-set gate on EYFP⁺B220⁺GL7⁻ cells). *: p<0.05; ** p<0.01, Student's t test. Mean values are indicated. Cumulative data of all analyzed animals are indicated.

Figure 6. Memory IgM B cell diversification and switching to IgA requires the gut flora.

Germfree and control mice were given tamoxifen-containing food for two weeks and analyzed two months after the treatment. (A) Analysis of total EYFP⁺ cells in spleen (top panel) and bone marrow (bottom panel). The middle panel represents the percentage of CD73⁺CD80⁺ cells among total IgM⁺B220⁺ B cells in spleen. (B) Isotype distribution among spleen EYFP⁺ B cells (B220⁺), and spleen and bone marrow plasma cells (B220⁻). *: p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001, Mann-Whitney test except for (A), middle panel (Student's t test). Mean values are indicated. Animals from two different cohorts were analyzed, except for (A), middle panel.

Figure 7. EYFP⁺ B cell clones are shared between Peyer's patch, spleen and bone marrow, as well as between IgA plasma cells and IgA memory B cells.

EYFP⁺ Peyer's patch IgA memory B cells, spleen IgA and IgM memory B cells, spleen and bone marrow IgA^+ plasma cells were isolated from two mice, one year after tamoxifen feeding, and VDJ_H4

sequences were determined and submitted to CDR3 clustering for clonal relationship analysis between these different subsets.

(A) Clonal distribution within each subset. Each pie section represent one clone identified through its CDR3 junction, except for the white segment that represent all unique sequences. The total number of sequence is indicated in each pie chart and the number of sequences in each clone is color-coded as indicated on the right side.

(B) Number and tissue/subset/isotype distribution of clones shared between different B cell and plasma cell subsets. The first ten lines depict clones shared between two subsets, and the last 6 lines clones present in multiple subsets (not all possible configurations were observed). Numbers on the right side correspond to the sum of two-by-two relationships, including those observed in multiple clonal configurations.

Figure 8. Anti-CD20 depletion and BrdU labeling reveal that the EYFP⁺ pool is maintained by constant renewal from persistent clones.

(A-D) Anti-CD20-mediated depletion was performed by three injections, 5 days apart, one month after tamoxifen labeling. Analysis of Peyer's patches (A,C) and spleen (B,D) was performed on EYFP⁺ and EYFP⁻ cells at d50 after the first anti-CD20 injection, which represents the nadir of B-cell depletion, and at d90, at which time the B-cell compartment is largely restored. FACS profiles show that residual EYFP⁺ cells resisting the anti-CD20 treatment are mainly GC B cells in Peyer's patches (A, left part) and plasma cells in the spleen (B, left part), while EYFP⁺ memory B cells re-emerge during reconstitution of the splenic B-cell pool (B, right part). The percentage of B cells in Peyer's patches at both time points is represented in (C), as well as the frequency of GC B cells among EYFP⁺ cells. The percentage of total and EYFP⁺ B cells in spleen is represented in (D), together with the percentage of plasma cells (B220⁻) among EYFP⁺ cells. (E-G) Fraction of cells labeled during an 8-day BrdU pulse, 2 months after tamoxifen labeling. (E) EYFP⁺ cells were enriched by prior sorting (top panel, left), to allow for a clear distinction of EYFP-positive and -negative subsets after treatment for BrdU staining, and EYFP⁺B220⁺ (IgA⁺ or IgA⁻) and B220⁻ subsets were analyzed. (F) The fraction of BrdU-positive cells is analyzed in the different fractions identified in (E), and the results are summarized in (G). The different subsets of each individual mouse are represented by the same symbol. *: p<0.05, paired ttest. Mean values are represented. The data shown correspond to one experiment out of two performed in similar conditions.

Figure 9. Specificity of IgM memory B cells from conventional and germ-free mice.

The specificity of EYFP⁺ IgM memory B cells was assayed from either bulk culture supernatants from in vitro differentiated B cells or from individual hybridomas.

(A) EYFP⁺IgM⁺ B cells from either conventional or germfree mice were activated in vitro in the culture conditions of Nojima et al. (2011)(in presence of CD40L, BAFF, IL4 and IL21), and the

supernatant tested by ELISA at day 10 against the gut luminal content, with supernatants from naive B cells as control. (B) The same supernatants (N1, N2: naive B cells) were tested against a panel of 8 human bacterial isolates, representing equivalents of mouse commensals or pathogens. (C, D) Hybridoma supernatants obtained from fusions performed on similar cultures at day 4 after activation were tested by ELISA against gut luminal content, human bacterial isolates (same bacterial panel as in B) and supernatants from the ERV-producing Baki1 cell line. (C), conventional mice; (D) germfree mice. The horizontal line marks background signal.

Two different fusions were performed for EYFP⁺ B cells from 2 different conventional mice each and one fusion from three germfree mice.

Figure 10. Early response of the IgM⁺CD73⁺CD80⁺ subset to bacterial challenge.

Mice were challenged with i.v. injection of 10^7 *Klebsiella pneumoniae*, and Ki67 labeling was performed 3 days after. **** p<0.0001, Student's t test. Mean values are indicated. Animals from two different cohorts were analyzed.

Figure S1. A fraction of B1b cells express AID.

(A) Analysis of the peritoneal cavity was performed in mice reconstituted according to the scheme (A) of Fig.2. (B) Presence of the AID-reporter in bone marrow donor cells allows the specific labeling of the B1b compartment. Mice fed with a similar tamoxifen regimen are shown as controls. (C) Representative FACS profiles of the B2, B1a and B1b subsets in the peritoneal cavity. B1a and B1b cell counts featured in (B) are based on CD5+ and CD5- fractions (without taking into account the CD11b labeling) represented in the bottom panels.

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue contre le Cancer ("Equipe labellisée"), the Fondation Princesse Grace de Monaco, and an ERC Advanced grant, "Memo-B". L.H.T. was supported by a Poste d'Accueil INSERM.

We thank Frédéric Delbos for carrying out the BAC-AID construct, Biogen Idec for provision of the 18B12 anti-CD20 antibody, Isabelle Cremer (Centre des Cordeliers, Paris), Ivo Gomperts Boneca (Institut Pasteur, Paris), Sophie Ezine (INEM, Paris) for giving us, respectively, TLR7-, MyD88xTrifand CD3ɛ-deficient mice, and Barbara Bertocci for advices with BrdU experiments.

We thank the excellent animal care of the Necker animal facility (LEAT, SFR Necker, INSERM US24/CNRS UMS 3633), the expertise of the Orléans CDTA team (CNRS UPS44) for generation and housing of germfree mice, and the SEAT (Villejuif) for the BAC-AID transgenesis. We thank Nicolas Goudin (Cell Imaging core facility, SFR Necker) for his help with confocal microscopy.

References

Bagnara, D., Squillario, M., Kipling, D., Mora, T., Walczak, A.M., Da Silva, L., Weller, S., Dunn-Walters, D.K., Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (2015). A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans. J Immunol *195*, 3716-3724.

Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. Immunity *38*, 596-605.

Belkaid, Y., Bouladoux, N., and Hand, T.W. (2013). Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. Trends Immunol *34*, 299-306.

Berkowska, M.A., Driessen, G.J., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., van der Burg, M., *et al.* (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. Blood *118*, 2150-2158.

Berkowska, M.A., Schickel, J.N., Grosserichter-Wagener, C., de Ridder, D., Ng, Y.S., van Dongen, J.J., Meffre, E., and van Zelm, M.C. (2015). Circulating Human CD27-IgA+ Memory B Cells Recognize Bacteria with Polyreactive Igs. J Immunol *195*, 1417-1426.

Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowitz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., and Kuppers, R. (2015). Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, E5281-5289.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. Nat Immunol *10*, 1292-1299.

Domeier, P.P., Chodisetti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D., and Rahman, Z.S. (2016). IFN-gamma receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. J Exp Med *213*, 715-732.

Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. Nat Rev Immunol *10*, 778-786.

Gomez de Aguero, M., Ganal-Vonarburg, S.C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., *et al.* (2016). The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. Science *351*, 1296-1302.

Jarjour, M., Jorquera, A., Mondor, I., Wienert, S., Narang, P., Coles, M.C., Klauschen, F., and Bajenoff, M. (2014). Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. J Exp Med 211, 1109-1122.

Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., *et al.* (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. J Exp Med 209, 2079-2097.

Kuraoka, M., Holl, T.M., Liao, D., Womble, M., Cain, D.W., Reynolds, A.E., and Kelsoe, G. (2011). Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 11560-11565.

Laffleur, B., Duchez, S., Tarte, K., Denis-Lagache, N., Peron, S., Carrion, C., Denizot, Y., and Cogne, M. (2015). Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression. Cell Rep.

Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M.K., Friedrichsen, M., Smoczek, A., Ott, S., Baumann, U., Suerbaum, S., *et al.* (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. Nat Immunol *16*, 880-888.

Lindner, C., Wahl, B., Fohse, L., Suerbaum, S., Macpherson, A.J., Prinz, I., and Pabst, O. (2012). Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. J Exp Med 209, 365-377.

Macpherson, A.J., Geuking, M.B., Slack, E., Hapfelmeier, S., and McCoy, K.D. (2012). The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. Immunol Rev 245, 132-146.

Mahevas, M., Patin, P., Huetz, F., Descatoire, M., Cagnard, N., Bole-Feysot, C., Le Gallou, S., Khellaf, M., Fain, O., Boutboul, D., *et al.* (2013). B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. J Clin Invest *123*, 432-442.

Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol 2, 323-335.

Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., and Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. Nat Commun 2, 465.

Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. Science 286, 2156-2159.

Proietti, M., Cornacchione, V., Rezzonico Jost, T., Romagnani, A., Faliti, C.E., Perruzza, L., Rigoni, R., Radaelli, E., Caprioli, F., Preziuso, S., *et al.* (2014). ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. Immunity *41*, 789-801.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., *et al.* (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. Nat Immunol *13*, 170-180.

Reynolds, A.E., Kuraoka, M., and Kelsoe, G. (2015). Natural IgM is produced by CD5- plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. J Immunol *194*, 231-242.

Seifert, M., Przekopowitz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., *et al.* (2015). Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, E546-555.

Soni, C., Wong, E.B., Domeier, P.P., Khan, T.N., Satoh, T., Akira, S., and Rahman, Z.S. (2014). B cell-intrinsic TLR7 signaling is essential for the development of spontaneous germinal centers. J Immunol *193*, 4400-4414.

Tas, J.M., Mesin, L., Pasqual, G., Targ, S., Jacobsen, J.T., Mano, Y.M., Chen, C.S., Weill, J.C., Reynaud, C.A., Browne, E.P., *et al.* (2016). Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. Science *351*, 1048-1054.

Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. J Exp Med 209, 597-606.

Thurnheer, M.C., Zuercher, A.W., Cebra, J.J., and Bos, N.A. (2003). B1 cells contribute to serum IgM, but not to intestinal IgA, production in gnotobiotic Ig allotype chimeric mice. J Immunol *170*, 4564-4571.

Trama, A.M., Moody, M.A., Alam, S.M., Jaeger, F.H., Lockwood, B., Parks, R., Lloyd, K.E., Stolarchuk, C., Scearce, R., Foulger, A., *et al.* (2014). HIV-1 envelope gp41 antibodies can originate from terminal ileum B cells that share cross-reactivity with commensal bacteria. Cell Host Microbe *16*, 215-226.

Williams, G.T., Jolly, C.J., Kohler, J., and Neuberger, M.S. (2000). The contribution of somatic hypermutation to the diversity of serum immunoglobulin: dramatic increase with age. Immunity *13*, 409-417.

Williams, W.B., Liao, H.X., Moody, M.A., Kepler, T.B., Alam, S.M., Gao, F., Wiehe, K., Trama, A.M., Jones, K., Zhang, R., *et al.* (2015). HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. Science *349*, aab1253.

Young, G.R., Mavrommatis, B., and Kassiotis, G. (2014). Microarray analysis reveals global modulation of endogenous retroelement transcription by microbes. Retrovirology *11*, 59.

Yu, P., Lubben, W., Slomka, H., Gebler, J., Konert, M., Cai, C., Neubrandt, L., Prazeres da Costa, O., Paul, S., Dehnert, S., *et al.* (2012). Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors. Immunity *37*, 867-879.

Zeng, M.Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Warren, H.S., Cascalho, M., Inohara, N., and Nunez, G. (2016). Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. Immunity *44*, 647-658.

Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. Nat Immunol *15*, 631-637.

mouse age	mutation frequency (total sequences)	mutation frequency (mutated sequences)	% mutated sequences
5 mg 1	0.25		•
5 1110-1	0.23	0.62	40
5 mo-2	0.41	0.75	55
9 mo-1	0.32	0.59	55
9 mo-2	0.23	0.62	37
9 mo-3	0.49	0.68	62
9 mo-4	0.29	0.72	40

Table 1. J_H 4 intronic mutation frequency in CD73+CD80+ EYFP⁻ IgM⁺ B cells

Table S1. Hybridoma heavy chain characteristics

	VH GENE	CDR3 aa sequence		mut	CDR3 length	Ν
CONVENTIONAL MICE		-			-	
C7	V7-3	ARYTDLLTDYAMDY		3	42	12
C11	V6-3	TDPGIDFDV		13	27	6
E9	V1-53	ARDCYGSDY		15	27	6
1B3	V3-6	ARRRDGYYGYFDV		10	39	6
1B5	V4-1	TRRGYGSHWYFDV		10	39	6
1C8	V7-1	ARNYYGSSY		3	27	0
1G2	V6-3	TGDYYGSRNY		2	30	4
1G8	V1-74	AMAPY		20	15	5
1G9	V6-3	TDPFKDY		9	21	10
1H2	V7-3	ARYLYDGYSPFAY		3	39	6
2D6`	V6-3	TDVTGTEFAS		11	30	6
F7=E9						
F12=C7			Mean	9.00	30.55	6.7
H10=C11						
1B8=1B5						
GERMFREE MICE						
A2	V6-3	TDPTVVPFAY		0	30	6
A6	V6-3	TDPGQAGTY		6	27	12
C2	V1-54	ARSSLGSLDY		3	30	11
C4	V1-50	ARRTWLRRFDY		0	33	7
D8	V1-31	ARSDEGFPY		3*	27	10
F9	V1-31	ARSDEGFPY		4*	27	10
H5	V1-53	TTYRPHYFDY		2	30	8
H6	V6-3	GTLVTTRYFDY		1	33	11
C1=H5						
E5=D8			Mean	2.38	29.63	9.38

* D8 and F9 differ by 5 mutations, and have only 1 in common.





Figure 2

А



В





figure 3



А





L IFO	E
ше	5
 G 1 C	<u> </u>















Figure 10







V-BIBLIOGRAPHIE

- Ahuja A, Anderson SM, Khalil A, Shlomchik MJ. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(12):4802-7
- Ahuja A, Shupe J, Dunn R, Kashgarian M, Kehry MR, Shlomchik MJ. Depletion of B cells in murine lupus: efficacy and resistance. *J Immunol*. 2007;179(5):3351-61.
- Alexander T, Sarfert R, Klotsche J, Kühl AA, Rubbert-Roth A, Lorenz HM, RechJ, Hoyer BF, Cheng Q, Waka A, Taddeo A, Wiesener M, Schett G, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Voll RE. The proteasome inhibitior bortezomib depletes plasma cells and ameliorates clinical manifestations of refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(7):1474-8
- Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, Mei H,
- Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester GR, Arnold R, Radbruch A, Hiepe F. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009;113(1):214-23
- Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*. 2007 a ;315(5811):528-31.
- Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellulardynamics. *Immunity*.2007 b ;27(2):190-202.
- Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol.* 2001;167(12):6834-40.
- Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. 2004;21(3):379-90
- Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1903-15
- Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, Sanz I. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum.* 2007;56(9):3044-56
- Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, Sanz I. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(11):3580-90.
- Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Sanz I, Rosenblatt J, Looney RJ. The relationship of FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):455-9.
- Avery DT, Ellyard JI, Mackay F, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tangye SG. Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol*. 2005;174(7):4034-42.
- Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest. 2003;112(2):286-97.
- Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, Amara A, Berrebi D, Foussat A, Baleux F, Portier A, Durand-Gasselin I, Coffman RL, Galanaud P, Peuchmaur M, Emilie D. Role of the chemokine stromal cellderived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus. *J Immunol.* 2003; 170(6):3392-400.
- Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. 2002 ;17(3):341-52.
- Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):15-27.
- Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2000;192(2):271-80.
- Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2250-5.

- Bekar KW, Owen T, Dunn R, Ichikawa T, Wang W, Wang R, Barnard J, Brady S, Nevarez S, Goldman BI, Kehry M, Anolik JH. Prolonged effects of short-term anti-CD20 B cell depletion therapy in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2443-57.
- Belnoue E, Tougne C, Rochat AF, Lambert PH, Pinschewer DD, Siegrist CA. Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *J Immunol*. 2012;188(3):1283-91.
- Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, Schneider P,Huard B, Lambert PH, Siegrist CA. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood.* 2008;111(5):2755-64.
- Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP, Noelle RJ. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol*. 2008;180(6):3655-9.
- Berek C, Kim HJ. B-cell activation and development within chronically inflamed synovium in rheumatoid and reactive arthritis. *Semin Immunol.* 1997;9(4):261-8.
- Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 1991;67(6):1121-9.
- Bergamin F, Vincent IE, Summerfield A, McCullough KC. Essential role of antigen-presenting cellderived BAFF for antibody responses. *Eur J Immunol.* 2007;37(11): 3122- 30.
- Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. CD19(+) CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.
- Bolduc A, Long E, Stapler D, Cascalho M, Tsubata T, Koni PA, Shimoda M. Constitutive CD40L expression on B cells prematurely terminates germinal center response and leads to augmented plasma cell production in T cell areas. *J Immunol.* 2010;185(1):220-30.
- Bos NA, Kimura H, Meeuwsen CG, De Visser H, Hazenberg MP, Wostmann BS, Pleasants JR, Benner R, Marcus DM. Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/c mice fed chemically defined ultrafiltered diet. *Eur J Immunol.* 1989 Dec;19(12):2335-9.
- Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, Vaishnaw A; BG9588 Lupus Nephritis Trial Group. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(3):719-27.
- Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC, Leandro MJ, Migone TS, Teodorescu M, Stohl W. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(7):1011-6.
- Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, Webster AD. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2146-54.
- Carter LM, Isenberg DA, Ehrenstein MR. Elevated serum BAFF levels are associated with rising antidouble-stranded DNA antibody levels and disease flare following B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013 Oct;65(10):2672-9.
- Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakonjac J, Nemazee D, Rajewsky K, Nussenzweig MC. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*. 2001;291(5508):1541-4.
- Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, MuehlinghausG, Szyska M, Radbruch A, Manz RA. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol*. 2003;171(4):1684-90.
- Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, Berek C, Hiepe F, Krenn V, Radbruch A, Manz RA. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(9):2726-32.
- Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(11):3903-8.
- Chamberlain N, Massad C, Oe T, Cantaert T, Herold KC, Meffre E. Rituximab does not reset defective early B cell tolerance checkpoints. *J Clin Invest*. 2016;126(1):282-7.
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med.* 1999;189(10):1639-48.

- Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, Kaverina N, Utset TO, Meehan SM, Quigg RJ, Meffre E, Clark MR. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol*. 2011;186(3):1849-60.
- Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2004;44(6):1313-9.
- Cheng Q, Mumtaz IM, Khodadadi L, Radbruch A, Hoyer BF, Hiepe F. Autoantibodies from long-lived 'memory' plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(12):2011-7.
- Chernova I, Jones DD, Wilmore JR, Bortnick A, Yucel M, Hershberg U, Allman D.Lasting antibody responses are mediated by a combination of newly formed and established bone marrow plasma cells drawn from clonally distinct precursors. *J Immunol*. 2014;193(10):4971-9.
- Chevrier S, Emslie D, Shi W, Kratina T, Wellard C, Karnowski A, Erikci E, Smyth GK, Chowdhury K, Tarlinton D, Corcoran LM. The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity. *J Exp Med*. 2014;211(5):827-40.
- Chevrier S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, Malissen M, Botto M, Corcoran LM, Nutt SL, Acha-Orbea H. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3895-900.
- Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ.Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity*. 2006;25(3):417-28.
- Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011;12(2):151-9.
- Coquery CM, Loo WM, Wade NS, Bederman AG, Tung KS, Lewis JE, Hess H, Erickson LD. BAFF regulates follicular helper t cells and affects their accumulation and interferon-γ production in autoimmunity. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):773-84.
- Coquery CM, Wade NS, Loo WM, Kinchen JM, Cox KM, Jiang C, Tung KS, Erickson LD. Neutrophils contribute to excess serum BAFF levels and promote CD4+ T cell and B cell responses in lupus-prone mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e102284.
- Cornec D, Costa S, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S, Marcorelles P, Berthelot JM, Chiche L, Hachulla E, Hatron PY, Goeb V, Vittecoq O, Saraux A, Pers JO. Blood and salivary- gland BAFFdriven B-cell hyperactivity is associated to rituximab inefficacy in primary Sjögren's syndrome. J Autoimmun. 2016;67:102-10.
- Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(6):337-47.
- Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature*. 2003 Jan 16;421(6920):282-7.
- Devauchelle-Pensec V, Mariette X, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Perdriger A, Puéchal X, Le Guern V, Sibilia J, Gottenberg JE, Chiche L, Hachulla E, Hatron PY, Goeb V, Hayem G, Morel J, Zarnitsky C, Dubost JJ, Pers JO, Nowak E, Saraux A.Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2014;160(4):233-42.
- DiLillo DJ, Hamaguchi Y, Ueda Y, Yang K, Uchida J, Haas KM, Kelsoe G, Tedder TF. 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):361-71.
- Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol*. 2013;190(4):1827-36.
- Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S, Reynaud CA, Weill JC. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1292-9.
- Dörner T, Shock A, Goldenberg DM, Lipsky PE. The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2015;14(12):1079-86.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P,Close DR, Stevens RM, Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004;350(25):2572-81.
- Ehrenstein MR, Wing C. The BAFFling effects of rituximab in lupus: danger ahead? *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(6):367-72.

- Ellyard JI, Avery DT, Mackay CR, Tangye SG. Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol.* 2005;35(3):699-708.
- Emery P, Rigby W, Tak PP, Dörner T, Olech E, Martin C, Millar L, Travers H, Fisheleva E. Safety with ocrelizumab in rheumatoid arthritis: results from the ocrelizumab phase III program. *PLoS One*. 2014;9(2):e87379.
- Espeli M, Bökers S, Giannico G, Dickinson HA, Bardsley V, Fogo AB, Smith KG. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):296-305.
- Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):63-72.
- Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*. 2000;290(5489):89-92.
- Fairfax KA, Corcoran LM, Pridans C, Huntington ND, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM. Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J Immunol.* 2007;178(7):4104-11.
- Figgett WA, Deliyanti D, Fairfax KA, Quah PS, Wilkinson-Berka JL, Mackay F. Deleting the BAFF receptor TACI protects against systemic lupus erythematosus without extensive reduction of B cell numbers. *J Autoimmun*. 2015;61:9-16.
- Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.
- Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science*. 1994;265(5176):1225-7.
- Foote JB, Mahmoud TI, Vale AM, Kearney JF.Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *J Immunol*. 2012;188(1):57-67.
- Foster D, Parrish-Novak J, Fox B, Xu W. Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(2):160-70.
- Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzová D, Sanchez-Guerrero J, Schwarting A, Merrill JT, Chatham WW, Stohl W, Ginzler EM,Hough DR, Zhong ZJ, Freimuth W, van Vollenhoven RF; BLISS-76 Study Group. A phaseIII, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011;63(12):3918-30.
- Ganjoo KN, de Vos S, Pohlman BL, Flinn IW, Forero-Torres A, Enas NH, Cronier DM, Dang NH, Foon KA, Carpenter SP, Slapak CA, Link BK, Smith MR, Mapara MY,Wooldridge JE. Phase 1/2 study of ocaratuzumab, an Fc-engineered humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in low-affinity FcγRIIIa patients with previously treated follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):42-8.
- García De Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M, O'Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, Owen MJ, MacLennan IC. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol*. 1999;29(11):3712-21.
- Gardam S, Brink R. Non-Canonical NF-κB Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctures. *Front Immunol.* 2014 6;4:509.
- Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*. 1993;177(4):999-1008.
- Genovese MC, Kinnman N, de La Bourdonnaye G, Pena Rossi C, Tak PP. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumor necrosis factor antagonist therapy: results of a phase II, randomized, placebo-controlled, dose-finding trial. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):1793-803.
- Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res Ther*. 2012;14 Suppl 4:S1.
- Ginzler EM, Wax S, Rajeswaran A, Copt S, Hillson J, Ramos E, Singer NG. Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):R33.
- Goenka R, Matthews AH, Zhang B, O'Neill PJ, Scholz JL, Migone TS, Leonard WJ, Stohl W, Hershberg U, Cancro MP. Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med.* 2014;211(1):45-56.
- Gonda H, Sugai M, Nambu Y, Katakai T, Agata Y, Mori KJ, Yokota Y, Shimizu A. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med*. 2003;198(9):1427-37.
- Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010;11(6):535-42.
- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7042):590-7.
- Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, Tschopp J, Cachero TG, Batten M, Wheway J, Mauri D, Cavill D, Gordon TP, Mackay CR, Mackay F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 2002;109(1):59-68.
- Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, Smyth MJ, Mackay CR, Mackay F. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1959-71.
- Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, Rixon M, Schou O, Foley KP, Haugen H, McMillen S, Waggie K, Schreckhise RW, Shoemaker K, Vu T,Moore M, Grossman A, Clegg CH. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity*. 2001 Aug;15(2):289-302.
- Gross JA, Johnston J, Mudri S, Enselman R, Dillon SR, Madden K, Xu W, Parrish-Novak J, Foster D, Lofton-Day C, Moore M, Littau A, Grossman A, Haugen H,Foley K, Blumberg H, Harrison K, Kindsvogel W, Clegg CH. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*.2000;404(6781):995-9.
- Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, Khouatra C, Aumaître O, Cohen P, Maurier F,Decaux O, Ninet J, Gobert P, Quémeneur T, Blanchard-Delaunay C, Godmer P, Puéchal X, Carron PL, Hatron PY, Limal N, Hamidou M, Ducret M, Daugas E, Papo T, Bonnotte B, Mahr A, Ravaud P, Mouthon L; French Vasculitis Study Group. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*. 2014;371(19):1771-80.
- Guo W, Smith D, Aviszus K, Detanico T, Heiser RA, Wysocki LJ. Somatic hypermutation as a generator of antinuclear antibodies in a murine model of systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2010;207(10):2225-37.
- Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. 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):7-18.
- Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoretti IV, Popova L, Kaminiski D, Fucile CF, Albizua I, Kyu S, Chiang KY, Bradley KT, Burack R, Slifka M, Hammarlund E, Wu H, Zhao L, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, Cheung WC, Sanz I, Lee FE. Long- Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity*. 2015;43(1):132-45.
- Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*. 2001;194(1):45-56.
- Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocyto-penic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura.1951. *J Lab Clin Med.* 1990;115(5):636-45.
- Hase H, Kanno Y, Kojima M, Hasegawa K, Sakurai D, Kojima H, Tsuchiya N, Tokunaga K, Masawa N, Azuma M, Okumura K, Kobata T. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood*. 2004;103(6):2257-65.
- Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, Manz RA. 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):1277-82.
- Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, Gui M, Allman D, Stewart CL, Silver J, Hardy RR. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science*. 1999;285(5424):113-6.
- He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. Intestinal bacteria trigger T cell- independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007;26(6):812-26.
- Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, Klein U. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-κB transcription factor subunits. *J Exp Med.* 2014;211(10):2103-18.

- Henneken M, Dörner T, Burmester GR, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*.2005;7(5):R1001-13.
- Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol.* 2007;178(6):3822-30.
- Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*. 1986;16(10):1297-301.
- Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* 1988;31(6):784-8.
- Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D, Radbruch A, Hiepe F, Manz RA. Shortlived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med.* 2004;199(11):1577-84.
- Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Mailhos C,Ish-Horowicz D, Habu S, Owen MJ. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2004;5(6):638-44.
- Hsu MC, Toellner KM, Vinuesa CG, Maclennan IC. B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):5905-10.
- Huang W, Sinha J, Newman J, Reddy B, Budhai L, Furie R, Vaishnaw A, DavidsonA. The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1554-62.
- Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, Donze O, Frossard C, Chizzolini C, Favre C, Zubler R, Guyot JP, Schneider P, Roosnek E. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2887-95.
- Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E, Tschopp J, Schneider P, French LE. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol*. 2004;16(3):467-75.
- Huard B, Schneider P, Mauri D, Tschopp J, French LE. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. J Immunol. 2001 Dec 1;167(11):6225-31. Erratum in: J Immunol 2002;168(2):957.
- Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dörner T, Kroczek RA. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3211-20.
- Hyland L, Sangster M, Sealy R, Coleclough C. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J Virol*. 1994;68(9):6083-6.
- Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, Qiang F, Gorelik L, Kalled SL, Acha-Orbea H, Rennert PD, Tschopp J, Schneider P. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med.* 2005;201(9):1375-83.
- Isenberg D, Gordon C, Licu D, Copt S, Rossi CP, Wofsy D. Efficacy and safety of atacicept for prevention of flares in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): 52-week data (APRIL-SLE randomised trial). *Ann Rheum Dis.* 2015;74(11):2006-15.
- Isenberg DA, Petri M, Kalunian K, Tanaka Y, Urowitz MB, Hoffman RW, Morgan-Cox M, Iikuni N, Silk M, Wallace DJ. Efficacy and safety of subcutaneous tabalumab in patients with systemic lupus erythematosus: results from ILLUMINATE-1, a 52-week, phase III, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(2):323-31.
- Iwai H, Abe M, Hirose S, Tsushima F, Tezuka K, Akiba H, Yagita H, Okumura K,Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis. *J Immunol*.2003;171(6):2848-54.
- Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev.* 2003,194: 29-38.
- Jacobs HM, Thouvenel CD, Leach S, Arkatkar T, Metzler G, Scharping NE, Kolhatkar NS, Rawlings DJ, Jackson SW. Cutting Edge: BAFF Promotes Autoantibody Production via TACI-Dependent Activation of Transitional B Cells. *J Immunol*. 2016;196(9):3525-31.

- Jain S, Park G, Sproule TJ, Christianson GJ, Leeth CM, Wang H, Roopenian DC, Morse HC 3rd. Interleukin 6 Accelerates Mortality by Promoting the Progression of the Systemic Lupus Erythematosus-Like Disease of BXSB.Yaa Mice. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153059.
- Jang E, Cho WS, Oh YK, Cho ML, Kim JM, Paik DJ, Youn J. Splenic Long-Lived Plasma Cells Promote the Development of Follicular Helper T Cells during Autoimmune Responses. *J Immunol*. 2016;196(3):1026-35.
- Jang E, Cho WS, Cho ML, Park HJ, Oh HJ, Kang SM, Paik DJ, Youn J. Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J Immunol*. 2011;186(3):1546-53.
- Jourdan M, Cren M, Robert N, Bolloré K, Fest T, Duperray C, Guilloton F, Hose D, Tarte K, Klein B. 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):1647-56.
- Kabashima K, Haynes NM, Xu Y, Nutt SL, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med*. 2006;203(12):2683-90.
- Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, McKenzie BS, Lew AM, Corcoran LM, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Nutt SL. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*.2007;26(5):555-66.
- Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1expression. *J Exp Med*. 2004;200(8):967-77.
- Kalunian KC, Davis JC Jr, Merrill JT, Totoritis MC, Wofsy D; IDEC-131 Lupus Study Group. Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2002;46(12):3251-8.
- Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1994;1(3):167-78.
- Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U. Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):262-8.
- Khare SD, Sarosi I, Xia XZ, McCabe S, Miner K, Solovyev I, Hawkins N, Kelley M, Chang D, Van G, Ross L, Delaney J, Wang L, Lacey D, Boyle WJ, Hsu H. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3370-5.
- Khellaf M, Charles-Nelson A, Fain O, Terriou L, Viallard JF, Cheze S, Graveleau J, Slama B, Audia S, Ebbo M, Le Guenno G, Cliquennois M, Salles G,Bonmati C, Teillet F, Galicier L, Hot A,Lambotte O, Lefrère F, Sacko S, Kengue DK, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Michel M, Godeau B. Safety and efficacy of rituximab in adult immune thrombocytopenia: results from a prospective registry including 248 patients. *Blood*. 2014;124(22):3228-36.
- Khodadadi L, Cheng Q, Alexander T, Sercan-Alp Ö, Klotsche J, Radbruch A, Hiepe F, Hoyer BF, Taddeo A. Bortezomib Plus Continuous B Cell Depletion Results in Sustained Plasma Cell Depletion and Amelioration of Lupus Nephritis in NZB/W F1 Mice. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135081.
- Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2000;2(2):126-31.
- Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol*.1999;162(5):3053-62.
- Kishi Y, Aiba Y, Higuchi T, Furukawa K, Tokuhisa T, Takemori T, Tsubata T. Augmented antibody response with premature germinal center regression in CD40L transgenic mice. *J Immunol.* 2010;185(1):211-9.
- Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, Ludwig T, Rajewsky K, Dalla-Favera R. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2006;7(7):773-82.
- Kraaij T, Huizinga TW, Rabelink TJ, Teng YK. Belimumab after rituximab as maintenance therapy in lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(11):2122-4.
- Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*. 2004;117(6):787-800.
- Lacotte S, Decossas M, Le Coz C, Brun S, Muller S, Dumortier H. Early differentiated CD138 (high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e58140.

- Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis.* 2007 May;66(5):700-3.
- Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Pathol*. 2004;202(4):496-502.
- Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):613-20.
- Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.2002;46(10):2673-7.
- Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, Cyster JG. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*. 2004;20(4):441-53.
- Lin L, Gerth AJ, Peng SL. Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *J Exp Med*.2004;200(1):115-22.
- Lin W, Seshasayee D, Lee WP, Caplazi P, McVay S, Suto E, Nguyen A, Lin Z, Sun Y, DeForge L, Balazs M, Martin F, Zarrin AA. Dual B cell immunotherapy is superior to individual anti-CD20 depletion or BAFF blockade in murine models of spontaneous or accelerated lupus. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(1):215-24.
- Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science*. 1997;276(5312):596-9.
- Lindner C, Thomsen I, Wahl B, Ugur M, Sethi MK, Friedrichsen M, Smoczek A,Ott S, Baumann U, Suerbaum S, Schreiber S, Bleich A, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, Hazanov H, Mehr R, Boysen P, Rosenstiel P, Pabst O. Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat Immunol.* 2015;16(8):880-8.
- Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med.* 2010;207(2):353-63.
- Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL,Cook MC, Walters GD, Vinuesa CG. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2009;206(3):561-76.
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002;3(9):822-9.
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*. 1999;190(1):75-89.
- Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ, Sloand JA, Rosenblatt J, Sanz I. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2580-9.
- Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol*. 2006;18(5):284-9.
- Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 1999;190(11):1697-710.
- MacLennan I, Vinuesa C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity*. 2002;17(3):235-8.
- MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zúñiga E, Cook MC, Vinuesa CG. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* 2003;194:8-18.
- Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cellindependent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. 2000;288(5474):2222-6.
- Mahévas M, Michel M, Vingert B, Moroch J, Boutboul D, Audia S, Cagnard N, Ripa J, Menard C, Tarte K, Mégret J, Le Gallou S, Patin P, Thai L, Galicier L,Bonnotte B, Godeau B, Noizat-Pirenne F, Weill JC, Reynaud CA. Emergence of long-lived autoreactive plasma cells in the spleen of primary warm auto-immune hemolytic anemia patients treated with rituximab. *J Autoimmun*. 2015;62:22-30.
- Mahévas M, Patin P, Huetz F, Descatoire M, Cagnard N, Bole-Feysot C, Le Gallou S, Khellaf M, Fain O, Boutboul D, Galicier L, Ebbo M, Lambotte O, Hamidou M, Bierling P, Godeau B, Michel M, Weill

JC, Reynaud CA. B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest*.2013;123(1):432-42.

- Manz RA, Löhning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol*. 1998;10(11):1703-11.
- Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997;388(6638):133-4.
- Manzi S, Sánchez-Guerrero J, Merrill JT, Furie R, Gladman D, Navarra SV, Ginzler EM, D'Cruz DP, Doria A, Cooper S, Zhong ZJ, Hough D, Freimuth W, Petri MA; BLISS-52 and BLISS-76 Study Groups. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1833-8.
- Mariette X, Seror R, Quartuccio L, Baron G, Salvin S, Fabris M, Desmoulins F, Nocturne G, Ravaud P, De Vita S. Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS openlabel phase II study. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):526-31.
- Martin F, Chan AC. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity*. 2004;20(5):517-27.
- Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol. 2002;2(5):323-35.
- Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against Tindependent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14(5):617-29.
- Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 2000;407(6804):636-42.
- Matsumoto M, Lo SF, Carruthers CJ, Min J, Mariathasan S, Huang G, Plas DR, Martin SM, Geha RS, Nahm MH, Chaplin DD. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):462-6.
- Matthes T, Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber ML, Krause KH, Donze O, Passweg J, McKee T, Huard B. Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood*. 2011;118(7):1838-44.
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003;197(4):489-501.
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998;16(8):2825-33.
- Md Yusof MY, Vital EM, Das S, Dass S, Arumugakani G, Savic S, Rawstron AC, Emery P. Repeat cycles of rituximab on clinical relapse in ANCA-associated vasculitis: identifying B cell biomarkers for relapse to guide retreatment decisions. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1734-8.
- Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, González-García I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 2002;99(6): 2154-61.
- Medina F, Segundo C, Rodríguez C, Brieva JA. Regulatory role of CD95 ligation on human B cells induced in vivo capable of spontaneous and high-rate Ig secretion. *Eur J Immunol*. 1997;27(3):700-6.
- Mei HE, Wirries I, Frölich D, Brisslert M, Giesecke C, Grün JR, Alexander T, Schmidt S, Luda K, Kühl AA, Engelmann R, Dürr M, Scheel T, Bokarewa M, Perka C, Radbruch A, Dörner T. A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood.* 2015;125(11):1739-48.
- Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2016;44(3):683-97.
- Merrill JT, van Vollenhoven RF, Buyon JP, Furie RA, Stohl W, Morgan-Cox M, Dickson C, Anderson PW, Lee C, Berclaz PY, Dörner T. Efficacy and safety of subcutaneous tabalumab, a monoclonal antibody to B-cell activating factor, in patients with systemic lupus erythematosus: results from ILLUMINATE-2, a 52-week, phase III, multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(2):332-40.
- Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, Utset TO, Gordon C, Isenberg DA, Hsieh HJ, Zhang D, Brunetta PG. Efficacy and safety of rituximab in moderately- to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):222-33.

- Merville P, Déchanet J, Desmoulière A, Durand I, de Bouteiller O, Garrone P,Banchereau J, Liu YJ. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med.* 1996;183(1):227-36.
- Mihara M, Tan I, Chuzhin Y, Reddy B, Budhai L, Holzer A, Gu Y, Davidson A. CTLA4Ig inhibits T celldependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2000;106(1):91-101.
- Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *JImmunol*. 2002;169(8):4213-21.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestina inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002;16(2):219-30.
- Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol*. 1995;154(3):1470-80.
- Mohr E, Serre K, Manz RA, Cunningham AF, Khan M, Hardie DL, Bird R, MacLennan IC. Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J Immunol*. 2009;182(4):2113-23.
- Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol.* 2006;7(3):293-301.
- Moroni G, Gallelli B, Sinico RA, Romano G, Sinigaglia L, Messa P. Rituximab versus oral cyclophosphamide for treatment of relapses of proliferative lupus nephritis: a clinical observational study. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1751-2.
- Moulian N, Berrih-Aknin S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol*. 1998;10(6):449-56.
- Mumtaz IM, Hoyer BF, Panne D, Moser K, Winter O, Cheng QY, Yoshida T, Burmester GR, Radbruch A, Manz RA, Hiepe F. Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: implications for the treatment of autoimmunity. *J Autoimmun*. 2012;39(3):180-8.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102(5):553-63.
- Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, Ikebe D, Yamamoto M, Igarashi K. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*. 2004;429(6991):566-71.
- Mysler EF, Spindler AJ, Guzman R, Bijl M, Jayne D, Furie RA, Houssiau FA,Drappa J, Close D, Maciuca R, Rao K, Shahdad S, Brunetta P. Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase IIIstudy. *Arthritis Rheum.* 2013;65(9):2368-79.
- Nagata S. Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet*. 1998;43(1):2-8.
- Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, Li EK, Thomas M, Kim HY, León MG, Tanasescu C, Nasonov E, Lan JL, Pineda L, Zhong ZJ,Freimuth W, Petri MA; BLISS-52 Study Group. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised,placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011;377(9767):721-31.
- Nemazee DA, Bürki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*. 1989;337(6207):562-6.
- Nera KP, Kohonen P, Narvi E, Peippo A, Mustonen L, Terho P, Koskela K, Buerstedde JM, Lassila O. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation.*Immunity*. 2006;24(3):283-93.
- Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, Wiethe C, Winkler TH, Kalden JR, Manz RA, Voll RE. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med.* 2008;14(7):748-55.
- Ng KP, Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein M, Isenberg DA. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(9):1259-62.
- Ng LG, Mackay CR, Mackay F. The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. *Mol Immunol.* 2005;42(7):763-72.
- Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR. B cell-activating factor

belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol.* 2004;173(2):807-17.

- Nutt SL, Fairfax KA, Kallies A. BLIMP1 guides the fate of effector B and Tcells. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):923-7.
- Nutt SL, Eberhard D, Horcher M, Rolink AG, Busslinger M. Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol.* 2001;20(1):65-82.
- O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004;199(1):91-8.
- Ochiai K, Muto A, Tanaka H, Takahashi S, Igarashi K. Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *Int Immunol*.2008;20(3):453-60.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999;286(5447):2156-9.
- Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105(4):1614-21.
- Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*. 2004;173(9):5361-71.
- Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC 3rd, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. 2002;298(5598):1630-4.
- Pabst O, Peters T, Czeloth N, Bernhardt G, Scharffetter-Kochanek K, Förster R. Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta 2 integrin. *J Immunol.* 2005;174(12):7492-5.
- Pabst O, Ohl L, Wendland M, Wurbel MA, Kremmer E, Malissen B, Förster R.Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med.* 2004;199(3):411-6.
- Patriquin CJ, Thomas MR, Dutt T, McGuckin S, Blombery PA, Cranfield T, Westwood JP, Scully M. Bortezomib in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2016;173(5):779-85.
- Pelletier N, McHeyzer-Williams LJ, Wong KA, Urich E, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1110-8.
- Pelletier N, Casamayor-Pallejà M, De Luca K, Mondière P, Saltel F, Jurdic P,Bella C, Genestier L, Defrance T. The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway. *J Immunol.* 2006;176(3):1340-7.
- Pengo N, Scolari M, Oliva L, Milan E, Mainoldi F, Raimondi A, Fagioli C, Merlini A, Mariani E, Pasqualetto E, Orfanelli U, Ponzoni M, Sitia R, Casola S,Cenci S. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol.* 2013;14(3):298-305.
- Peperzak V, Vikström I, Walker J, Glaser SP, LePage M, Coquery CM, Erickson LD, Fairfax K, Mackay F, Strasser A, Nutt SL, Tarlinton DM. Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol*. 2013;14(3):290-7.
- Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1122-6.
- Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. Am J Transplant. 2006;6(5 Pt 1):859-66.
- Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol*. 2009;21(5):293-300.
- Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, Brink R. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J Exp Med*. 2006;203(11):2419-24.
- Phan TG, Gardam S, Basten A, Brink R. Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to Tcell-dependent antigen. *J Immunol.* 2005;174(8):4567-78.
- Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, Magri G, Knowles DM, Tam W, Chiu A, Bussel JB, Serrano S, Lorente JA, Bellosillo B, Lloreta J, Juanpere N, Alameda F, Baró T, de Heredia CD, Torán N, Català A, Torrebadell M, Fortuny C, Cusí V, Carreras C, Diaz GA, Blander JM,Farber CM, Silvestri G, Cunningham-Rundles C, Calvillo M, Dufour C, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A, Casanova JL, Ganal SC, Diefenbach A, Aróstegui JI,Juan M, Yagüe J, Mahlaoui N, Donadieu J, Chen K, Cerutti A. B cell-helper neutrophils stimulate the

diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* 2011;13(2):170-80.

- Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):741-50.
- Rahman ZS, Rao SP, Kalled SL, Manser T. Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med.* 2003;198(8):1157-69.
- Ramos-Amaya A, Rodríguez-Bayona B, López-Blanco R, Andújar E, Pérez-Alegre M, Campos-Caro A, Brieva JA. Survival of human circulating antigen-induced plasma cells is supported by plasma cellniche cytokines and T follicular helper lymphocytes. *J Immunol.* 2015;194(3):1031-8.
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E,Gravallese EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. 2001;412(6844):300-7.
- Rigby W, Tony HP, Oelke K, Combe B, Laster A, von Muhlen CA, Fisheleva E, Martin C, Travers H, Dummer W. Safety and efficacy of ocrelizumab in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a forty-eight-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase III trial. *Arthritis Rheum*. 2012;64(2):350-9.
- Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Hermann F, Reich B, Mack M. Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J Immunol*. 2010;185(12):7180-5.
- Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, López-Blanco R, Campos-Caro A, Brieva JA. STAT-3 activation by differential cytokines is critical for human in vivo-generated plasma cell survival and Ig secretion. J Immunol. 2013;191(10):4996-5004.
- Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2377-86.
- Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J,Maciuca R, Zhang D, Garg JP, Brunetta P, Appel G; LUNAR Investigator Group. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1215-26.
- Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, Nair J, Boise LH, Chanan-Khan AA, Schoenberger SP, Lee KP. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1435-46.
- Salomonsson S, Larsson P, Tengnér P, Mellquist E, Hjelmström P,Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2002;55(4):336-42.
- Schebesta A, McManus S, Salvagiotto G, Delogu A, Busslinger GA, Busslinger M.Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*. 2007;27(1):49-63.
- Scholz JL, Crowley JE, Tomayko MM, Steinel N, O'Neill PJ, Quinn WJ 3rd, Goenka R, Miller JP, Cho YH, Long V, Ward C, Migone TS, Shlomchik MJ, Cancro MP. BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15517-22.
- Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1295-301.
- Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-36.
- Sciammas R, Davis MM. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J Immunol*. 2004;172(9):5427-40.
- Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity*. 2003;18(2):279-88.
- Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, Vigklis V, Fragiadaki KG, Iniotaki A, Moutsopoulos HM. Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum*. 2005;52(2):501-13.

- Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltnane JM, Yang L,Zhao H, Calame K, Staudt LM. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
- Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005 a;5(3):230-42.
- Shapiro-Shelef M, Lin KI, Savitsky D, Liao J, Calame K. Blimp-1 is required for maintenance of longlived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med.* 2005 b;202(11):1471-6.
- Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 2003;19(4):607-20.
- Shi W, Liao Y, Willis SN, Taubenheim N, Inouye M, Tarlinton DM, Smyth GK, Hodgkin PD, Nutt SL, Corcoran LM. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat Immunol.* 2015;16(6):663-73.
- Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC, Vinuesa CG, Cook MC. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.2010;62(1):234-44.
- Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998;8(3):363-72.
- Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol*. 1995;69(3):1895-902.
- Slocombe T, Brown S, Miles K, Gray M, Barr TA, Gray D. Plasma cell homeostasis: the effects of chronic antigen stimulation and inflammation. *J Immunol*. 2013;191(6):3128-38.
- Smith KG, Light A, O'Reilly LA, Ang SM, Strasser A, Tarlinton D. bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J Exp Med.* 2000;191(3):475-84.
- Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J*. 1997;16(11):2996-3006.
- Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol*. 1996;26(2):444-8.
- Smolen JS, Weinblatt ME, van der Heijde D, Rigby WF, van Vollenhoven R, Bingham CO 3rd, Veenhuizen M, Gill A, Zhao F, Komocsar WJ, Berclaz PY, Ortmann R,Lee C. Efficacy and safety of tabalumab, an anti-B-cell-activating factor monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis who had an inadequate response to methotrexate therapy: results from a phase III multicentre,randomised, double-blind study. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(8):1567-70.
- Starke C, Frey S, Wellmann U, Urbonaviciute V, Herrmann M, Amann K, Schett G, Winkler T, Voll RE. High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):2107-12
- Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001;98(4):952-7.
- Stohl W, Merrill JT, McKay JD, Lisse JR, Zhong ZJ, Freimuth WW, Genovese MC. Efficacy and safety of belimumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebocontrolled, dose-ranging Study. *J Rheumatol*. 2013;40(5):579-89.
- Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, Roschke V, Wu Y, Baker KP, Hilbert DM. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3475-86.
- Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, Kallenberg CG, St Clair EW, Turkiewicz A, Tchao NK, Webber L, Ding L, Sejismundo LP, Mieras K, Weitzenkamp D, Ikle D, Seyfert-Margolis V, Mueller M, Brunetta P, Allen NB, Fervenza FC, Geetha D, Keogh KA, Kissin EY, Monach PA, Peikert T, Stegeman C, Ytterberg SR, Specks U; RAVE-ITN Research Group. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 2010 ;363(3):221-32.
- Stott DI, Hiepe F, Hummel M, Steinhauser G, Berek C. Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. Thesalivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 1998;102(5):938-46.
- Strasser A, Bouillet P. The control of apoptosis in lymphocyte selection. Immunol Rev. 2003;193:82-92.

- Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, KishimotoT.Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):232-5.
- Sutherland AP, Ng LG, Fletcher CA, Shum B, Newton RA, Grey ST, Rolph MS, Mackay F, Mackay CR. BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. *J Immunol*. 2005;174(9):5537-44.
- Sze DM, Toellner KM, García de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med.* 2000;192(6):813-21.
- Taddeo A, Khodadai L, Voigt C, Mumtaz IM, Cheng Q, Moser K, Alexander T, Manz RA, Radbruch A, Hiepe F, Hoyer BF. Long-lived plasma cells are early and constantly generated in New Zealand Black/New Zealand White F1 mice and their therapeutic depletion requires a combined targeting of autoreactive plasma cells and their precursors. *Arthritis ResTher*. 2015;17:39.
- Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature*. 2001;409(6816):105-9.
- Taillardet M, Haffar G, Mondière P, Asensio MJ, Gheit H, Burdin N, Defrance T, Genestier L. The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells.*Blood*. 2009;114(20):4432-40.
- Tak PP, Mease PJ, Genovese MC, Kremer J, Haraoui B, Tanaka Y, Bingham CO 3rd, Ashrafzadeh A, Travers H, Safa-Leathers S, Kumar S, Dummer W. Safety and efficacy of ocrelizumab in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to at least one tumor necrosis factor inhibitor: results of a forty-eight–week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase III trial. *Arthritis Rheum*. 2012;64(2):360-70.
- Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J Exp Med.* 1998 Mar 16;187(6):885-95.
- Tan SM, Xu D, Roschke V, Perry JW, Arkfeld DG, Ehresmann GR, Migone TS, Hilbert DM, Stohl W. Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(4):982-92.
- Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):412-26.
- Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *TrendsImmunol*. 2011;32(12):595-602.
- Tarlinton D. B-cell memory: are subsets necessary? Nat Rev Immunol. 2006;6(10):785-90.
- Terrier B, Amoura Z, Ravaud P, Hachulla E, Jouenne R, Combe B, Bonnet C, Cacoub P, Cantagrel A, de Bandt M, Fain O, Fautrel B, Gaudin P, Godeau B, Harlé JR, Hot A, Kahn JE, Lambotte O, Larroche C, Léone J, Meyer O, Pallot-Prades B,Pertuiset E, Quartier P, Schaerverbeke T, Sibilia J, Somogyi A, Soubrier M,Vignon E, Bader-Meunier B, Mariette X, Gottenberg JE; Club Rhumatismes etInflammation. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus:results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2458-66.
- Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood*. 1990;76(9):1739-47.
- Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, Brink R. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*. 2004;20(6):785-98.
- Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP.Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(7):917-25.
- Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. J Exp Med. 1993;177(4):1009-20.
- Todd SK, Pepper RJ, Draibe J, Tanna A, Pusey CD, Mauri C, Salama AD.Regulatory B cells are numerically but not functionally deficient in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(9):1693-703.
- Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development.*Immunity*. 2004;20(6):707-18.
- Toyama H, Okada S, Hatano M, Takahashi Y, Takeda N, Ichii H, Takemori T,Kuroda Y, Tokuhisa T. Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity*. 2002;17(3):329-39.

- Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994;77(2):297-306.
- Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004;199(1):47-58.
- Unizony S, Lim N, Phippard DJ, Carey VJ, Miloslavsky EM, Tchao NK, Iklé D,Asare AL, Merkel PA, Monach PA, Seo P, St Clair EW, Langford CA, Spiera R,Hoffman GS, Kallenberg CG, Specks U, Stone JH. Peripheral CD5+ B cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol*.2015;67(2):535-44.
- van Vollenhoven RF, Wax S, Li Y, Tak PP. Safety and efficacy of atacicept in combination with rituximab for reducing the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):2828-36.
- van Vollenhoven RF, Kinnman N, Vincent E, Wax S, Bathon J. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate:results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*.2011 Jul;63(7):1782-92.
- van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO 3rd, Keystone EC, Fleischmann R,Furst DE, Macey K, Sweetser M, Kelman A, Rao R. Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol*. 2010;37(3):558-67.
- Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, Seshasayee D, Wang H, Lawrence D,Olsson C, Tom L, Erickson S, French D, Schow P, Grewal IS, Ashkenazi A.APRIL-deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):997-1006.
- Venhoff N, Niessen L, Kreuzaler M, Rolink AG, Hässler F, Rizzi M, Voll RE, Thiel J. Reconstitution of the peripheral B lymphocyte compartment in patients with ANCA-associated vasculitides treated with rituximab for relapsing or refractory disease. *Autoimmunity*. 2014;47(6):401-8.
- Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. Annu Rev Immunol.2012;30:429-57.
- Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A.Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*. 2003 ;19(6):837-47.
- Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. Nat Rev Immunol. 2002;2(10):797-804.
- Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(3):203-15.
- Vincent T, Mechti N. IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia*. 2004;18(5):967-75.
- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D,Domaschenz H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ, Goodnow CC. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7041):452-8.
- Vinuesa CG, Sze DM, Cook MC, Toellner KM, Klaus GG, Ball J, MacLennan IC. Recirculating and germinal center B cells differentiate into cells responsive to polysaccharide antigens. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):297-305.
- Vital EM, Dass S, Buch MH, Henshaw K, Pease CT, Martin MF, Ponchel F, Rawstron AC, Emery P. B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011;63(10):3038-47.
- Vital EM, Dass S, Rawstron AC, Buch MH, Goëb V, Henshaw K, Ponchel F, Emery P. Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5):1273-9.
- Vlahakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol.* 1992 a;2(8):1345-54.
- Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. *Kidney Int.* 1992 b;41(6):1690-700.
- von Bülow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity*. 2001;14(5):573-82.
- Vora KA, Wang LC, Rao SP, Liu ZY, Majeau GR, Cutler AH, Hochman PS, Scott ML, Kalled SL. Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol.* 2003;171(2):547-51.

- Wallace DJ, Hobbs K, Clowse ME, Petri M, Strand V, Pike M, Merrill JT, Leszczyński P, Neuwelt CM, Jeka S, Houssiau F, Keiserman M, Ordi-Ros J, Bongardt S, Kilgallen B, Galateanu C, Kalunian K, Furie R, Gordon C. Long-Term Safety and Efficacy of Epratuzumab in the Treatment of Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus: Results From an Open-Label Extension Study. *Arthritis Care Res(Hoboken).* 2016;68(4):534-43.
- Wallace DJ, Kalunian K, Petri MA, Strand V, Houssiau FA, Pike M, Kilgallen B, Bongardt S, Barry A, Kelley L, Gordon C. Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe active systemic lupus erythematosus: results from EMBLEM, a phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):183-90.
- Wallin EF, Jolly EC, Suchánek O, Bradley JA, Espéli M, Jayne DR, Linterman MA, Smith KG. Human Tfollicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood*.2014;124(17):2666-74.
- Wang W, Rangel-Moreno J, Owen T, Barnard J, Nevarez S, Ichikawa HT, Anolik JH. Long-term B cell depletion in murine lupus eliminates autoantibody-secreting cells and is associated with alterations in the kidney plasma cell niche. *J Immunol*. 2014;192(7):3011-20.
- Wang Y, Bhattacharya D. Adjuvant-specific regulation of long-term antibodyresponses by ZBTB20.*J Exp Med.* 2014;211(5):841-56.
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*.2003;301(5638):1374-7.
- Wehrli N, Legler DF, Finke D, Toellner KM, Loetscher P, Baggiolini M, MacLennan IC, Acha-Orbea H. Changing responsiveness to chemokines allow medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur J Immunol*. 2001;31(2):609-16.
- Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity*. 2016;44(1):116-30.
- Winter O, Moser K, Mohr E, Zotos D, Kaminski H, Szyska M, Roth K, Wong DM, Dame C, Tarlinton DM, Schulze H, MacLennan IC, Manz RA. Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood*. 2010;116(11):1867-75.
- Withers DR, Fiorini C, Fischer RT, Ettinger R, Lipsky PE, Grammer AC. T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood*. 2007;109(11):4856-64.
- Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*.2002;110(7):955-63.
- Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, Tumas D, Grewal IS, Dixit VM. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol.* 2001;2(7):638-43.
- Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(5):639-50.
- Yasuda T, Kometani K, Takahashi N, Imai Y, Aiba Y, Kurosaki T. ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Sci Signal*. 2011;4(169):ra25.
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997;16(2):161-70.
- Zehentmeier S, Roth K, Cseresnyes Z, Sercan Ö, Horn K, Niesner RA, Chang HD,Radbruch A, Hauser AE. Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(8):2306-17.
- Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ, Nutt SL, Tarlinton DM. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med.* 2010;207(2):365-78.