



HAL
open science

Caractérisation des nouveaux régulateurs de la survie et de la fonction des plasmocytes

Laetitia Gargowitsch Poncet

► **To cite this version:**

Laetitia Gargowitsch Poncet. Caractérisation des nouveaux régulateurs de la survie et de la fonction des plasmocytes. Immunologie. 2017. hal-01710895

HAL Id: hal-01710895

<https://ephe.hal.science/hal-01710895>

Submitted on 16 Feb 2018

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.



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

PONCET Laetitia

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Caractérisation de nouveaux régulateurs de la survie et de la
fonction des plasmocytes**

Soutenu le 4 décembre 2017 devant le jury suivant :

Dr STOCKHOLM Daniel - Président

Pr CANQUE Bruno - Tuteur scientifique

Dr ESPELI Marion - Tuteur pédagogique

Dr WELLER Sandra - Rapporteur

Dr SCHIFF Claudine - Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Espéli Marion

INSERM UMR 996 « Inflammation, chimiokines et Immunopathologie », Clamart

Directrice : Françoise Bachelerie

et de **Pr Canque Bruno**

UMR_S 1126 « Différenciation des cellules lymphoïdes et hémopathies malignes »

Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Centre Hayem, Paris

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre) – Modélisation, épigénétique et développement



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

PONCET Laetitia

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Caractérisation de nouveaux régulateurs de la survie et de la
fonction des plasmocytes**

Soutenu le 4 décembre 2017 devant le jury suivant :

Dr STOCKHOLM Daniel - Président

Pr CANQUE Bruno - Tuteur scientifique

Dr ESPELI Marion - Tuteur pédagogique

Dr WELLER Sandra - Rapporteur

Dr SCHIFF Claudine - Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Espéli Marion

INSERM UMR 996 « Inflammation, chimiokines et Immunopathologie », Clamart

Directrice : Françoise Bachelerie

et de **Pr Canque Bruno**

UMR_S 1126 « Différenciation des cellules lymphoïdes et hémopathies malignes »

Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, Centre Hayem, Paris

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre) – Modélisation, épigénétique et développement

Remerciements

Mes travaux ont été réalisés dans le laboratoire INSERM U996, Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie de Clamart. Je tiens à remercier le Dr Françoise Bachelerie, directrice de cette unité, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie le Dr Marion Espéli, ma tutrice scientifique, ma chef et bien plus car c'est elle qui m'a ouvert les portes de l'immunologie et qui m'a initié aux lymphocytes B et aux plasmocytes. Merci de m'avoir accordée ta confiance pendant ces 3 années, de m'avoir soutenue quand j'en avais le plus besoin, merci pour ta patience et tes conseils, merci pour ton aide précieuse lors des manip souris, ta vitesse de dissection m'a toujours impressionnée et enfin merci d'avoir pris le temps de corriger ce mémoire.

Je remercie le Dr. Bruno Canque pour les discussions et les conseils qu'il m'a prodigué en tant que tuteur pédagogique.

Je remercie le personnel de plate-forme, Marie-Laure et Hélène qui ont connu mes débuts laborieux en cytométrie de flux et qui ont toujours été à mon écoute, ainsi que Baptiste et Mylène qui m'ont énormément aidée dans les injections et les saignées de mes souris.

Je remercie Morgan et Agnieszka indispensables au bon fonctionnement de l'unité, Dominique pour la décomplémentation du SVF et Odile et Nadine, au secrétariat, sur qui j'ai toujours pu compter.

Je tiens également à remercier ma famille et mes enfants, merci d'avoir su être patient face aux « devoirs » de maman, vous êtes mes rayons de soleil, ma source intarissable de bonheur.

Table des matières

Liste des figures et tableaux	5
Liste des abréviations	7
Avant-propos	9
I INTRODUCTION	11
1 Ontogénèse de la cellule B.....	11
1.1 Origine des lymphocytes B.....	11
1.2 Maturation des lymphocytes B.....	12
1.3 Structuration et diversification du récepteur à l'antigène des LB.....	13
1.4 Les voies de signalisation sous-jacentes à l'activation du BCR	15
1.5 Organisation des organes lymphoïdes secondaires.....	15
1.5.1 La rate	15
1.5.2 Les ganglions lymphatiques	17
1.6 Rôle des chimiokines dans le trafic des lymphocytes.....	19
1.7 Rôle de BAFF et du BCR dans la maturation et la survie des lymphocytes B.....	19
1.8 Les sous-populations de lymphocytes B	20
1.8.1 Les lymphocytes B1.....	20
1.8.2 Les lymphocytes B2.....	20
1.9 La réponse B thymo-indépendante	22
1.9.1 Les antigènes de type 1.....	22
1.9.2 Les antigènes de type 2.....	22
1.10 La réponse B thymo-dépendante	23
1.10.1 De l'initiation de la réaction du centre germinatif (CG) à la formation d'un CG mature.....	23
1.10.2 La réaction extra-folliculaire	25
1.10.3 La réaction du centre germinatif	26
1.10.4 La commutation de classe.....	27
2 Les plasmocytes	29
2.1 Les différents stades de développement des plasmocytes.....	29
2.2 La régulation de la différenciation plasmocytaire	30
2.3 Les changements de morphologie cellulaire	31
2.4 Le stress du RE et la réponse UPR.....	32
2.5 Rôle de l'autophagie et de mTOR dans la régulation de l'immunité.....	34
2.6 Migration et survie des plasmocytes dans la moelle osseuse	36
2.7 Les immunoglobulines	37

2.7.1	Structure des immunoglobulines.....	37
2.7.2	Fonction des immunoglobulines.....	39
3	Les cellules B et les maladies auto-immunes.....	40
3.1	Définition de la tolérance du système immunitaire	40
3.2	La rupture de la tolérance.....	41
3.3	Les traitements actuels.....	42
4	Des régulateurs de la fonction immune : la Syntaxine-5 et Creld2	43
4.1	Le complexe Syntaxine-5 SNARE.....	43
4.2	Creld2.....	46
5	Contexte et objectifs.....	47
II	MATERIELS ET METHODES	49
1	Génie Génétique	49
1.1	Préparation des shRNA	49
1.2	Clonage dans les vecteurs lentiviraux pLKO.1-TRC et pLKO.3G	49
2	Culture cellulaire.....	51
2.1	La lignée cellulaire I.29.....	51
2.2	Production de particules lentivirales	51
2.3	Transfection des cellules HEK293T avec les plasmides lentiviraux.....	52
2.4	Collecte des particules lentivirales	52
2.5	Transduction lentivirale	53
3	Cytométrie en flux	53
3.1	Les anticorps	53
3.2	Immunomarquages membranaires et intracellulaires	54
3.3	Les sondes.....	55
3.4	Analyse des résultats	55
4	Etude de la sécrétion des immunoglobulines.....	56
4.1	ELISA.....	56
4.2	ELISpot	56
5	Analyse moléculaire.....	57
5.1	Séparation des protéines par électrophorèse sur gel polyacrylamide et immunotransfert ..	57
5.2	Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR en temps réel	58
6	Microscopie électronique : évaluation de la morphologie des compartiments intracellulaires....	58
7	Le modèle animal : les souris Mb1-cre x Creld2	59
7.1	Génération des cohorte de souris.....	59
7.2	Immunsation avec un antigène T-dépendant, le NP-KLH	60

7.3	Préparation des cellules murines.....	60
III	RESULTATS.....	61
1	Etude de l'impact de la Stx5 et de Creld2 sur des cellules B murines différenciées <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	61
1.1	Validation des shRNA dans la lignée I.29.....	61
1.2	Rôle des protéines Stx5 et Creld2 dans la différenciation et le maintien des PCs <i>ex vivo</i>	63
1.3	Rôle de la Stx5 et de Creld2 dans la production et la sécrétion d'anticorps <i>ex vivo</i>	67
1.4	Etude de l'expansion du réticulum endoplasmique (RE) et de l'autophagie <i>in vitro</i>	69
1.4.1	La Stx5 et Creld2 contrôlent l'expansion du RE	69
1.4.2	La Stx5 et Creld2 contrôlent l'autophagie	72
2	Etude de l'impact de Creld2 à l'aide d'un modèle de souris knockout	74
2.1	Invalidation de Creld2 dans les cellules B.....	74
2.2	Creld2 n'est pas indispensable à la maturation des LB.....	76
2.3	Immunisation T-dépendante : réponse primaire et secondaire.....	78
2.3.1	Absence de défaut de différenciation lymphocytaire	78
2.3.2	Etude de la sécrétion d'Ac par Elisa.....	80
2.3.3	Etude de la sécrétion d'Ac par ELISpot	82
2.4	Immunisation T-dépendante : réponse mémoire.....	84
2.4.1	Rôle de Creld2 dans le maintien des différentes populations de la réponse immune...84	
2.4.2	Rôle de Creld2 dans le maintien au long cours de la sécrétion d'Ig	86
IV	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	87
	Bibliographie	93
	Résumé	102

Liste des figures et tableaux

Introduction

Figure 1 : Diagramme représentatif de la différenciation d'une cellule souche.	11
Figure 2 : Les différents stades de l'ontogénèse B : de la cellule souche à la cellule B mature.	13
Figure 3 : Le récepteur des cellules B.	14
Figure 4 : Architecture de la rate.	16
Figure 5 : Structure organisation du ganglion lymphatique.	18
Figure 6 : Schéma représentatif des interactions cellulaires des LB MZ lors d'une réponse T- indépendante chez la souris.	21
Figure 7 : Dynamique des cellules B dans la réaction du centre germinatif.....	25
Figure 8 : Organisation et interactions cellulaires au sein du CG.	28
Tableau 1 : Caractéristiques des différents stades du développement plasmocytaire.....	29
Figure 9 : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans la différenciation plasmocytaire.....	31
Figure 10 : Changements de morphologie cellulaire pendant la différenciation plasmocytaire.	32
Figure 11 : Mécanisme de survie en condition de stress du RE.....	33
Figure 12 : Les différentes étapes de la macro-autophagie.	34
Figure 13 : Modèle d'une niche de survie pour les plasmocytes au sein de la moelle osseuse.....	37
Figure 14 : Schéma des différents isotypes des immunoglobulines.....	38
Figure 15 : Fonctions effectrices des Ac.	39
Figure 17 : Localisation des 2 isoformes de la Stx5.....	43
Figure 18 : Interactions de CLIMP-63 dans la structuration du RE	44
Figure 19 : Implication de la Stx5 dans le transport bidirectionnel entre le RE et le Golgi	45

Matériels et Méthodes

Figure 1 : shRNA et vecteurs d'expression.	50
Tableau 1 : Anticorps utilisés pour les immunomarquages analysés par cytométrie en flux.	54
Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les western-blots.....	57
Figure 2 : Constructions alléliques et génotypage des souris Mb1-cre (a) et Creld2 flox (b).....	59

Résultats

Figure 1.1 : Validation du knock-down de la Stx5 et Creld2 avec la lignée cellulaire I.29.....	62
Figure 1.2 : Effet de la Stx5 et de Creld2 sur la différenciation et la survie des plasmocytes ex vivo.	66
Figure 1.3 : Effet de la Stx5 et de Creld2 sur la production et la sécrétion d'Ac ex vivo.	68
Figure 1.4.1 : La Stx5 et creld2 contrôlent l'expansion du RE.	71
Figure 1.4.2 : La Stx5 et Creld2 jouent un rôle dans l'autophagie.....	73
Figure 2.1 : Invalidation de Creld2 dans les cellules B.	75
Figure 2.2 : Développement des LB chez les souris mb1-cre x Creld2.....	77
Figure 2.3.1 : Développement de la réponse immune T-dépendante.....	80
Figure 2.3.3 : L'absence de Creld2 affecte la maintenance et la maturation d'affinité des Ac.....	82
Figure 2.3.2 : Diminution de la sécrétion d'Ac chez les souris Creld2 KO.....	83
Figure 2.4.1 : Réponse mémoire.....	85
Figure 2.4.2 : Etude de la sécrétion d'Ac dans le temps.....	86

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigènes
APRIL	<i>A proliferation inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell activation factor</i>
BCR	Récepteur antigénique des lymphocytes B (<i>B cell Receptor</i>)
Blimp-1	<i>B lymphocyte induced maturation protein 1</i>
CG	Centre Germinatif
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
Creld2	<i>Cystein rich GFP like domain</i>
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CXCR4	C-X-C récepteur aux chimiokines de type 4
DC	Cellule Dendritique
FDC	Cellule Folliculaire Dendritique
FRC	<i>Fibroblastic Reticular Cell</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LC3	<i>Light chain 3</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MO	Moelle osseuse
NP	4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl
OL	Organe Lymphoïde
Pax5	<i>Paired protein box 5</i>
PC	Plasmocyte
RE	Réticulum Endoplasmique
Stx5	Syntaxin-5
TCR	Récepteur antigénique des lymphocytes T (<i>T cell Receptor</i>)
T _{FH}	Lymphocyte T CD4+ Folliculaire
T _H	Lymphocyte T CD4+ auxiliaire
XBP-1	<i>X-box Binding Protein-1</i>

Avant-propos

Lorsqu'un antigène (Ag) franchit les barrières défensives du corps humain qu'elles soient anatomiques (peau, muqueuses), ou physiologiques (température, pH, certains facteurs solubles), le système immunitaire réagit et monte une réponse appropriée. De manière schématique, cette réponse met en jeu l'immunité naturelle (ou innée) peu spécifique mais rapide et qui nous protège contre une grande variété de pathogènes par la reconnaissance de grandes classes de molécules appelées « *PAMPs* » pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*, et l'immunité adaptative (ou acquise). Celle-ci est hautement spécifique de déterminants antigéniques donnés (les épitopes) grâce aux lymphocytes T et B qui expriment à leur surface un récepteur à l'Ag unique. Les cellules présentatrices d'Ag (CPA) telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B participent à la coopération T-B en présentant l'Ag sous forme de peptide lié aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De plus cette réponse est dotée de propriétés remarquables d'apprentissage et de mémoire.

Deux mécanismes gouvernent la réponse immunitaire acquise, l'immunité à médiation humorale et l'immunité à médiation cellulaire. La première implique les cellules sécrétrices d'anticorps (Ac), les plasmocytes qui se développent suite à la rencontre spécifique entre un Ag et un lymphocyte B (LB). La seconde implique différentes sous-populations de cellules T dont les lymphocytes T auxiliaires (T_{Helper} ou T_{H}) $CD4^+$ et les lymphocytes T cytotoxiques (T_{C}) $CD8^+$. La reconnaissance du complexe Ag-molécule de classe II du CMH permet l'activation de la cellule T_{H} qui sécrètent alors divers facteurs solubles connus sous le nom de cytokines. Les cytokines sécrétées jouent un rôle très important dans l'activation des LB et d'autres cellules participant à la réponse immunitaire comme les T_{C} , qui suite à la reconnaissance du complexe Ag-molécule de classe I du CMH vont proliférer afin d'éliminer toutes les cellules qui exposent un Ag étranger ou du soi altéré à leur surface telles que les cellules infectées par un virus ou encore les cellules tumorales.

La fonction du système immunitaire est donc de préserver l'intégrité de l'individu en empêchant la pénétration ou la persistance dans l'organisme de tout élément étranger et dangereux. Cela s'étend aux réponses anti-tumorales. Lorsque cette défense est insuffisante on parle alors de déficit immunitaire (exemple : le syndrome WHIM, qui associe des verrues (*Warts*), une hypogammaglobulinémie (*Hypogammaglobulinemia*), des infections bactériennes récurrentes (*Infections*) et une rétention médullaire de neutrophiles matures (*Myelokathesis*)), à l'inverse si le système immunitaire répond de manière excessive en s'attaquant aux cellules de son propre organisme on parle de maladies autoimmunes. Ces maladies correspondent à des dérèglements et des désordres du système immunitaire.

L'apparition d'une maladie auto-immune est due à la rupture d'un ou plusieurs mécanismes de tolérance, ce qui conduit à une réaction pathogénique du système immunitaire vis-à-vis des constituants naturels de l'organisme ou Soi. Une des limites d'efficacité et de sensibilité du système immunitaire repose sur la spécificité de cette distinction entre le Soi et le Non-Soi d'où l'importance de la notion de tolérance immune.

Lors de cette introduction, nous passerons en revue l'architecture de nos organes lymphoïdes, la maturation des LB et la structure de leurs immuno-récepteurs. Nous détaillerons les réponses B thymo-indépendante et thymo-dépendante pour arriver au thème principal de mon travail qui est l'étude de l'effet de deux protéines, la Syntaxine-5 et Creld2, sur la différenciation et la survie des plasmocytes ainsi que sur la sécrétion d'Ac.

I INTRODUCTION

1 Ontogénèse de la cellule B

1.1 Origine des lymphocytes B

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines (**Figure 1**). Elles apparaissent dans le compartiment intra-embryonnaire où la région appelée splanchnopleure para-aortique (Peault and Tavian, 2003) génère des CSH multipotentes, capables de reconstituer à long terme le système hématopoïétique d'animaux irradiés. Chez l'homme, après 7 semaines de gestation ces cellules vont établir résidence dans le foie foetal puis au milieu du second trimestre on en trouvera dans la moelle osseuse (MO) (Nuñez et al., 1996), qui, juste avant la naissance deviendra leur résidence exclusive. Les CSH se différencient en deux progéniteurs distincts, les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP). Les CMP se différencient en progéniteur commun granulocytaire monocytaire (GMP) ou en progéniteur commun mégacaryocytaire érythroblastique (MEP). Les CLP pourront produire les progéniteurs des cellules T/NK, des cellules B, et des cellules dendritiques (Matthias and Rolink, 2005). Le thymus et la MO constituent les organes lymphoïdes primaires où prend place la maturation des lymphocytes. Les LB sont générées durant toute la vie d'un homme, bien que leur production décroisse avec l'âge (Nuñez et al., 1996).

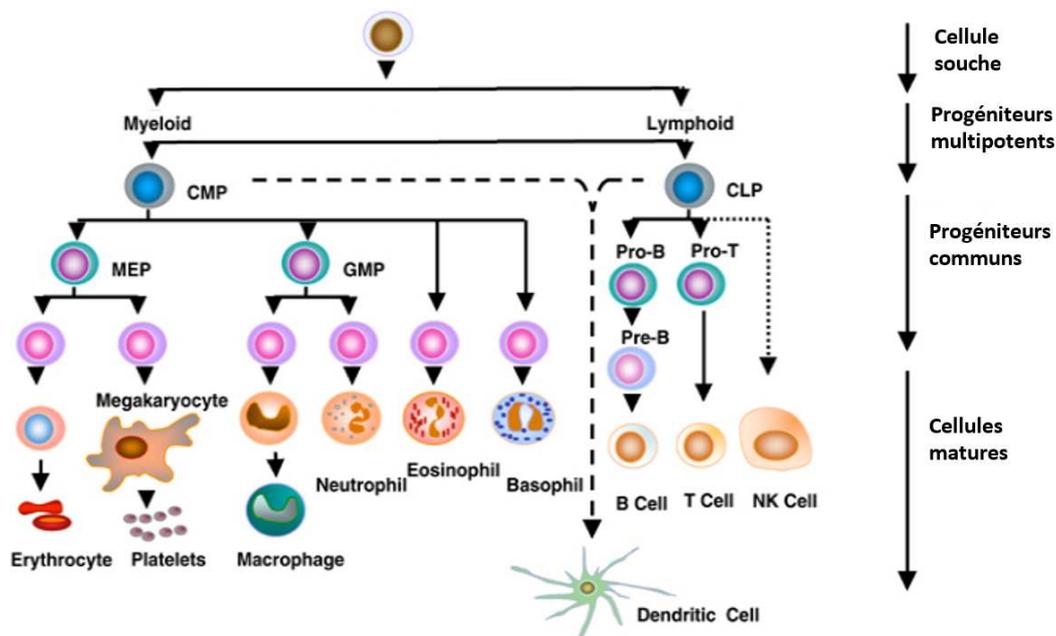


Figure 1 : Diagramme représentatif de la différenciation d'une cellule souche.
D'après Periobasics.com/cellular-basis-of-immune-response.

1.2 Maturation des lymphocytes B

Le développement des LB nécessite l'intégration des signaux provenant de leur environnement et incluant de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (par exemple : Flt3-L, C-kit-L, IL-7 et Cxcl12). Ces signaux mènent à l'expression coordonnée de facteurs de transcriptions : PU.1, Ikaros, E2A, EBF (Early B cell factor 1), et Pax5 (paired box gene 5) qui régulent positivement et négativement l'expression génique (Vale and Schroeder, 2010). En effet, une faible expression de PU.1 induit le développement de la cellule B et à l'inverse une forte expression favorise la différenciation en cellule myéloïde. A l'opposé, Ikaros est nécessaire pour le développement du lignage lymphoïde mais pas pour le lignage myéloïde. Les protéines E2A, EBF et Pax5 sont requises pour le développement des CLP vers les cellules B immatures. L'absence de l'un de ces facteurs va bloquer le développement de la cellule B au stade pro- ou pré-B (Matthias and Rolink, 2005).

Les premières étapes de différenciation se déroulent en l'absence de stimulation antigénique et requièrent des interactions avec les cellules stromales de la moelle (**Figure 2**) :

Dès le stade pro-B, les cellules expriment les molécules de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. A ce stade, l'interleukine (IL)-7 produite par les cellules stromales promeut les réarrangements D-J puis V-DJ de la chaîne lourde μ et favorise la survie et la prolifération des cellules pro-B murines (Milne and Paige, 2006).

Le stade « large » pré-B se caractérise par le réarrangement complet de la chaîne lourde μ . L' $Ig\mu$ est exprimée à la surface de la cellule, associée à une pseudo chaîne légère constituée de 2 protéines $V_{pr\acute{e}B}$ et $\lambda 5$ (Rajewsky, 1996). La chaîne lourde et la pseudo-chaîne légère ainsi associées forment le pré-BCR. La cellule est soumise à une sélection dite positive, qui si l'expression du pré-BCR est productive, recevra un signal de survie lui permettant de poursuivre sa maturation.

Au stade « petite » cellule pré-B, l'expression de $V_{pr\acute{e}B}$ et $\lambda 5$ est réprimé et la chaîne légère κ ou λ est réarrangée.

Au stade B immature, les cellules B expriment une immunoglobuline IgM membranaire ($Ig\mu$ et $Ig\kappa$ ou $Ig\lambda$ de surface) et sont soumises à une étape de sélection négative qui permettra l'acquisition de la tolérance au Soi en purgeant une partie des cellules B auto-réactives (les mécanismes de tolérance seront discutés dans la partie 3). Les cellules ayant franchi cette étape de sélection sortent de la MO pour finir leur différenciation dans les organes lymphoïdes (OL) secondaires et en particulier dans la rate. Ces cellules vont passer par un stade dit transitionnel et caractérisé par l'augmentation progressive

de l'expression d'IgD. Suite à ce processus, les LB matures naïfs vont circuler entre les différents OL et notamment la MO.

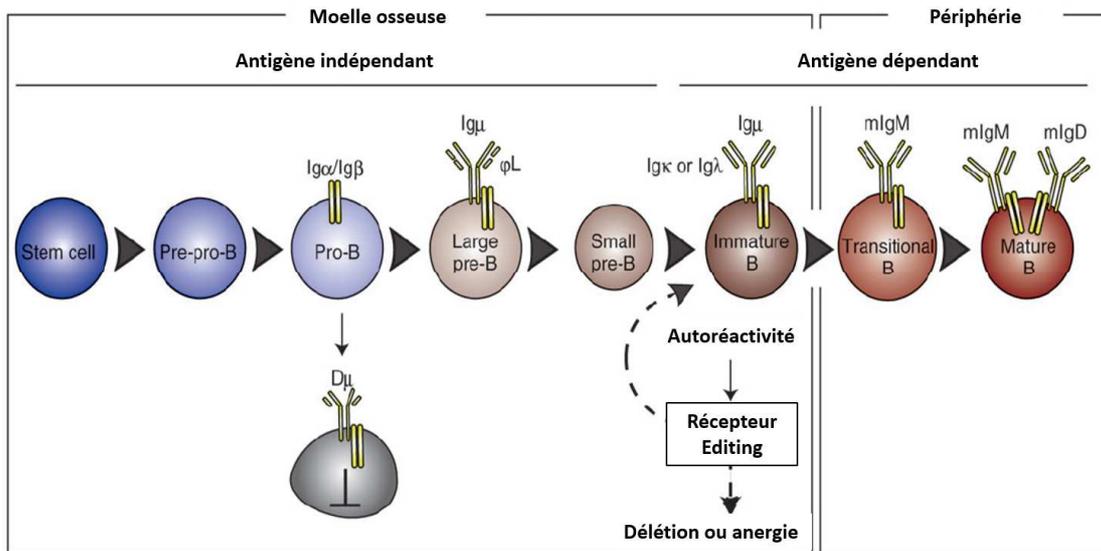


Figure 2 : Les différents stades de l'ontogénèse B : de la cellule souche à la cellule B mature. D'après (Kurosaki, 2010).

1.3 Structuration et diversification du récepteur à l'antigène des LB

Le BCR (*B cell receptor*) est un récepteur membranaire qui comprend 2 composantes : une unité de reconnaissance de l'Ag constituée par une immunoglobuline membranaire, dans la **figure 3** il s'agit d'une IgM, composée de 2 chaînes lourdes identiques ($Ig\mu$) de 50kDa et de 2 chaînes légères identiques ($Ig\kappa$ ou λ) de 25kDa et, une unité de transmission du signal comprenant l'hétérodimère formé par les corécepteurs CD79A ($Ig\alpha$) et CD79B ($Ig\beta$). En effet, les Ig possèdent des domaines cytoplasmiques courts, incapables de transmettre des signaux. C'est pourquoi le BCR est associé de manière non covalente à ces deux corécepteurs dont les parties cytoplasmiques contiennent des motifs d'activation conservés à base de tyrosine (ITAM, Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs).

Les chaînes légères sont codées chacune par 3 gènes : un **gène V** (variable), un **gène J** (jonction) et un **gène C** (constante). Les chaînes lourdes sont codées par 4 gènes, les mêmes que précédemment plus un **gène D** (diversité). A l'extrémité des portions Fab (*antigen-binding fragment*) se trouvent les domaines variables (V_H et V_L) qui portent chacun 3 boucles hypervariables, appelées CDR pour *Complementary Determining Region* dont l'association constitue le site de reconnaissance de l'épitope de l'Ag. La portion constante est composée des domaines CH1 et CL sur le fragment Fab et des domaines CH2, CH3 et CH4 sur le fragment cristallisable Fc. Ce dernier est responsable des fonctions immunologiques effectrices par sa fixation sur les récepteurs Fc (FcRs) présents à la surface des cellules et sur le

complément C1q. Enfin, les chaînes lourdes et légères sont liées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures.

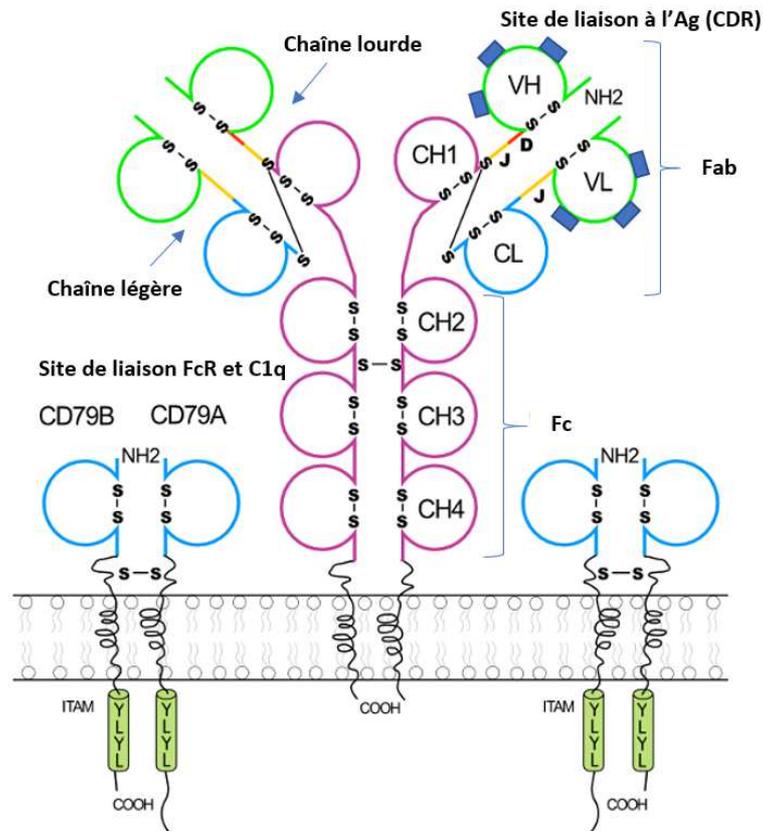


Figure 3 : Le récepteur des cellules B.

D'après Lefranc M.-P. et Lefranc G., *Activation des lymphocytes B.*

Chaque LB n'exprime qu'un seul type de BCR qu'il acquiert lors de son développement dans la moelle osseuse, ce phénomène est dû à un mécanisme appelé exclusion allélique qui permet d'obtenir une seule région génique V_H et V_L . Cette inhibition de tout réarrangement, lorsque le premier ou le deuxième réarrangement a été favorable, est permis par l'inactivation de deux enzymes RAG-1 (*Recombination Activating Gene-1*) et RAG-2, responsables de la recombinaison VDJ.

Pour répondre à un nombre élevé d'Ag susceptible d'être rencontrés par l'organisme, le système immunitaire doit avoir un répertoire de BCR varié. C'est pourquoi notre organisme a mis en place un certain nombre de mécanismes afin d'augmenter la diversité des Ig :

- La diversité combinatoire, due aux associations aléatoires des différents gènes V, D et J
- La diversité jonctionnelle due aux mécanismes de réparation de l'ADN qui génèrent une variabilité dans les zones de jonction par délétion ou insertion de nucléotides
- La diversité H-L, restreinte par l'association correcte des chaînes lourdes et légères.

1.4 Les voies de signalisation sous-jacentes à l'activation du BCR

La signalisation médiée par le BCR est essentielle pour le développement normal de la cellule B, ainsi que pour la sélection, la survie, la prolifération et la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac. La dérégulation des voies de signalisation intracellulaire initiées par le BCR joue un rôle crucial dans la pathogénèse des cellules B : dans l'inflammation, le cancer et le développement de maladies autoimmunes. Des approches génétiques et pharmacologiques ont établi un rôle important des tyrosines kinases Syk (*Spleen tyrosine kinase*), Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) et de PI3K δ (*phosphatidylinositol 3-kinase isoform p110delta*) dans le couplage du BCR et d'autres récepteurs des cellules B entraînant la survie, la migration et l'activation des cellules B (Puri et al., 2013).

L'activation d'un LB est initiée par le crosslinking du BCR par un Ag, ce qui conduit à l'activation des kinases de la famille Src et notamment de Lyn. Lyn induit la phosphorylation des motifs ITAM présents sur les queues cytoplasmiques des hétérodimères Ig α et Ig β permettant alors le recrutement de la kinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*) activée par Lyn et par trans-autophosphorylation. Syk induit ensuite une cascade d'événements induisant les voies de survie ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) qui font parties de la famille des MAP kinases jouant un rôle dans la division, la croissance et la prolifération cellulaire. Syk et Lyn permettent également la phosphorylation des tyrosines du co-récepteur CD19 qui fait partie d'un complexe avec CD21 (*Complement receptor 2*) et CD81 qui renforce les signaux induits par le BCR notamment par activation de la voie PI3K et la production de PIP₃ qui promeut l'activation de Btk, Akt et mTOR. De plus, Syk et Btk phosphorylent et activent PLC γ 2 ce qui déclenche des événements en chaîne aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) dépendants du calcium et NF κ B (*Nuclear factor-kappa B*) dont l'activation déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques.

1.5 Organisation des organes lymphoïdes secondaires

Les OL secondaires sont le lieu d'activation des lymphocytes naïfs. Leur structure et leur composition facilite la capture des Ag qui seront présentés aux lymphocytes T et B afin d'initier la réponse primaire adaptative. Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser à la rate et aux ganglions lymphatiques.

1.5.1 La rate

Hautement vascularisée, la rate contient environ un quart des lymphocytes de l'organisme (Cesta, 2006). La différence majeure avec les ganglions lymphatiques est l'absence de connexion avec le

système lymphatique. La rate assure l'immuno-surveillance des Ag présents dans le sang et, elle filtre également le sang des débris cellulaires et des globules rouges endommagés ou sénescents (Mebius and Kraal, 2005). Ces fonctions sont supportées par 2 compartiments principaux, la pulpe rouge et la pulpe blanche qui diffèrent en terme d'architecture, d'organisation vasculaire et de composition cellulaire (Cesta, 2006) (**Figure 4**).

La **pulpe rouge** est constituée de sinus veineux et de cellules immunes dont des macrophages, des granulocytes, des hématies et des plaquettes. Elle est directement localisée sous la capsule et c'est également le lieu de destruction des plaquettes et des hématies sénescents.

La **pulpe blanche** est composée de tissus lymphoïdes, organisés autour d'artéριοles desservant la gaine lymphoïde péri-artérielle (PALS) riche en LT, les follicules et la zone marginale. Les follicules, sont associés aux PALS et sont situés aux sites de bifurcation des artéριοles centrales (Ward et al, 1999). A l'état basal, les follicules primaires sont composés de LB, de cellules folliculaires dendritiques (FDC) et de quelques LT CD4⁺. Les follicules secondaires apparaissent suite à la rencontre entre un Ag et un LB spécifique, ils s'élargissent pour former une zone anatomique particulière appelée centre germinatif. Les LB folliculaires expriment les marqueurs IgM^{med}IgD^{hi}CD21^{med}CD23^{hi} (Batista and Harwood, 2009).

La zone marginale est propre à la rate, elle abrite notamment des macrophages de la zone marginale et des LB IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{hi}CD23^{lo} qui sont considérés comme un pont entre l'immunité innée et adaptative (Mebius and Kraal, 2005). Le sinus marginal est le site d'entrée des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC), il sépare la pulpe rouge de la pulpe blanche.

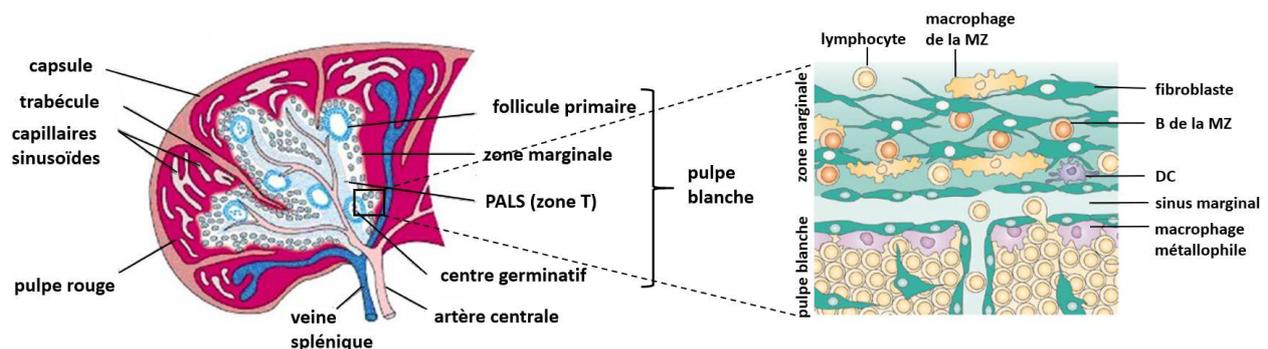


Figure 4 : Architecture de la rate.

La rate est un « organe filtre » du sang, composée de 2 compartiments anatomiques distincts : la pulpe blanche et la pulpe rouge. MZ : *marginal zone*, DC : *dendritic cell*, PALS : *periarteriolar lymphoid sheath*. Adaptée de (Mebius and Kraal, 2005).

1.5.2 Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont répartis dans tout l'organisme. Le plus souvent groupés en aires ganglionnaires, ils sont placés dans des zones stratégiques et ils protègent la peau (ganglions superficiels ou sous-cutanés) et les muqueuses des tractus digestif, respiratoire et uro-génital (ganglions viscéraux ou profonds). Les ganglions jouent le rôle de filtre, ils drainent la lymphe émanant du liquide interstitiel baignant les cellules de tous les tissus. Ceci permet de concentrer les Ag afin d'optimiser les rencontres entre les cellules devant collaborer lors de la réponse immune.

Ils sont entourés d'une capsule fibreuse conjonctive, percée de vaisseaux lymphatiques efférents qui déversent la lymphe au niveau des sinus, parcourant tout le ganglion pour finalement ressortir par le vaisseau lymphatique efférent au niveau du hile (**Figure 5**). Ils sont composés de 20 à 50% de cellules réticulaires fibroblastiques (FRCs) procurant au ganglion, force et flexibilité, imposant la compartimentalisation des cellules B et T et dirigeant le trafic leucocytaire grâce à la sécrétion de chimiokines. Les FRCs font partis de la population hétérogène de cellules stromales au sein des ganglions lymphatiques (Fletcher et al., 2015).

Les différentes parties du ganglion se distinguent les unes des autres par leur position ainsi que par leur contenu cellulaire. Cette organisation permet ainsi de faciliter les échanges entre tous les partenaires cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire.

- Le **cortex** ou « **zone B** », est le siège de la réponse humorale, il est situé sous la capsule de collagène et le sinus sous-capsulaire. Comme dans la rate, les LB y sont regroupés et forment les follicules primaires qui suite à une stimulation antigénique et une prolifération intense vont former des follicules secondaires. Les follicules contiennent également les FDCs.
- Le **paracortex** ou « **zone T** » est caractérisé par la présence de LT, de DCs ainsi que de veinules post-capillaires cubique nommées HEVs. Les HEVs sont spécialisés dans l'extravasation des lymphocytes B et T naïfs du sang tandis que les vaisseaux lymphatiques afférents permettent l'entrée des cellules présentatrice d'Ag notamment des DCs qui auront captées des Ag présents dans les tissus périphériques (Drayton et al., 2006). Ces DCs activées vont se loger préférentiellement dans la zone riche en LT à proximité des HEVs, où elles pourront présenter des Ag aux LT qui eux-mêmes pourront activés des LB. Le « conduit network » au sein du paracortex permet la circulation du liquide lymphatique du sinus sous-capsulaire vers les HEVs favorisant ainsi la diffusion de molécules de faible poids moléculaire telles que les chimiokines et les Ag (Batista and Harwood, 2009). Les lymphocytes peuvent quitter le ganglion par le canal

lymphatique efférent pour rejoindre le site de l'inflammation où ils pourront exercer leur fonction effectrice.

- La **médulla**, se trouve dans la partie centrale du ganglion, elle présente un labyrinthe de sinus et contient des lymphocytes B et T organisés en cordons médullaires. Elle contient également de nombreux plasmocytes, des macrophages et des cellules T mémoires (von Andrian and Mempel, 2003). Sa fonction est encore peu connue.

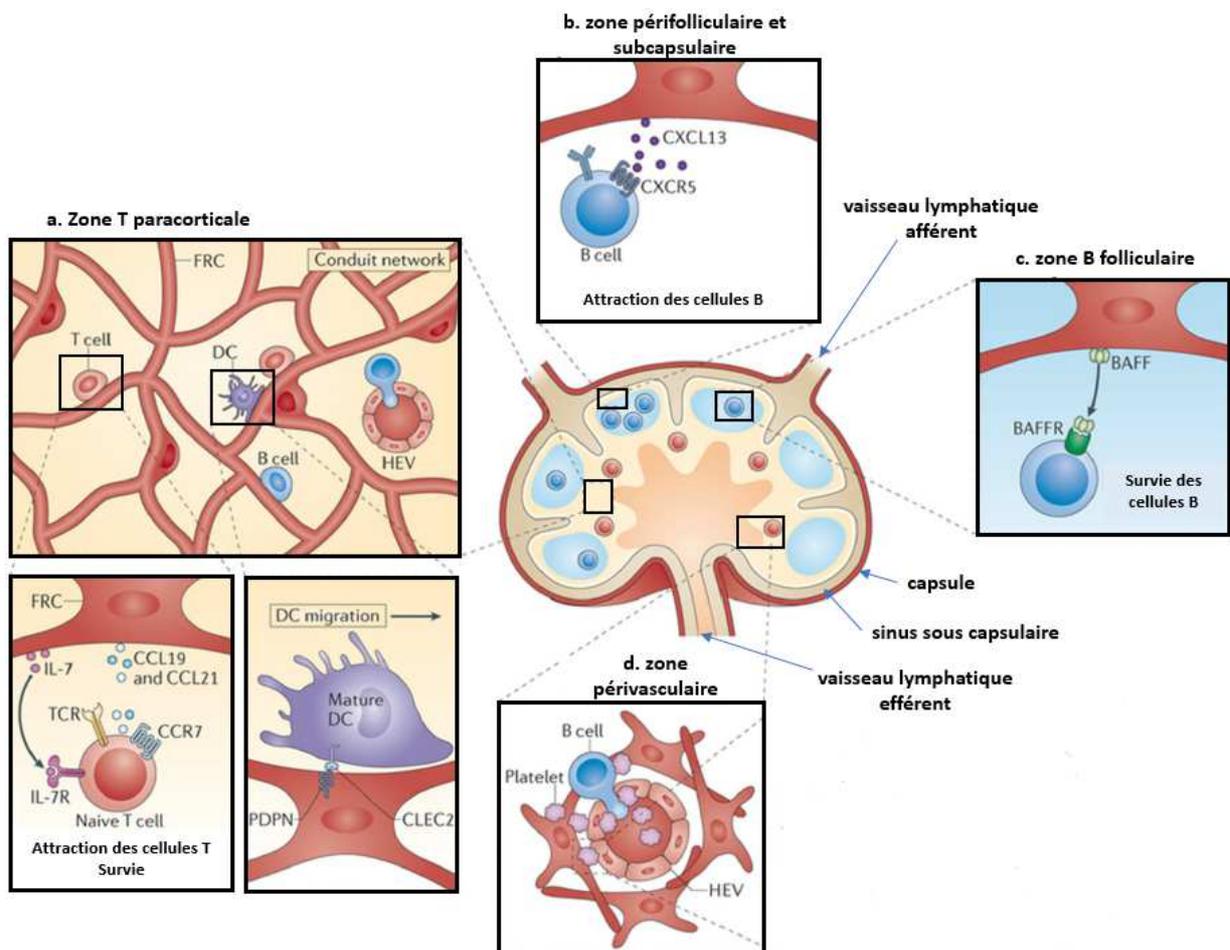


Figure 5 : Structure organisation du ganglion lymphatique.

Le ganglion est composé d'une zone T paracorticale (a), d'une zone périfolliculaire et B folliculaire (b et c) et d'une zone périvasculaire riche en HEVs (d). HEV : *High Endothelial Venule* ; DC : *Dendritic cell* ; FRC : *Fibroblastic reticular cell*. Adaptée de (Fletcher et al., 2015)

1.6 Rôle des chimiokines dans le trafic des lymphocytes

La migration des LB, des LT et des DCs dans les OL secondaires est orchestrée par des chimiokines **(Figure 5)** :

- CCL19 et CCL21 exprimées dans la zone T par les FRCs guident les LT et les DCs, via le récepteur aux chimiokines CCR7, dans le paracortex.
- CXCL13, constitutivement exprimée par les FDC, est requise pour le recrutement des LB et des T_{FH} qui expriment le récepteur aux chimiokines CXCR5. Après leur entrée dans le ganglion, ces cellules vont ainsi pouvoir se positionner dans les follicules B.

Les cellules stromales produisent également de l'IL-7 et BAFF (*B cell activating factor*) permettant la survie des cellules T naïves et des cellules B.

Les LB et LT migrent activement jusqu'à rencontrer l'antigène dont ils sont spécifiques. Si après une période de 12 à 18h pour les LT et de 24h pour les LB (Cyster, 2005), la recherche est infructueuse, les lymphocytes quittent le ganglion et recirculent dans l'organisme. Pour ce faire, ils utilisent la vascularisation. Le temps passé dans la circulation avant de pénétrer dans un autre organe lymphoïde est inférieur à une demi-heure (Pabst, 1988).

1.7 Rôle de BAFF et du BCR dans la maturation et la survie des lymphocytes B

Le facteur soluble BAFF appartenant à la superfamille du facteur nécrosant les tumeurs (TNF) est un facteur de survie essentiel, permettant la maturation des LB transitionnels et leur persistance à la périphérie. Les souris déficientes pour BAFF ont un développement lymphocytaire bloqué au stade T1 et présentent une perte quasi complète des B folliculaires (Fo) et des B de la zone marginale (MZ) (Schiemann et al., 2001). L'espérance de vie des cellules B matures est également dépendante de l'exposition du BCR à un antigène. Les cellules B matures non stimulées ne pourront vivre que de quelques jours à quelques semaines avant de mourir par apoptose (Clark and Ledbetter, 1994).

Le récepteur de BAFF et le BCR sont donc deux éléments clés et ils ont un rôle complémentaire dans la survie et l'homéostasie des LB. En effet une délétion conditionnelle du BCR, malgré un taux normal de BAFF et l'expression de son récepteur, mène à la mort de la majorité des cellules B. De façon similaire, des souris avec des mutations dans le gène codant pour le récepteur de BAFF (BAFF-R) ou une déficience en BAFF ou encore lorsqu'on traite les souris avec des antagonistes de BAFF, voient leur nombre de LB diminuer, malgré un répertoire correct du BCR (Cancro, 2009).

1.8 Les sous-populations de lymphocytes B

1.8.1 Les lymphocytes B1

Les lymphocytes B1 sont générés dans le foie fœtal, ils sont localisés principalement dans les cavités péritonéales et pleurales (Hayakawa et al., 1985). Les lymphocytes B1 jouent un rôle très important dans l'immunité naturelle indépendante des LT (Fagarasan and Honjo, 2000), ce sont les principaux producteurs d'IgM naturelles impliquées dans la protection rapide contre les infections bactériennes. Ils sont très sensibles aux stimulations par le LPS et ils participent également aux réponses contre les polysaccharides des bactéries encapsulées. Les cellules B1 sont produites très tôt dans l'ontogénèse (Montecino-Rodriguez et al., 2006) et elles ont la capacité de s'auto-renouveler. Certaines de ces cellules sont caractérisées par l'expression du récepteur de surface CD5 et les B1 peuvent donc être divisées en 2 sous-catégories : les cellules B-1a (CD5+) et les cellules B-1b (CD5-) (Baumgarth et al., 2005).

1.8.2 Les lymphocytes B2

Les lymphocytes B2 se développent à partir des LB transitionnels (T2) issus de progéniteurs B de la moelle osseuse. Seul 10 à 30% des cellules transitionnelles pourront se différencier en cellules B périphériques matures (Meffre et al., 2000).

La maturation en LB Fo est induite par un signal fort du BCR alors qu'un signal faible du BCR permet l'expression de NOTCH2 qui oriente la maturation des cellules B en LB MZ (Hoffman et al., 2016).

➤ Les lymphocytes B de la zone marginale (LB MZ)

Les LB MZ, situés entre le sinus marginal et la pulpe rouge de la rate, sont la première ligne de défense contre les Ag présents dans le sang (Song and Cerny, 2003). C'est une population hétérogène, composée de cellules B naïves et de cellules B mémoires, capables de se différencier rapidement en plasmocytes extrafolliculaires de courte durée de vie et de produire des Ig indépendamment des cellules T (Martin et al., 2001; Zandvoort and Timens, 2002) (**Figure 6**). Les LB mémoires de la zone marginale peuvent également répondre par des mécanismes dépendants des cellules T (Song and Cerny, 2003). La zone marginale atteint un effectif significatif de cellules B vers l'âge de 2 ans chez l'homme et chez les rongeurs, 2 à 3 semaines après leur naissance. De plus, les LB MZ font des allers-retours entre la zone marginale et les follicules dans un processus qui dépend, respectivement, de CXCR5 et de S1PR1 (shingosine-1-phosphate Receptor-1) et qui permettra de transférer les Ag sanguins aux FDCs (Batista and Harwood, 2009).

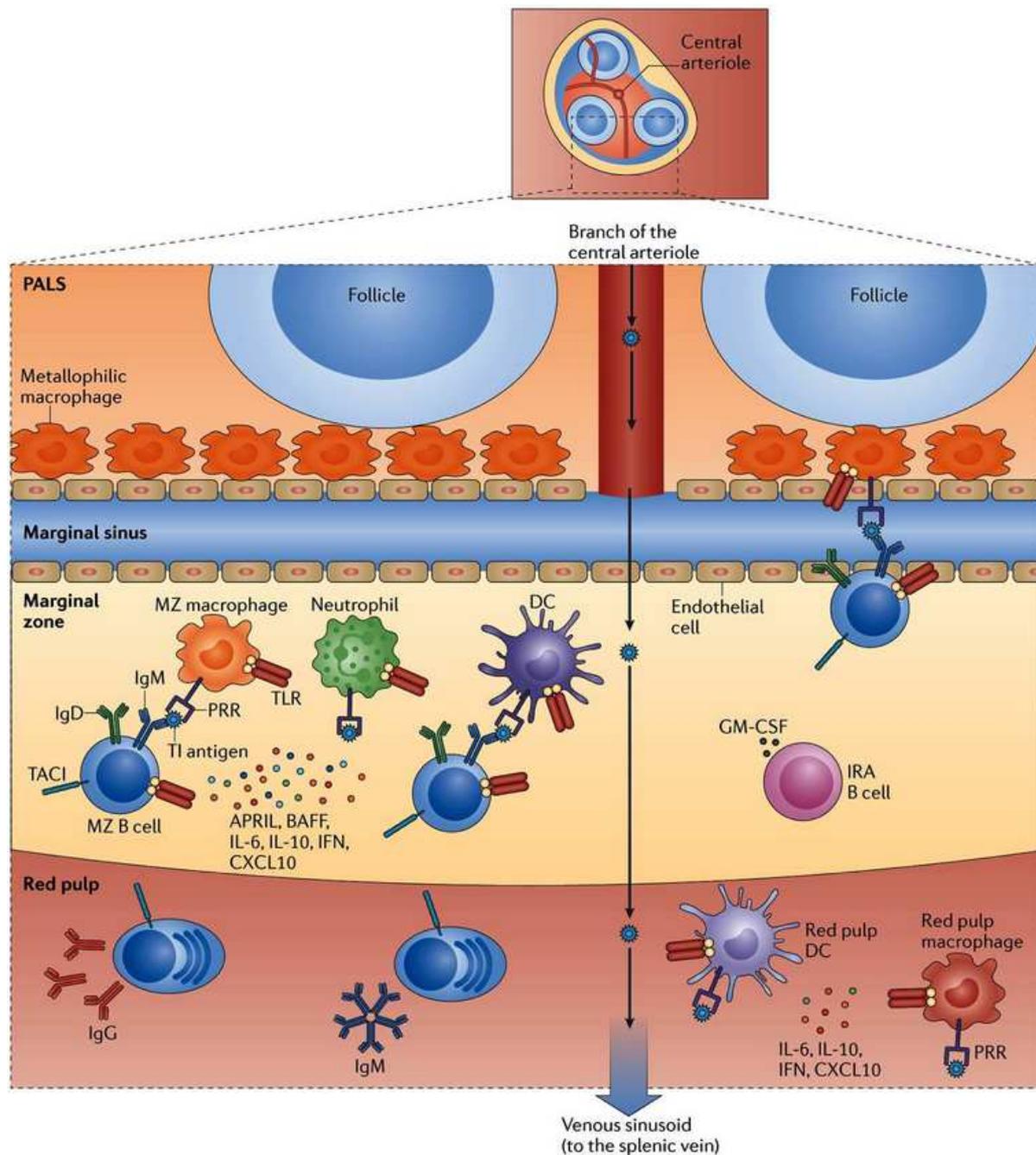


Figure 6 : Schéma représentatif des interactions cellulaires des LB MZ lors d'une réponse T-indépendante chez la souris.

Les antigènes T-indépendants sont capturés par les macrophages métallophiles et les macrophages de la zone marginale après leur entrée via le sinus marginal. Les LB MZ peuvent entrer en contact avec des Ag libres ou complexés avec des Ig, ou liés à une cellule présentatrice d'Ag. Les cellules dendritiques immatures sont capables de lier des bactéries ou des virus introduits dans le sang et de les délivrer dans la zone marginale où ils susciteront une réponse Ac rapide. Les LB MZ sont stimulés via l'interaction antigène/BCR, les récepteurs Toll-like et TACI. TACI délivrent des signaux qui induisent la recombinaison de classe et la production d'anticorps suite à l'activation par ses ligands BAFF et/ou APRIL (*α proliferation-inducing ligand*) qui sont produits notamment par les neutrophiles activés dans la MZ. Les DCs de la pulpe rouge et les macrophages sécrètent aussi les interleukines-6 et 10 (IL-6 et IL-10), de l'interféron de type I (IFN) et la chimiokine (CXCL10), qui pourraient coopérer avec BAFF et APRIL pour promouvoir la différenciation et la survie des plasmablastes IgM ou IgG. D'après (Cerutti et al., 2013).

➤ Les lymphocytes B folliculaires (LB Fo)

Les LB Fo qui résident dans la rate et les ganglions lymphatiques représentent la grande majorité des cellules B matures. Ce sont les LB majoritairement activés lors d'une immunisation T-dépendante et sont responsables de la génération d'IgG de haute affinité et de longue durée de vie, critiques pour la protection au long cours contre les infections et pour la vaccination (Hoffman et al., 2016). En effet, ce sont principalement les LB Fo activés qui forment les centres germinatifs (GC). Dans ces structures, ils prolifèrent rapidement et subissent des hypermutations somatiques permettant d'augmenter l'affinité de leur BCR pour l'Ag. Les LB les plus affins pourront se différencier en LB mémoires ou en plasmocytes. La réponse des LB folliculaires nécessite plus de 7 jours avant de produire des titres élevés d'Ac de forte affinité, cela est dû à la mise en place des CG et à la sélection des clones B de haute affinité.

1.9 La réponse B thymo-indépendante

Les souris athymiques sont capables de développer une réponse Ac face à des Ag non protéiques sans l'aide des cellules T. Ces Ag et la réponse qu'ils suscitent sont qualifiés de thymus- ou T-indépendant (TI). Il existe 2 types d'Ag T-indépendant caractérisés chez les souris CBA/N, kinase Btk-déficiente : les Ag ne donnant pas de réponse chez ces souris ont été nommés « TI de type 2 » (TI-2) tandis que ceux qui suscitaient une réponse, en l'absence de Btk, ont été désignés comme « TI de type 1 » (TI-1) (Vos et al., 2000).

1.9.1 Les antigènes de type 1

Les antigènes de type 1 peuvent activer la prolifération des LB indépendamment de leur spécificité antigénique, on parle d'activation polyclonale (Peng, 2005). Le signal d'activation est transmis aux cellules via des Toll-like Receptors (TLRs) exprimés à leur surface ou intracellulairement. Les TLRs sont spécifiques de produits microbiens comme les lipopeptides (TLR2), le lipopolysaccharide (LPS) (TLR4), l'ADN microbien CpG (TLR9), l'ARN viral (TLR7) et certaines protéines d'enveloppe virale (Bekeredjian-Ding and Jegou, 2009). Des expériences de stimulation de splénocytes *in vitro* et *in vivo* avec les conjugués haptène-LPS et protéine-CpG démontrent un engagement synergique des BCRs et des LTRs afin d'obtenir une réponse Ac optimale (Minguet et al., 2008).

1.9.2 Les antigènes de type 2

Les antigènes de type 2 n'ont pas la capacité intrinsèque d'activer les LB. Ce sont typiquement des Ag multivalents qui agissent sur les LB, spécifiquement, par le pontage ou « cross-linking » de plusieurs

BCRs (10 à 20 molécules d'Ig membranaire) délivrant ainsi un signal prolongé transmis via Btk (Mond et al., 1995). La réponse TI-2 peut se développer en réponse à des déterminants sucrés répétitifs tels que les polysaccharides présents à la surface des bactéries encapsulées telles que *Streptococcus pneumoniae* ou en réponse à des motifs hautement répétés trouvés sur les capsules virales. (García de Vinuesa et al., 1999). Les Ag TI-2 engagent des réponses extrafolliculaires avec une formation de centres germinatifs mais qui ont été reportés comme non-productifs (de Vinuesa et al., 2000).

La réponse immune engendrée est plus rapide que la réponse T-dépendante (Martin et al., 2001) en effet les LB naïfs rencontrant ces types d'Ag prolifèrent rapidement et se différencient aussi rapidement en cellules sécrétrices d'Ac. Les PCs générés au cours de cette réponse sont cependant de courte vie et sécrètent essentiellement des Ac de type IgM ayant une faible affinité pour l'Ag. Une petite population de ces PCs est néanmoins aussi capable de produire des IgG (Elgueta et al., 2010).

1.10 La réponse B thymo-dépendante

Les souris nudes (sans thymus) sont incapables de monter une réponse anticorps T-dépendante du fait de l'absence de cellules T nécessaires à l'activation et à la prolifération des cellules B. La réponse immune vis-à-vis de protéines antigéniques nécessite donc la coopération des cellules T auxiliaires CD4⁺ encore appelées T Helper (T_H). La **figure 8** à la fin de la section 1.10 récapitule toutes les interactions de la réponse B thymo-dépendante.

1.10.1 De l'initiation de la réaction du centre germinatif (CG) à la formation d'un CG mature

Comme nous l'avons vu précédemment, les LT rejoignent la région paracorticale du ganglion lymphatique via les HEV (sang) ou les vaisseaux lymphatiques afférents (tissus périphériques) en réponse aux chimiokines spécifiques du récepteur CCR7 exprimé par les LT, qui sont CCL19 et CCL21.

Pour être présenté à une cellule T naïve, l'Ag doit être apprêté par la CPA afin de permettre l'exposition membranaire de peptides antigéniques dans les sillons de présentation des molécules CMH de classe II. Les LT naïfs se fixent de manière transitoire et aléatoire sur chaque CPA qu'ils rencontrent afin de tester un grand nombre de complexes CMH-peptides. L'activation d'un LT_H par l'intermédiaire de son TCR (*T cell receptor*) couplé à l'engagement de la molécule de costimulation ICOS (*Inducible T cell COStimulateur*), induit l'expression de Bcl-6 et consécutivement celle de CXCR5 ce qui entraîne sa polarisation en pré-T_{FH}. La réduction de l'expression de CCR7 lui permet de répondre à l'attraction

exercée par CXCL13 sécrétée dans la zone folliculaire. Bcl6 a été identifié en 2009 comme le facteur de transcription clé dans le processus de différenciation des T_{FH} (Nurieva et al., 2009). Ce facteur promeut l'expression transcriptionnelle de CXCR5, PD-1, SAP, ICOS et CD40L.

Lorsque l'Ag est reconnu spécifiquement par le BCR, le complexe immunitaire est internalisé dans des vésicules où les protéines antigéniques sont clivées sous forme de peptides. Ces peptides peuvent être liés par les protéines du CMH puis présentés à la surface du LB sous la forme d'un complexe CMHII-peptide. Cette activation B spécifique de l'Ag s'accompagne d'une augmentation de CCR7, qui va permettre au LB de migrer vers l'interface entre les zones B et T. Les cellules B activées vont exprimer un autre récepteur de migration qui est EB12 qui va faciliter la distribution des cellules au niveau de la frontière T-B (Linterman et al., 2012).

La reconnaissance spécifique du complexe CMHII-peptide à la surface de la cellule B conduit la cellule pré-T_{FH}, à exprimer un panel unique de molécules effectrices telles que : CD40L qui assure la prolifération et la survie des cellules B, ICOS qui interagit avec ICOSL et facilite l'expression de l'IL21 requise pour l'initiation et la maintenance de la différenciation en cellules T_{FH} et enfin SAP, une petite protéine adaptatrice des récepteurs de la famille des SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*) comprenant 4 membres : SLAM (CD150), CD84, Ly108 et Ly9, non seulement cruciale pour la formation des conjugués T-B mais aussi pour l'induction de la production de l'IL-4 par les cellules T_{FH}. L'IL-4 exerce une activité anti-apoptotique sur les cellules B. Cette activité est primordiale au sein des CG car les B du CG sont extrêmement susceptibles à l'apoptose étant donné que ces cellules expriment de faibles niveaux de Bcl2 (facteur anti-apoptotique) et de forts niveaux de Fas (facteur pro-apoptotique) (Crotty, 2011).

Après prolifération des cellules B, celles-ci devront faire face à 2 choix, la différenciation plasmocytaire extra-folliculaire ou la formation d'un CG. Les CGs apparaissent au 7^e jour au cours de la réponse primaire (**Figure 7**) et dès le 36^e heure après réinjection de l'Ag qui correspond à la réponse secondaire. En l'absence de restimulation, la taille de follicules diminue dès le 15^e jour pour disparaître à la 3^e semaine.

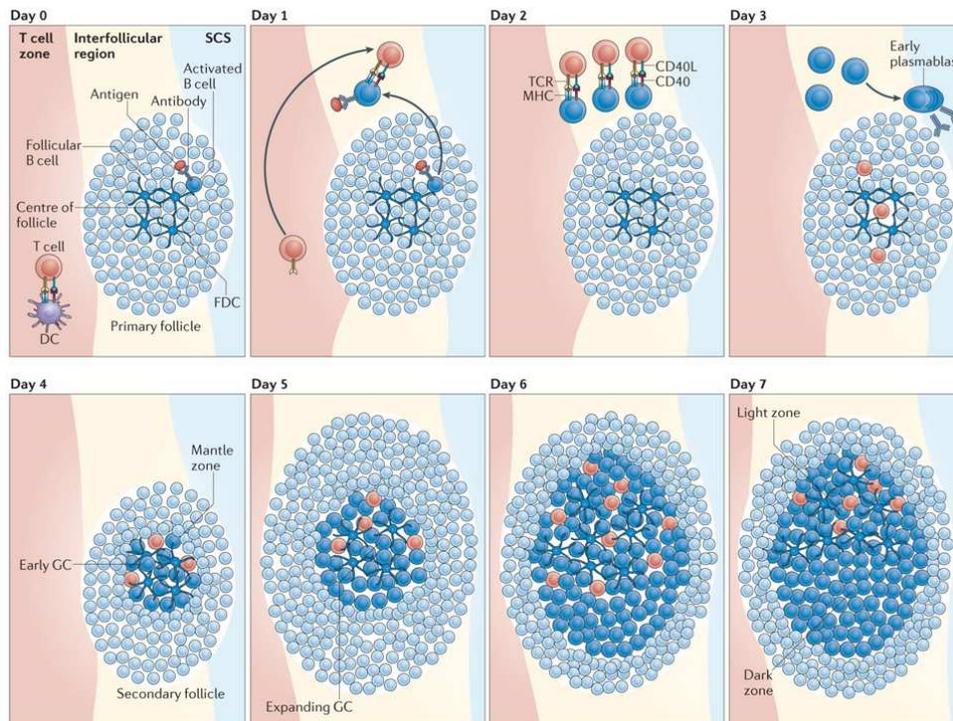


Figure 7 : Dynamique des cellules B dans la réaction du centre germinatif

A jour 0, les cellules B et T sont activées suite à la reconnaissance d'un Ag spécifique, respectivement dans le follicule primaire et dans la zone T. A jour 1, les cellules B et T activées migrent dans la région interfolliculaire et commencent à interagir. A jour 2, les cellules B et T forment des interactions stables, menant à la complète activation des cellules B. C'est également à ce moment-là que les cellules T vont acquérir les caractéristiques phénotypiques des T_{FH} exprimant le récepteur aux chimiokines de type 5 (CXCR5), la protéine de mort cellulaire programmée (PD1) et le marqueur d'activation (GL7). A jour 3, les cellules T_{FH} migrent vers le follicule. Certaines cellules B activées vont se différencier en plasmablastes qui vont migrer vers la région adjacente au sinus sous-capsulaire (SCS). A jour 4, les cellules B se trouvent au cœur du follicule caractérisé par un réseau de FDCs et commencent à proliférer, repoussant en périphérie les petits LB des follicules primaires qui ne sont pas spécifiques de l'Ag constituant ainsi la zone de manteau. A ce stade, cette structure est appelée follicule secondaire. Les deux jours suivants, les CG s'expandent pour former à jour 7, un CG mature polarisé en deux zones, la zone sombre et la zone claire. D'après (De Silva and Klein, 2015).

1.10.2 La réaction extra-folliculaire

La diminution de l'expression de CXCR5 et de CCR7 et l'augmentation de CXCR4 favorise la mise en place d'une réponse extrafolliculaire qui se traduit par la génération de PCs de courte durée de vie (3 à 5 jours) (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005). Ces PCs aussi appelés plasmablastes, ont conservé leur capacité de division et de migration et ils se trouvent principalement dans la pulpe rouge de la rate et dans la région médullaire des ganglions. Sous l'effet des cytokines, ils peuvent subir la commutation isotypique mais peu d'hypermutations somatiques (MacLennan et al., 2003), ce qui explique la faible affinité des Ac sécrétés. Ces cellules produites lors de la réponse précoce Ag T-dépendante assurent une réponse humorale rapide de première ligne de défense.

1.10.3 La réaction du centre germinatif

Les CG sont des structures spécialisées qui sont formées dans les régions folliculaires en réponse à une immunisation ou à l'exposition à un pathogène. Au sein de ces structures, les LB circulent à travers 2 régions, la zone sombre proximale de la zone T et la zone claire distale de la zone T. (Yu and Lin, 2016).

Dans la zone sombre les LB se divisent très rapidement et prennent le nom de centroblastes (CXCR4^{hi}CD83^{lo}CD86^{lo}). Ces cellules expriment très fortement l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) qui intervient à la fois dans les processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique (SHM). Les SHM correspondent à l'introduction de mutations dans le but d'augmenter l'affinité de l'Ig pour l'Ag. Ces mutations sont ciblées sur la région variable des gènes des Ig, composée des régions *frameworks* ou séquences de base aux résidus invariants et des régions hypervariables (CDR) aux résidus hautement mutés déterminants la complémentarité avec les épitopes de l'Ag.

Dans la région claire, les LB sont appelés centrocytes (CXCR4^{lo}CD83^{hi}CD86^{hi}). Ces cellules sont sorties du cycle cellulaire et sont de plus petites tailles. Dans un premier temps, elles vont fixer et phagocyter l'Ag présenté par les FDCs. Les FDCs sont des cellules stromales non hématopoïétiques, elles fixent l'Ag sous forme native combiné à des Ac spécifiques. Plus précisément, les complexes Ag-Ac se fixent sur les récepteurs des Fc γ de la FDC, l'Ag peut ainsi être présenté pendant de longues périodes (DeFranco, 2016). Les centrocytes dont le BCR a la plus forte affinité, ont le plus de chance de se fixer sur les FDCs. Dans un second temps, les centrocytes coopèrent avec les cellules T_{FH} spécifiques de l'Ag, qui en retour leur fournissent des signaux de survie notamment via Mcl1, un membre de la famille de Bcl2, qui est le principal régulateur anti-apoptique des cellules B activées (Vikstrom et al., 2010). Les différentes interactions entre les cellules T_{FH} et B sont présentées dans le carré vert de la **figure 8**, en plus de l'interaction MHCII – TCR, des régulations vont se faire par les interactions récepteur–ligand tels que B7-CD28, CD40-CD40L, ICOS-ICOSL et PD-1-PDL-1 ainsi que par des interactions cytokiniques incluant l'IL-21. PD-1 est un récepteur inhibiteur des T_{FH} du CG, qui prévient un excès de prolifération des cellules T dans le CG dû en partie à une forte et constante stimulation du TCR.

L'affinité du BCR pour l'Ag influence la capture de l'Ag et sa présentation par le LB via le CMHII. C'est cette capacité de présentation antigénique aux LT_{FH} qui a été montré comme étant le processus majoritaire et limitant de sélection des LB ayant des variants de haute affinité dans les CG (Victoria and Nussenzweig, 2012). En fonction de l'affinité du BCR pour l'Ag et de sa capacité de présentation, plusieurs issues sont possibles pour les centrocytes :

- L'**apoptose** en cas de récepteur devenu auto-immun ou de trop faible affinité pour l'Ag. Les centrocytes sont dépourvus de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl2 (*B-cell*

lymphoma 2) par contre ils expriment plusieurs molécules pro-apoptotiques telles que Fas qui permettent l'élimination rapidement de ces cellules (Klein and Dalla-Favera, 2008).

- La **réentrée dans la zone sombre** qui induit un nouveau cycle de prolifération et de diversification du BCR. En effet les cellules B de CG qui présentent une affinité intermédiaire après chaque round de sélection auprès des T_{FH} peuvent retourner dans la zone sombre (De Silva and Klein, 2015). La migration d'une zone à l'autre est permise par des gradients de concentration de CXCL12 et CXCL13. Les blastes qui expriment le récepteur CXCR4 migrent vers CXCL12 produite dans la zone sombre tandis que les centrocytes qui expriment plus CXCR5 sont sensibles au gradient de CXCL13 produit dans la zone claire (Klein and Dalla-Favera, 2008).
- La **différenciation en LB mémoire**. Les LB mémoires peuvent persister pendant de longues périodes, ils sont très sensibles à de faibles doses d'Ag, ils prolifèrent rapidement et ils peuvent se différencier en cellules sécrétrices d'Ac produisant de grandes quantités d'Ac de forte affinité lors d'une réponse secondaire (Mesin et al., 2016).
- La **différenciation en PC** pour les cellules ayant une forte capacité de présentation antigénique. Une partie des PCs reste dans les OL secondaires mais la majeure partie rejoint la MO où ils pourront s'établir dans des niches médullaires recevant des signaux de survie leur permettant de devenir des PCs à longue durée de vie. Ils pourront ainsi participer à la mémoire immunitaire humorale par la sécrétion prolongée d'Ac de haute affinité (Nutt et al., 2015; Radbruch et al., 2006).

1.10.4 La commutation de classe

Indépendamment du choix de différenciation des LB en PCs à courte durée de vie ou en LB du CG, le contact entre un LB activé et une cellule T_H de même spécificité antigénique aboutit au déclenchement de la commutation de classe (ou commutation isotypique) du LB via la signalisation induite par CD40-CD40L. Toutefois le GC, reste le site prédilection des commutations (Crotty, 2011). De plus, la signalisation par les TLR, TACI et certaines cytokines vont également induire la commutation de classe importante pour le contrôle des pathogènes de différentes classes.

Ce phénomène correspond à la substitution de la chaîne μ de l'IgM par celle d'un autre isotype IgG, IgA ou IgE. Ce mécanisme est initié par une enzyme, AID (*activation-induced cytidine deaminase*) qui conduit à la formation de cassure double-brin de l'ADN dans les régions *switch* (régions répétitives d'une centaine de paires de bases) situées entre le gène J et le gène C codant pour la chaîne lourde voulue. L'IL-4 permet la recombinaison en IgG1 et en IgE à la fois chez l'homme et la souris, l'IL-21 induit le switch IgG3, IgA et IgG1 chez l'homme et IgG1 chez la souris. L'IFN- γ et l'IL-17 sont également exprimées par les T_{FH} du CG de façon contexte dépendant et permettent le switch isotypique approprié en fonction

du pathogène. Le TGF- β inhibe la maturation et la prolifération des cellules B ainsi que la production d'IgM et d'IgG au profit de la production d'Ig de type IgA (Stavnezer and Kang, 2009).

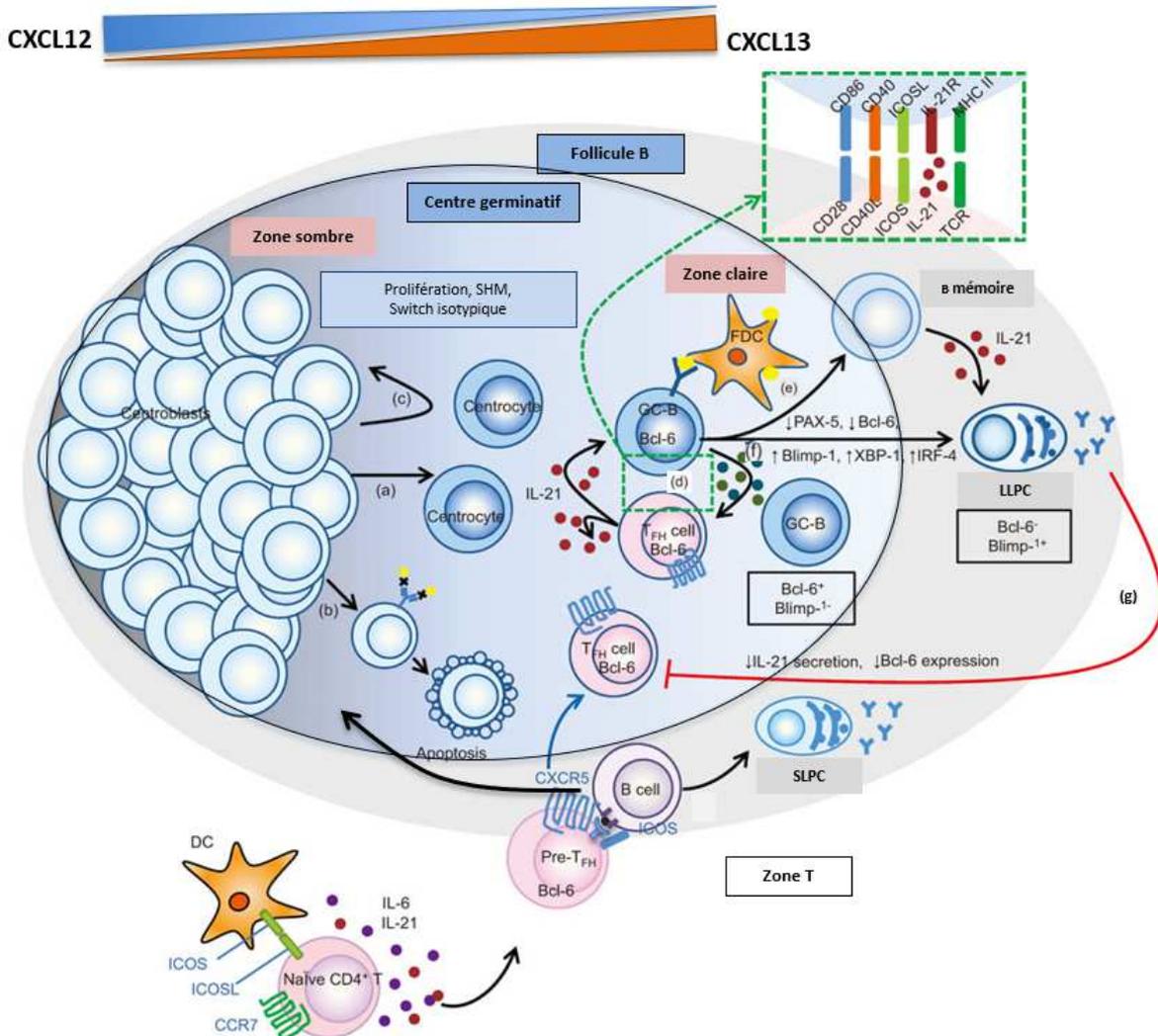


Figure 8 : Organisation et interactions cellulaires au sein du CG.

Dans la zone T, les cellules T CD4⁺ naïves sont activées suite à la reconnaissance du complexe MHCII-peptide sur les DCs et se développent en cellules pré-T_{FH}. Après l'interaction stable entre la cellule pré-T_{FH} et la cellule B, deux opportunités s'offrent à la cellule B : la voie extra-folliculaire lui permettant de se différencier en plasmocyte à courte durée de vie (SLPC) ou en cellule B mémoire indépendamment du centre germinatif, ou bien de participer à la réaction du centre germinatif. Dans la zone sombre, l'expansion clonale de la cellule B spécifique de l'Ag est accompagnée par la diversification de son BCR à travers des hypermutations somatiques (SHM). La cellule B qui sort du cycle cellulaire va migrer vers la zone claire (a), où la sélection d'affinité se fera grâce aux interactions avec les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les cellules T folliculaires helpers (T_{FH}) (d). Les clones avec un BCR de faible affinité pour l'Ag ou devenu auto-immun sont éliminés par apoptose (b). La cellule B affine peut regagner la zone sombre pour de nouveaux rounds de prolifération et de SMH afin d'augmenter encore l'affinité du BCR pour son Ag (c). Alternativement certains B de GC peuvent se différencier en B mémoires (e) ou en plasmocytes à longue durée de vie (LLPC) exprimant très fortement Blimp-1 (f). L'IL21 sécrétée par les T_{FH} est un facteur de survie des B de GC mais peut également permettre le développement des T_{FH} de manière autocrine. Les PCs exercent un effet négatif sur la régulation des T_{FH} en inhibant la sécrétion d'IL-21 et en diminuant l'expression de Bcl6 (g). Adapté de (Deng et al., 2015).

2 Les plasmocytes

2.1 Les différents stades de développement des plasmocytes

Les plasmablastes sont les précurseurs des plasmocytes, ils présentent un potentiel migratoire et mitotique. Ce sont des cellules effectrices, capables de sécréter des Ac, de courte durée de vie et produites très rapidement dans le cadre d'une réponse immunitaire précoce. Quant aux plasmocytes, ils représentent le stade terminal de différenciation des cellules B, qui est un stade irréversible. A l'état quiescent, ils sont caractérisés par leur capacité à sécréter de grandes quantités d'Ac et ce sont des cellules de longue durée de vie (Nutt et al., 2015).

Seul un nombre limité de plasmablastes formés dans le contexte d'une réponse immune dépendante de la formation d'un CG deviendront des plasmocytes de longue durée de vie (LLPC, *long-lived plasma cell*). Les plasmocytes de courte durée de vie (SLPC, *short-lived plasma cells*) sont issus soit de la différenciation des cellules B de la zone marginale et sécrètent essentiellement des IgM, soit de la réponse extra-folliculaire auquel cas les Ac sécrétés sont d'affinité modérée.

Les différents stades de développement des PCs sont caractérisés par l'expression différentielle de marqueurs de surface et de facteurs de transcription (**Tableau 1**). De plus, leur différenciation et leur survie dépendent également du miRNA-148a, qui est le plus abondant microARN présent dans les PCs humains et murins (Porstner et al., 2015).

Characteristic	Activated B cell	Plasmablast	Short-lived plasma cell	Long-lived plasma cell
Lifespan	Days	Days	Days	Months to years
Proliferation	Proliferating	Proliferating	Non-proliferating	Non-proliferating
<i>Surface marker expression</i>				
CD20	+++	+/-	-	-
CD22	+++	+/-	-	-
MHC-class II	+++	+++	+	+
CD19	+++	++	+	+/-
CD38, CD138	-	++	+++	+++
CXCR4	-	+	+	+
<i>Transcription factor expression</i>				
Blimp1	-	++	++	+++
IRF4	+	+++	+++	+++
XBP-1	+	++	+++	+++

Tableau 1 : Caractéristiques des différents stades du développement plasmocytaire. -, négatif ; +, faible ; ++, intermédiaire ; +++, fort. D'après (Hiepe and Radbruch, 2016)

2.2 La régulation de la différenciation plasmocytaire

La différenciation plasmocytaire nécessite l'arrêt du programme transcriptionnel des cellules B afin d'établir les fonctions de sécrétion d'anticorps et de survie à long terme. Ce processus est régulé par la balance entre plusieurs facteurs de transcription : Blimp1, Irf4 et Xbp1 d'un côté qui promeuvent la différenciation plasmocytaire et Pax5, Bcl-6 et Bach2 de l'autre (**Figure 9**).

Pax5 est aussi connu sous le nom de BSAP (*B cell specific activator protein*) et est essentiel pour induire le développement de la lignée B mais également pour assurer son maintien (Cerutti et al., 2013). Pax5 régule positivement la prolifération des cellules B matures et bloque la différenciation plasmocytaire en réprimant l'expression de gènes tels que *Xbp1*.

Bach2 est fortement exprimé à partir du stade pro-B jusqu'au stade B mature, c'est un répresseur de Blimp1. C'est aussi un régulateur des processus de recombinaison de classe et d'hypermutations somatiques. Les souris déficientes pour *Bach2* ne montent pas de réponse IgG après immunisation avec un Ag T-dépendant ou indépendant (Ochiai et al., 2006).

Le répresseur **Bcl-6** est fortement exprimé par les B du CG et bloque la transcription du gène *Prdm1* qui code pour la protéine Blimp-1. Bcl-6 contrôle la différenciation des cellules B du GC en régulant les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, ainsi que ceux impliqués dans la réponse de dommage à l'ADN, il permet également leur prolifération et leur maintenance (Crotty, 2011). Après stimulation du BCR, Bcl-6 est phosphorylé par les MAPK conduisant à sa dégradation par la voie ubiquitine-protéasome faisant pencher la balance transcriptionnelle en faveur de la différenciation plasmocytaire (Todd et al., 2008).

Irf4 est alors fortement exprimé favorisant l'expression de Blimp1 (Sciammas et al., 2006) et la répression du marqueur d'identité B, Pax5, ce qui mènera progressivement à l'arrêt du cycle cellulaire. Blimp1 est aussi impliqué dans l'activation de Irf4 formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive.

Blimp1 est nécessaire au développement des PCs, à leur sécrétion d'Ac ainsi qu'à leur survie dans la moelle osseuse. L'augmentation d'expression de Blimp1 coïncide avec l'avancée de la cellule dans le processus de différenciation (Nutt et al., 2015). La transcription de son gène *Prdm1* est dépendante de STAT3 qui est induite par l'IL-21. En l'absence de STAT3, Blimp-1 n'est pas induite empêchant par le fait la différenciation plasmocytaire.

L'inhibition de Pax5 dans les cellules B va également permettre l'activation de **Xbp1**, un facteur de transcription crucial dans la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*, détaillée dans 2.4), qui est spécifiquement requise pour gérer la forte production des Ig par les PCs (Shaffer et al., 2004).

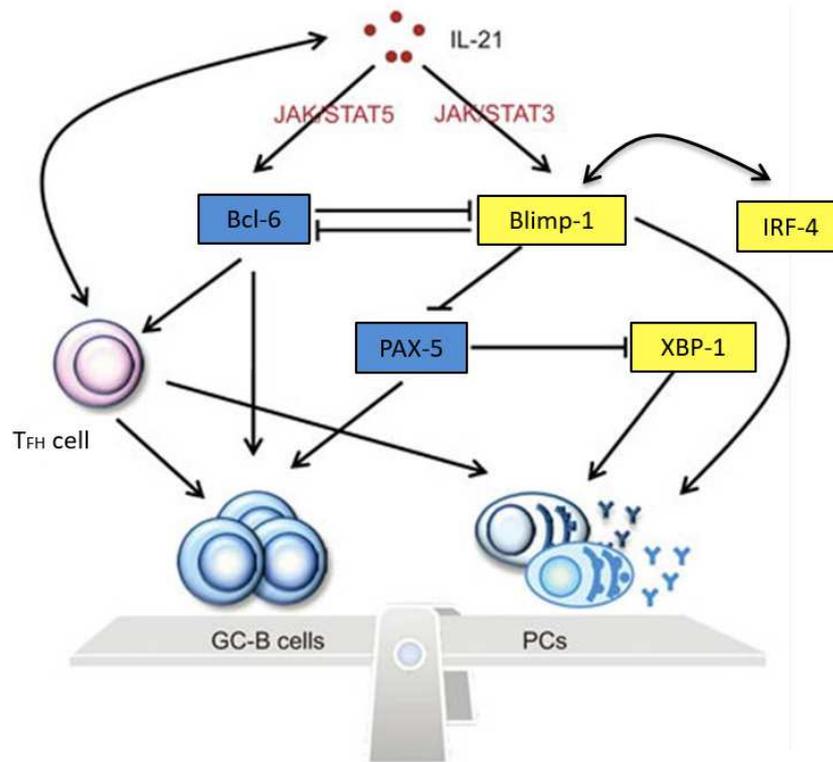


Figure 9 : Représentation schématique des différents facteurs impliqués dans la différenciation plasmocytaire.

L'IL-21 peut induire l'expression de Blimp-1 et de Bcl-6 selon l'activation de 2 facteurs de transcription STAT3 ou STAT5 qui se répriment mutuellement. Bcl-6 et Pax-5 sont très actifs dans les centres germinatifs, ils promeuvent la différenciation des cellules B du CG et répriment le développement plasmocytaire. A l'inverse, **Blimp-1** qui est le **master régulateur des PCs** et XBP-1 induisent la différenciation des cellules B en PCs. Une fois le choix de la différenciation fait, IRF-4 favorise l'expression de Blimp-1. En outre, l'IL-21 agit sur les cellules T_{FH} de manière autocrine permettant la régulation du développement des B du CG et la différenciation en PCs. Bcl-6 est un important facteur de transcription dans le développement des T_{FH}. Adapté de (Deng et al., 2015).

2.3 Les changements de morphologie cellulaire

La différenciation des LB en PCs se traduit également par un changement au niveau de la morphologie cellulaire. En effet les LB naïfs ou mémoires possèdent un RE qui n'est pas très développé. Suite à l'activation par un Ag, le LB doit procéder au réarrangement de son appareil sécrétoire afin de produire des milliers d'Ac (Kirk et al., 2010). Les PCs sont donc 2 à 3 fois plus volumineux et ils présentent un noyau décentré qui contient de l'hétérochromatine distribuée un peu comme « les rayons d'une roue d'un vélo » (Ribatti, 2017). Les images de microscopie électronique présentées dans la **figure 10** nous montre, à jour 7, une accumulation des membranes du RE associées à de très nombreux ribosomes, un Golgi à proximité du noyau ainsi que des mitochondries localisées entre les saccules du RE.

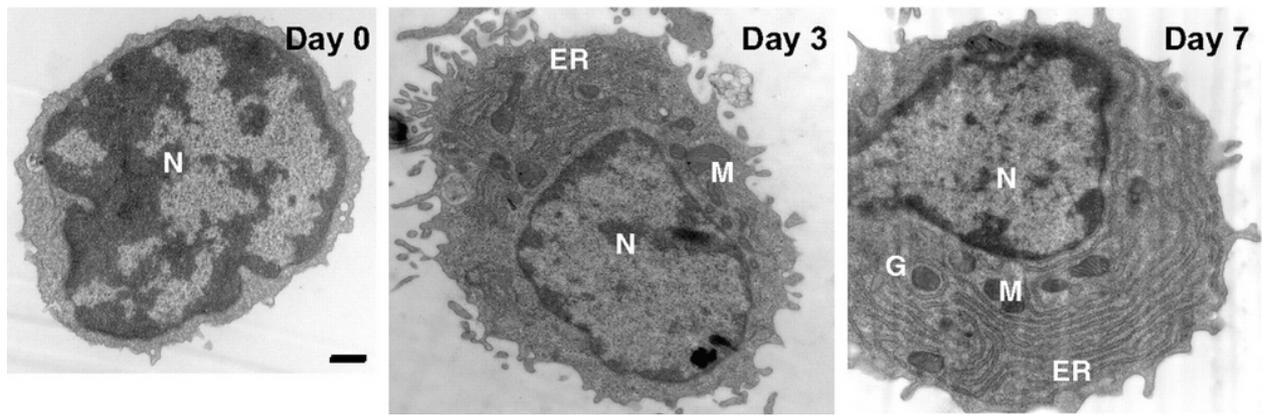


Figure 10 : Changements de morphologie cellulaire pendant la différenciation plasmocytaire.

Images de microscopie électronique d'une cellule B humaine CD20⁺ non stimulée (jour 0) et stimulée par un mélange d'Ag mitogéniques, aux jours 3 et 7. N, noyaux ; M, mitochondrie ; G, Golgi ; ER, réticulum endoplasmique. D'après (Kirk et al., 2010).

2.4 Le stress du RE et la réponse UPR

Les PCs sont capables de sécréter plus de 10 000 molécules d'Ig par seconde et par cellule ce qui, de manière inévitable, entraîne l'accumulation de protéines non ou mal repliées (Roth et al., 2014). Cette accumulation massive de protéines engendre un important stress du RE conduisant à une mort rapide des cellules, à moins qu'une réponse adaptative appelée UPR (*Unfolded protein response*) ne soit déclenchée. Son objectif est de rétablir la fonction physiologique du RE : en réduisant la synthèse globale des protéines pour limiter l'afflux de nouvelles protéines dans le RE et ainsi éviter la surcharge de cet organelle, en augmentant les capacités cellulaires de repliement des protéines néo-synthétisées via des protéines chaperonnes, ou encore en induisant l'activité de dégradation protéasomale via ERAD (dégradation associée au RE) pour dégrader plus activement les protéines incorrectement repliées.

Lorsque la situation de stress est trop intense ou de trop longue durée, la réponse UPR aboutit à l'apoptose. Gass *et al.* ont soumis l'hypothèse que dans le cas des PCs, l'UPR fonctionne non pas comme une réponse à un stress mais plutôt comme un mécanisme anticipatoire où l'augmentation de l'expression des protéines chaperonnes du RE, ainsi que l'induction du facteur de transcription Xbp-1 précèdent la synthèse des Ig (Gass et al., 2008). La protéine Bip (Binding Immunoglobulin Protein) aussi appelé GRP78 et HspA est la protéine chaperonne des Ig qui va permettre de stabiliser le domaine CH1 des chaînes lourdes des Ig, instables en l'absence des chaînes légères (Lee et al., 1999). L'UPR est donc indispensable à la survie des PCs.

La réponse UPR est constituée de trois voies de signalisation impliquant trois protéines transmembranaires **IRE1** (Inositol Requiring Enzyme 1), le facteur de transcription **ATF6** et la protéine

kinase **PERK** qui sont activées suite à la libération de la protéine chaperonne Bip se liant préférentiellement aux protéines à conformation anormale (**Figure 11**). S'il existe trois récepteurs du stress du RE, pendant la différenciation plasmocytaire, seule la voie UPR médiée par IRE1 est indispensable (Gass et al., 2008; Goldfinger et al., 2011), celle dépendante de PERK n'est pas requise. L'activation des cellules B en cellules sécrétrices d'anticorps est également indépendante d'ATF6 α (Aragon et al., 2012).

Après oligodimérisation et autophosphorylation, IRE1 acquiert une activité endoribonucléase permettant l'épissage de 26 nucléotides de l'ARNm codant XBP1, conduisant à un changement de son cadre de lecture et à la synthèse de sa forme plus active XBP1s (Yoshida et al., 2001). XBP1s est transloqué dans le noyau et se fixe sur les éléments de réponse au stress du RE (ERSE) induisant la transcription de gènes impliqués dans l'expansion du RE, dans l'augmentation de la capacité d'assemblage des protéines comme Bip, de leur glycosylation ainsi que dans l'augmentation des protéines impliquées dans l'adressage vers la sécrétion mais aussi la synthèse des composants du système de dégradation ERAD.

Un dysfonctionnement de la réponse UPR et un mauvais repliement des protéines, produites en trop grand nombre, pourraient participer au développement de l'auto-immunité (Todd et al., 2008).

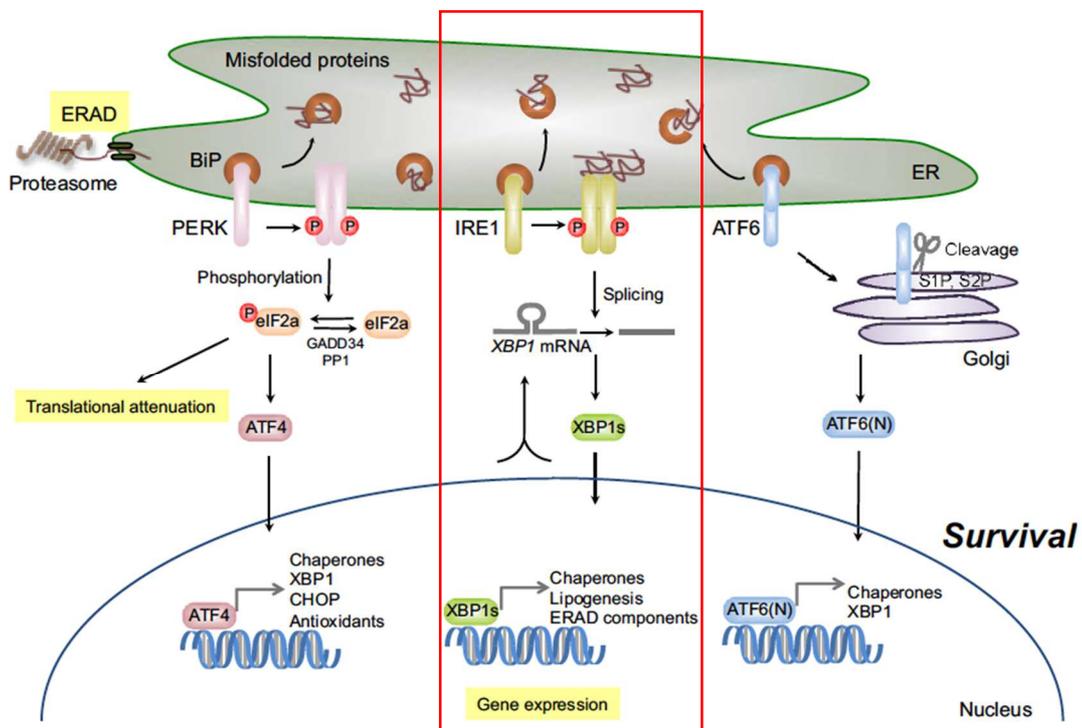


Figure 11 : Mécanisme de survie en condition de stress du RE.

Le stress du RE induit la signalisation UPR qui est médiée par trois protéines: PERK (*PKR-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) et IRE1 (*Inositol requis 1*). Dans le cas des PCs, c'est la voie médiée par IRE1 qui est principalement activée. D'après (Kadowaki and Nishitoh, 2013).

2.5 Rôle de l'autophagie et de mTOR dans la régulation de l'immunité

L'autophagie constitue un mécanisme adaptatif à une situation de stress, comme par exemple une déplétion en nutriments, qui aboutit à la dégradation d'une partie des protéines cytoplasmiques dans le but de produire de l'énergie ; de recycler les organites cellulaires défectueux ou d'éliminer des pathogènes. Dans un premier temps, une double membrane se constitue, le phagophore qui va s'allonger et séquestrer une partie du cytoplasme forment un autophagosome (**Figure 12**). Cette vacuole fusionne ensuite avec un lysosome faisant intervenir certaines protéines de la famille SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor*) pour former un autophagolysosome dans lequel le matériel séquestré est dégradé et recyclé (Nair et al., 2011). La protéine LC3 est une protéine essentielle à la formation des autophagosomes, elle reste ancrée dans la membrane grâce à sa conjugaison à la phosphatidyléthanolamine. La conversion de sa forme cytosolique LC3-I en forme conjuguée LC3-II indique l'induction du processus de l'autophagie.

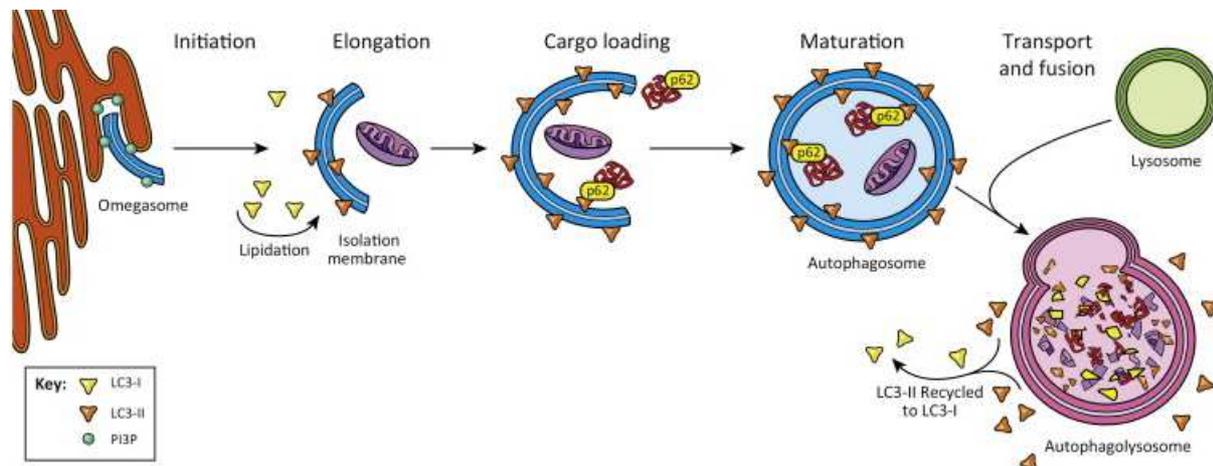


Figure 12 : Les différentes étapes de la macro-autophagie.

La première étape de l'autophagie est la formation d'une double membrane, le phagophore. Une fois formée, cette structure s'allonge afin d'isoler des composants du cytoplasme jusqu'à la fermeture de la vésicule, qui se nomme alors autophagosome. Ce dernier va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome. Le matériel séquestré sera alors dégradé par des enzymes lysosomales. Tirée de (Martin et al., 2015).

Il a été démontré que mTORC1 exerce un effet inhibiteur sur l'autophagie en bloquant non seulement le processus dès l'initiation de l'autophagie via la suppression du complexe ULK1, mais également à l'étape de dégradation via l'inhibition des fonctions lysosomales (Zhou et al., 2013).

Lorsque les conditions sont favorables, un niveau basal d'autophagie participe au bon maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette autophagie constitutive est particulièrement importante dans la survie des PCs. Les travaux de Pengo *et al.* ont montré que chez des souris déficientes pour la molécule Atg5 (*autophagy protein 5*), cruciale pour l'élongation de l'autophagosome, les PCs ont un RE beaucoup plus

large, un niveau de stress plus élevé qui conduit à une expression exacerbée de Blimp1 et à une augmentation de la production et de la sécrétion d'immunoglobulines (Pengo et al., 2013). Arnold *et al.* ont confirmé que l'autophagie joue un rôle majeur dans la survie des PCs. Ils ont généré des souris déficientes en Atg5 spécifiquement dans les LB, qu'ils ont ensuite croisé avec des souris pré-disposant à une autoimmunité systémique et ils ont montré que ces souris présentent au niveau biologique un niveau d'Ac IgG anti-ADN double brin beaucoup plus faible et au niveau clinique, moins de dépôts d'IgG dans leurs reins (Arnold et al., 2016).

La protéine mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase de la voie PI3K/AKT qui joue un rôle clé dans la régulation de l'autophagie, le métabolisme, la croissance et la survie (Balsat and Cornillon, 2011). Plusieurs stimuli, incluant l'état énergétique de la cellule avec la disponibilité en acides aminés, oxygène, glucose, facteurs de croissance et des signaux du système immunitaire, activent le complexe 1 de mTOR (mTORC1) qui à son tour active des programmes de l'anabolisme qui conduisent à la croissance cellulaire et à la biogénèse de ribosomes (Laplante and Sabatini, 2012).

Dans le système immunitaire, mTORC1 a été relié à la différenciation des cellules T, ainsi qu'aux mécanismes de tolérance, d'anergie et de migration mais aussi à la différenciation des cellules B et à la sécrétion d'Ig indépendamment de XBP1 (Benhamron et al., 2015). En 2016, Jones et *al* ont démontré que la délétion de RAPTOR (une protéine de régulation associée à mTOR) spécifiquement dans les cellules B, empêche la génération de PCs chez ces souris. Un traitement à la rapamycine (un inhibiteur de mTOR) récapitule les effets de la délétion de RAPTOR. Ces 2 stratégies mènent à l'ablation des PCs nouvellement générés dans la rate et la MO et cause la perte des CG existants entraînant un profond déclin des taux sériques en Ac spécifiques des Ag exogènes ou de l'ADN. Étonnamment, les auteurs ont montré que la fréquence des PCs à longue durée de vie de la MO ne sont pas affectés (Jones et al., 2016). Encore plus récemment, Ersching et *al* ont montré qu'une sélection positive des clones B par les T_{FH} dans la zone claire du CG, active mTORC1 qui promeut le programme anabolique permettant la prolifération des clones B dans la zone sombre du CG. En outre, le blocage de mTORC1 avant le début de la prolifération bloque l'expansion clonale. En revanche, lorsque la taille du clone a atteint son maximum, le blocage de mTOR a peu ou plus d'effet. La maturation d'affinité dépend aussi de la régulation de mTORC1 (Ersching et al., 2017).

Il a également été démontré que l'activité de mTOR est régulée par le facteur de transcription Blimp1 en augmentant l'expression de CD98 (Tellier et al., 2016) dont l'une des fonctions principales est l'import d'acides aminés (aa) essentiels notamment la leucine en échange de glutamine. Cette fonction de nutrition semble contribuer à la survie et à la croissance cellulaire des PCs.

2.6 Migration et survie des plasmocytes dans la moelle osseuse

Lorsque les LB se différencient en PCs, ils modifient leur profil d'expression de récepteurs aux chimiokines. Les récepteurs CCR7 et CXCR5 sont réprimés tandis que le récepteur CXCR4 est maintenu et sa sensibilité à l'attraction chimiotactique exercée par la chimiokine CXCL12 est augmentée, conférant ainsi la capacité aux PCs de migrer vers la moelle osseuse (Hargreaves et al., 2001). Hargreaves et al ont démontré que CXCL12 est exprimé par les cellules stromales médullaires mais aussi par la pulpe rouge splénique et les cordons médullaires des ganglions lymphatiques. L'inactivation conditionnelle de CXCR4 dans les LB conduit à la perte des PCs dans la moelle mais pas dans la rate (Tokoyoda et al., 2004).

La rétention des PCs dans la MO implique l'engagement de VLA4 (*Very Late Antigen 4*) qui se fixe à la molécule d'adhésion VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) présente sur les cellules stromales (**Figure 13**). Ces niches particulières, présentent un microenvironnement favorable à leur survie notamment par la présence des facteurs solubles APRIL et IL-6 sécrétées par des cellules hématopoïétiques comprenant les éosinophiles (Chu et al., 2011) et les mégacaryocytes (Winter et al., 2010). D'autres facteurs ont été proposés pour supporter la survie des PCs, BAFF qui partage un récepteur commun avec APRIL, le BCMA (*B Cell Maturation Antigen*) (Benson et al., 2008), CD28 (Rozanski et al., 2015), CD93 (Chevrier et al., 2009) et MCL-1, une protéine anti-apoptotique de la famille de BCL-2 (Peperzak et al., 2013).

Au sein de ces niches de survie, les PCs deviendront des cellules à longue durée de vie sécrétant des Ac indépendamment des cellules B mémoires, de l'activation des B, d'un contact antigénique ou encore de l'aide des cellules T (Ahuja et al., 2008 ; DiLillo et al., 2008 ; Manz et al., 1998).

Pourtant, une population de cellules T semble promouvoir le maintien des LLPCs dans la MO. Il s'agit des T régulateurs qui semblent contribuer à la régulation des PCs via CTLA-4 (Glatman Zaretsky et al., 2017).

En outre, les PCs présentent les caractéristiques des cellules mémoires permettant une protection efficace et à long terme contre les réinfections (Roth et al., 2014). Cependant, les PCs de la MO présentent une population hétérogène, exprimant différemment certains marqueurs incluant CD19 et HLA-DR. Ainsi la sécrétion d'Ac par les LLPCs peut varier d'une population à une. Les LLPCs de la MO exprimant le phénotype CD19⁺CD38^{hi}CD138⁺ ont été identifiés comme responsables du maintien à long terme des anticorps anti-viraux dans le sérum et ils présentent une signature transcriptomique particulière (Halliley et al., 2015).

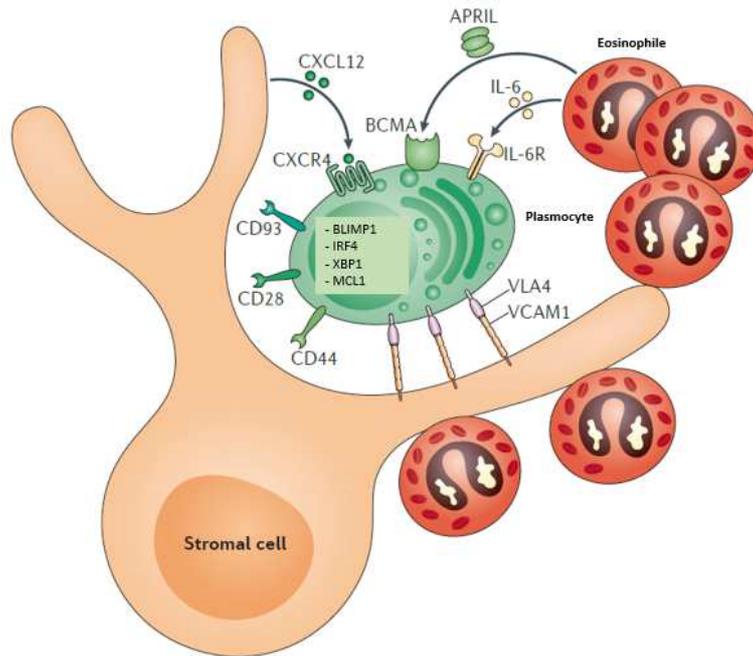


Figure 13 : Modèle d'une niche de survie pour les plasmocytes au sein de la moelle osseuse.
D'après (Nutt et al., 2015).

2.7 Les immunoglobulines

2.7.1 Structure des immunoglobulines

Les Ig sont exprimées sous deux formes : les Ig produites par les PCs et sécrétées par la voie constitutive constituent les effecteurs solubles de l'immunité humorale et les Ig membranaires présentes à la surface de la cellule B constituent avec leurs co-récepteurs le BCR. Les Ig sont des protéines glycosylées présentes dans le plasma, les muqueuses et certains liquides biologiques. Elles se présentent sous forme d'hétérodimères, toujours composés de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères κ ou λ .

Différentes chaînes lourdes déterminent les classes d'Ig. Il existe 5 classes de chaînes lourdes μ , δ , γ , α et ϵ codant respectivement pour les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Ces cinq classes d'Ig ont des structures (**Figure 14**) et des fonctions effectrices différentes. Leur concentration sérique moyenne est également différente. D'un point de vue quantitatif, on remarque certaines différences entre les classes d'Igs : l'IgG est la plus abondante des Igs sériques chez l'homme (Vidarsson et al., 2014). Elle se divise en 4 sous-classes et l'IgG₁, produite en réponse aux protéines antigéniques solubles ou membranaires, est la plus commune. L'IgM est la première produite, c'est un Ac très efficace dans l'agglutination des bactéries et les Ag particulaires en raison de sa structure pentamérique mais elle permet aussi le recrutement du complément. L'IgA, elle est la classe prédominante des sécrétions externes telles que le lait, la salive, et les larmes. Elle se trouve sous forme de monomère dans les sécrétions et sous forme de dimère à la

surface épithéliale. Enfin l'IgD et l'IgE, représentent les classes les moins abondantes de sérum. L'IgD, de concert avec l'IgM, est l'anticorps membranaire essentiel aux cellules B matures et l'IgE est responsables des symptômes d'allergie atopique comme l'eczéma et l'asthme. Efficace contre les vers parasites, elle se lie également aux mastocytes et, au contact de l'antigène, recrutent des agents antimicrobiens via la dégranulation des mastocytes et la libération de médiateurs inflammatoires.

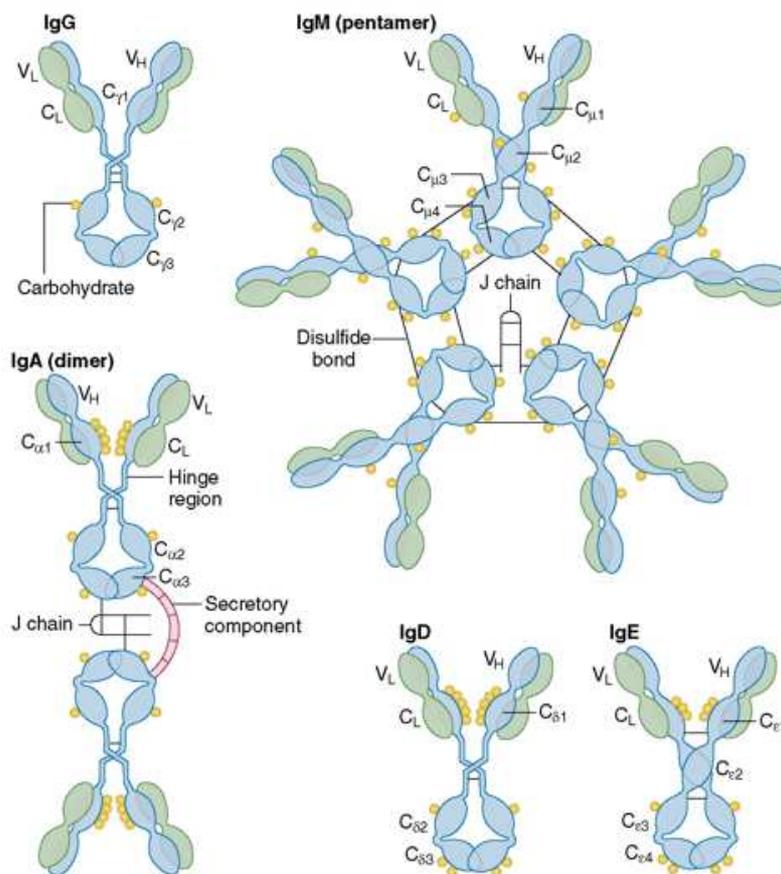


Figure 14 : Schéma des différents isotypes des immunoglobulines.

Les chaînes lourdes et les chaînes légères sont représentées respectivement en bleu et vert. Chaque monomère est composé de 2 chaînes lourdes (μ, γ, α, δ ou ε) et de 2 chaînes légères. Les IgG, les IgD et les IgE circulent sous forme monomériques tandis que les IgA et les IgM sécrétées sont sous forme dimérique et pentamérique respectivement, stabilisées par la chaîne de jonction, J.

2.7.2 Fonction des immunoglobulines

Les Ac ont quatre fonctions effectrices essentielles (**Figure 15**). La première est la neutralisation des pathogènes (a), notamment des bactéries extracellulaires et des virus. C'est l'affinité de l'Ac pour sa cible donc le fragment Fab qui est l'élément déterminant de son efficacité. La deuxième est l'activation du complément (b) par l'IgM ainsi que par la plupart des sous-classes d'IgG. Le fragment Fc est responsable du recrutement de la fraction C1q du complément qui va entraîner la lyse cellulaire. La troisième est l'opsonisation des pathogènes (c) facilitant leur reconnaissance et leur prise en charge par les macrophages et les neutrophiles et la dernière est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac (ADCC) (d) qui provoque la mort des cellules cibles médiée par différents types cellulaires dont les cellules NK. La liaison avec le récepteur FcγR entraîne le relargage de granules contenant les enzymes perforines et granzymes, provoquant la lyse de la cellule cible.

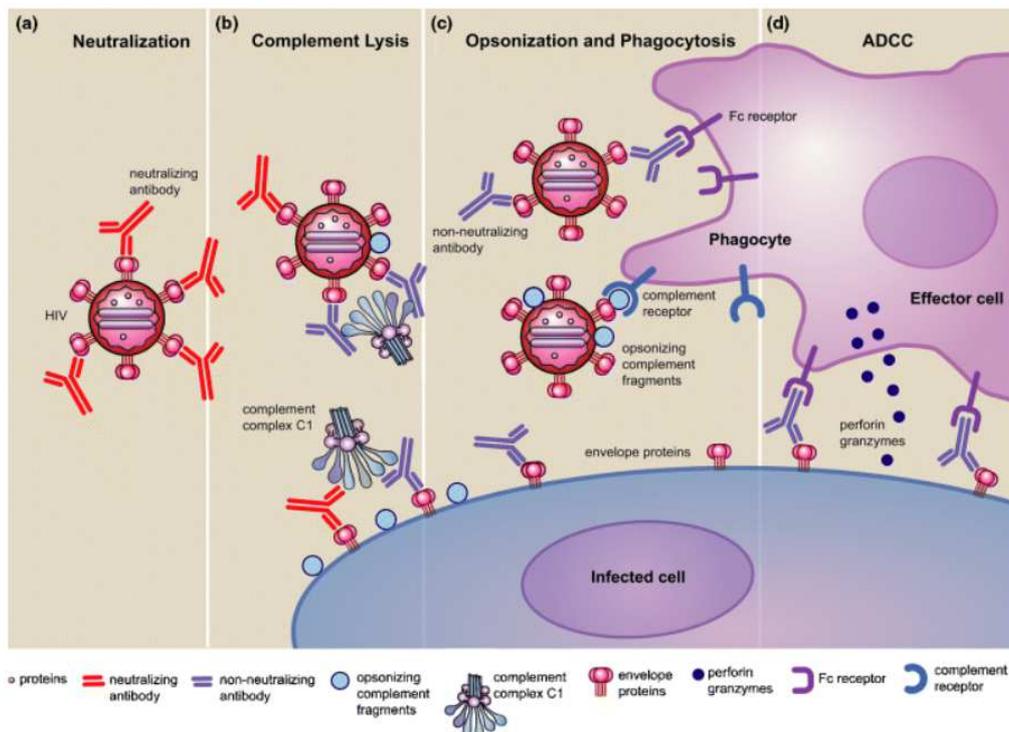


Figure 15 : Fonctions effectrices des Ac.

ADCC, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*. D'après M. Huber & A. Trkola (2007)

Les Ac sont les médiateurs de la fonction humorale protectrice mais ils peuvent aussi être impliqués dans les processus immuns. C'est ce que nous allons voir dans la partie suivante.

3 Les cellules B et les maladies auto-immunes

3.1 Définition de la tolérance du système immunitaire

Les processus permettant la génération d'un répertoire B divers étant aléatoire (réarrangements VDJ, mutations hypersomatiques), ils peuvent également conduire à la génération de LB autoréactifs. Plusieurs points de contrôle existent donc au cours de la différenciation B afin d'éliminer ou de contrôler ces clones auto-réactifs. La première étape de sélection se déroule dans la MO au stade immature, on parle alors de tolérance centrale (**Figure 16**). Ce point de contrôle met en jeu plusieurs mécanismes : éditing, délétion et anergie. Le re-éditing du récepteur permet la reprogrammation de la spécificité des cellules B par le réarrangement de novo des gènes des Ig (Pelanda and Torres, 2012) ; la délétion clonale ou l'anergie (Gauld et al., 2006) permettant respectivement l'élimination par apoptose ou l'inactivation liée à l'absence de signaux de costimulation, des clones auto-réactifs. Ce processus n'élimine pourtant pas la totalité des LB immatures autoréactifs et il a été montré qu'environ 30% des B immatures en circulation sont autoréactifs chez l'homme. Une deuxième étape de sélection appelée tolérance centrale périphérique a alors lieu au stade des LB transitionnels. A ce stade les mécanismes mis en jeu sont principalement l'anergie et la délétion. Enfin, une étape de contre-sélection a également lieu dans le CG mais les mécanismes mis en jeu sont encore mal définis.

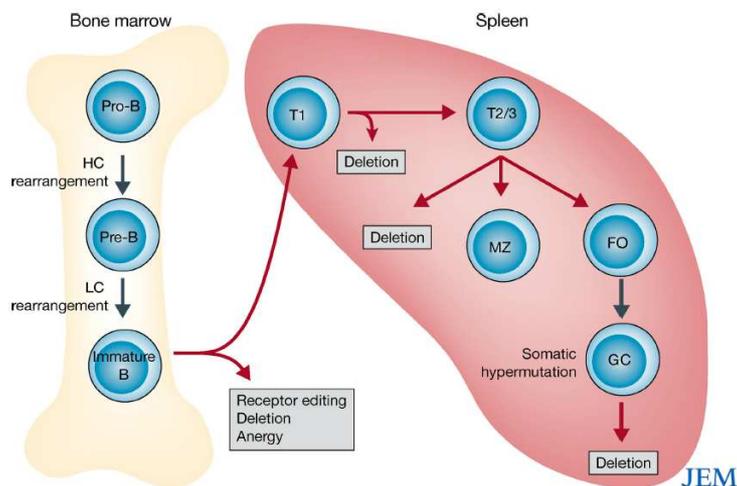


Figure 16 : Sélection négative dans le développement des cellules B. Il existe 2 points de sélection dans la diversification du BCR : le réarrangement initial du récepteur dans la moelle osseuse et le phénomène d'hypermutation somatique pendant la réaction du centre germinatif. Chacune de ces 2 étapes sont suivies par une sélection négative des cellules B auto-réactives. Le premier point de contrôle a lieu entre le stade de cellule B immature dans la moelle osseuse et le stade de cellule B transitionnelle T1 dans la rate. Le second a lieu entre le stade T1 et T2/T3 de B transitionnelle plus mature. Le dernier point de contrôle a lieu entre le stade T2/T3 et les cellules B matures de la zone marginale (MZ) et les B folliculaires engagés dans la réaction du centre germinatif. D'après (Jacobi and Diamond, 2005).

3.2 La rupture de la tolérance

Lorsque les mécanismes de tolérance sont défaillants, des LB auto-réactifs peuvent se différencier en PCs sécrétant des autoanticorps pouvant participer au développement d'une réponse autoimmune pathologique (Cheng et al., 2013). Ainsi, les cellules B primordiales dans les réponses immunes contre les Ag étrangers, sont malheureusement également impliquées dans le développement et la sévérité de plusieurs maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (SLE) (Tsubata, 2017). Cette maladie, caractérisée par la production d'Ac dirigés contre l'ADN double brin, peut engendrer des lésions cutanées, des douleurs articulaires, des insuffisances cardiaques et rénales, ou encore une atteinte cérébrale.

La MO est le site où prédominent les niches de survie pour les LLPCs, mais dans le cas des maladies autoimmunes inflammatoires, les tissus enflammés peuvent représenter de potentielles niches de survie. Dans un modèle lupique de souris, M.E a montré que les PCs présents dans les reins enflammés sont auto-réactifs et que ces tissus constituent le principal réservoir d'auto-Ac pathogènes (Espeli et al., 2011).

La pathogénicité des auto-Ac peut se traduire par différents mécanismes :

- la cytotoxicité lors, par exemple, des anémies hémolytiques où les globules rouges sont la cible des Ac de type IgG (Mahévas et al., 2015)
- le dépôt de complexes immuns dans les reins ou les vaisseaux sanguins comme c'est le cas dans les néphropathies glomérulaires ou les thromboses (Lipsky, 2001)
- l'interférence avec des récepteurs cellulaires ou bien des structures cellulaires, comme par exemple dans la myasthénie où de multiples anticorps auto-réactifs sont en cause. Il s'agit d'auto-Ac anti-récepteur de l'acétylcholine (RACH), ou bien dirigés contre le récepteur tyrosine-kinase spécifique du muscle (MuSK) ou la protéine LRP4 (lipoprotein-related protein 4) qui empêchent le regroupement des RACH, entraînant une mauvaise transmission de l'influx nerveux au muscle qui se traduit par des faiblesses musculaires (Berrih-Aknin et al., 2014).

L'origine des maladies auto-immunes est multifactorielle et les facteurs impliqués ne sont pas encore tous identifiés. Il y a sans doute une prédisposition génétique où plusieurs gènes peuvent être mis en cause qui, de plus, peuvent être différents d'une population ethnique à une autre. Il peut également y avoir une forte composante hormonale (via les oestrogènes qui favorise une baisse de la protéine AIRE (AutoImmune REgulator) et des éléments déclencheurs comme le stress ainsi que des facteurs environnementaux, tels que les infections virales ou bien encore les perturbateurs endocriniens.

3.3 Les traitements actuels

Le traitement des maladies auto-immunes reste assez complexe du fait des différents mécanismes mis en jeu. Pour éviter l'emballement du système immunitaire, les patients peuvent être traités avec des médicaments anti-inflammatoires comme les corticoïdes et des immunosuppresseurs qui vont « calmer » l'ensemble du système immunitaire mais par la même occasion, fragiliser les patients qui se retrouvent moins bien protégés des agressions extérieures. L'utilisation d'un agent appelé globuline antithymocyte peut être proposée, dans le cadre d'un protocole visant à dépléter le système immunitaire adaptatif dans sa globalité incluant les PCs mémoires autoréactifs, à des patients réfractaires à une thérapie immunosuppressive conventionnelle.

Plusieurs Ac thérapeutiques sont actuellement utilisés pour traiter certaines maladies autoimmunes. C'est le cas du rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD20, présente à la surface des LB. Malgré de bons résultats dans certaines maladies dont les vascularites, l'utilisation du rituximab dans d'autres pathologies est controversée. En effet, il a montré peu d'efficacité dans deux essais cliniques dans le cas du lupus. De plus, dans le cas de la thrombopénie, la déplétion des cellules B induit l'apparition de PCs pathogènes à longue durée de vie dans la rate (Mahévas et al., 2013, 2015).

Etant donné que les plasmocytes mémoires sécrètent des autoanticorps indépendamment de l'activation des cellules B, les traitements visant directement les cellules B via un anti-CD20, un anti-CD22 ou un anti-BAFF (belinumab), n'affectent pas les PCs ce qui pourrait expliquer en partie leur échec dans certaines pathologies autoimmunes.

Les niveaux d'autoanticorps qui restent stables malgré des traitements immunosuppresseurs ou visant les cellules B, indiquent alors que ces autoanticorps sont sécrétés par les plasmocytes mémoires (Hiepe et al., 2011 ; Radbruch et al., 2006). De plus, il a été publié que les plasmablastes autoréactifs nouvellement générés entrent en compétition avec les LLPCs pour l'occupation des niches de survie (Hiepe et al., 2011).

Une meilleure compréhension de la biologie des PCs est donc essentielle pour l'identification de nouvelles cibles dans le traitement des maladies médiées par les Ac.

4 Des régulateurs de la fonction immunitaire : la Syntaxine-5 et Creld2

4.1 Le complexe Syntaxine-5 SNARE

La Syntaxin-5 (Stx5) est un membre de la famille des SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*). Les SNAREs sont des protéines transmembranaires responsables de la fusion membranaire au cours du transport vésiculaire. La spécificité et l'énergie nécessaire à cette fusion sont permises par l'interaction de deux protéines SNAREs complémentaires associés à chacune des membranes donneuses et acceptuses. Ainsi, les SNAREs peuvent être classifiés en 2 catégories, les v-SNAREs (v pour *vesicle*) et les t-SNAREs (t pour *target membranes*) encore appelés R-SNAREs et Q-SNAREs respectivement, en raison de la présence d'un résidu d'arginine et de glutamine. Cette nomenclature est plus juste que la précédente car les v-SNAREs et les t-SNAREs peuvent être présents dans la membrane donneuse ou acceptuse. La Stx5 est un Q-SNARE requis pour la sécrétion constitutive (Gordon et al., 2010).

La Stx5 existe sous 2 isoformes, une forme courte de 35 kDa et une forme longue de 42 kDa. Selon l'environnement moléculaire dans laquelle elle se situe elle peut être associée d'une part avec GS27, Sec22b et Bet1 dans un complexe à l'interface cis-Golgi-ER et d'autre part principalement sous sa forme courte avec GS28, Ykt6 et GS5 requis pour le transport intra-Golgi (Hay et al., 1998). La forme longue de la protéine contribue à la régulation de la structure du RE en interagissant avec CLIMP-63 et les microtubules indépendamment de sa fonction de SNARE (Miyazaki et al., 2012) (**Figure 17**).

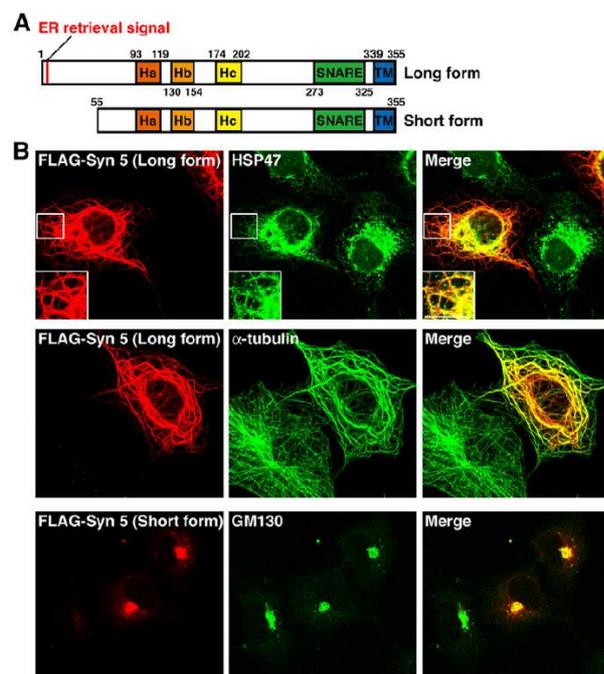


Figure 17 : Localisation des 2 isoformes de la Stx5.

- (A) Représentation des 2 isoformes de la Stx5. La forme longue contient sur sa partie N-terminale un signal d'ancrage sur le RE. Les 2 isoformes possèdent 3 domaines hélicoïdaux (Ha, Hb et Hc), un motif SNARE et un domaine transmembranaire TM.
- (B) La forme longue de la Stx5 présente une distribution en filaments autour du noyau qui co-localisent avec un marqueur du RE (HSP47) et avec l' α -tubuline. La forme courte de la Stx5 co-localise avec un marqueur du Golgi (GM130). D'après (Miyazaki et al., 2012).

CLIMP-63 (*63-kDa cytoskeleton-linking membrane protein*) est une protéine transmembranaire de type II dont le domaine cytosolique a la capacité de se lier aux microtubules tandis que le domaine luminal peut former des complexes homo-oligomériques non seulement avec les molécules voisines mais aussi en trans avec d'autres protéines CLIMP-63 présentes sur l'autre face du RE (Sandoz and van der Goot, 2015). Ces interactions permettent la formation des feuillettes du RE (**Figure 18**). Par extrapolation, la Stx5 pourrait donc être un élément important dans le réarrangement du RE au sein des PCs qui, comme nous le savons, s'expand à travers la cellule pour produire des Ac.

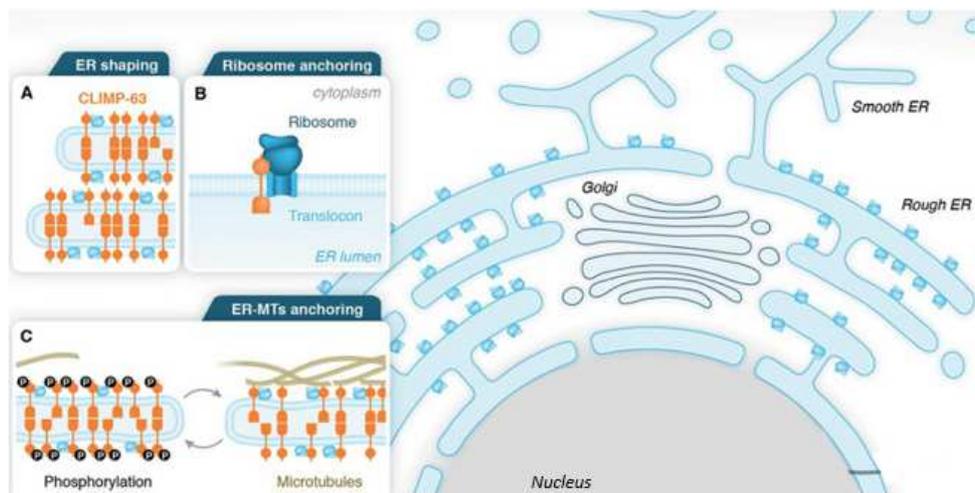


Figure 18 : Interactions de CLIMP-63 dans la structuration du RE

(A) CLIMP-63 est une protéine résidente du RE rugueux (RER) et sa multimérisation permet le maintien de l'épaisseur des feuillettes du RE. (B) CLIMP-63 est impliqué dans l'ancrage des ribosomes au RER. (C) La forme non phosphorylée de CLIMP-63 se lie aux microtubules tandis que la forme phosphorylée permet sa libération des microtubules. Adaptée de (Sandoz and van der Goot, 2015).

Le RE est le point de départ de la voie de sécrétion (**Figure 19**), en effet les protéines nouvellement synthétisées sont empaquetées dans des vésicules qui forment des bourgeons avec la membrane du RE grâce à la GTPase Sar1. Ces bourgeons sont recouverts par la protéine d'enveloppe COPII, les vésicules ainsi formées se détachent par fission membranaire pour migrer vers le Golgi. Le transport entre le RE et l'appareil de Golgi est bidirectionnel permettant le recyclage des protéines cargos non conformes. Le transport rétrograde est médié par COPI. Les vésicules COPI peuvent être formées à partir de la membrane du Golgi ou du compartiment intermédiaire ER—Golgi (ERGIC). En tant que SNARE, la Stx5 est particulièrement importante dans le trafic antérograde du RE vers le Golgi (Dascher et al., 1994), mais également dans le trafic rétrograde (Amessou et al., 2007 ; Stechmann et al., 2010).

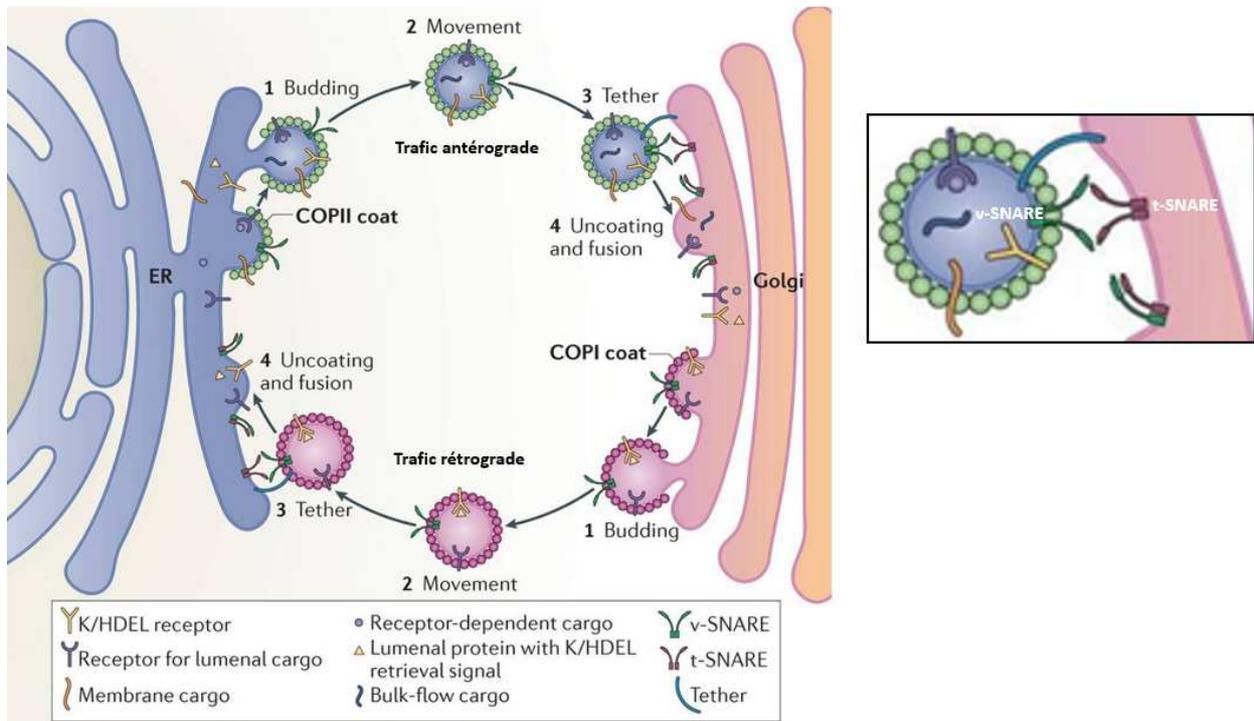


Figure 19 : Implication de la Stx5 dans le transport bidirectionnel entre le RE et le Golgi

Plusieurs types de protéines cargos incluant des protéines transmembranaires, libres, ou dépendante d'un récepteur peuvent être transportées dans les vésicules. Une fusion membranaire spécifique est médiée par l'appariement des v-SNAREs et des t-SNAREs, 3 hélices d'une t-SNARE et une d'une v-SNARE s'enroulent pour former un faisceau stable de 4 hélices qui verrouillent les 2 membranes ensemble permettant l'exocytose. D'après (Brandizzi and Barlowe, 2013).

Le complexe Stx5 SNARE est également requis dans le processus de l'autophagie qui nécessite plusieurs étapes de fusion membranaire incluant la fusion endosome-autophagosome (formant un amphisome) et autophagosome-lysosome (formant un autolysosome). La déplétion du complexe Stx5 SNARE résulte en l'accumulation d'autophagosomes en conséquence d'un dysfonctionnement lysosomal due à un défaut du transport antérograde des protéases lysosomales (Renna et al., 2011). L'autophagie étant nécessaire à la survie des PCs, inhiber le transport des protéases du RE vers le Golgi pourrait entraîner en toute logique la mort de la cellule.

Tous ces processus sont impliqués dans la physiologie des PCs et étant donné que la Stx5 est surexprimée dans les PCs par rapport aux cellules B (nos données), nous nous sommes intéressés au rôle de la Stx5 dans la sécrétion d'Ac et l'autophagie.

4.2 Creld2

Creld2 (Cysteine-rich with EGP-like domain2) est l'une des protéines, dont les fonctions n'ont pas été caractérisées, mise en évidence par des études protéomiques réalisées au sein du laboratoire et fortement exprimées lors de la différenciation plasmocytaire. C'est une glycoprotéine d'environ 60 kDa principalement localisée au niveau du RE et du Golgi. Creld2 a été identifié en 2009 comme l'un des facteurs induit par le stress du RE, il contient en effet un élément de réponse au stress du RE (ERSE) dans sa région promotrice qui est régulé positivement par ATF6 (Oh-hashii et al., 2009). Des modifications sur sa région C-terminale augmente sa sécrétion, régulée par GRP78 et par la GTPase Sar1 (Oh-hashii et al., 2011) ainsi que par Manf (*Mesencephalic Astrocyte derived Neurotrophic Factor*) qui est une protéine soluble surexprimée lors de la réponse UPR (Oh-hashii et al., 2015). Ces résultats suggèrent que Creld2 peut exercer différentes fonctions selon sa localisation au niveau de l'appareil ER-Golgi ou dans l'espace extra-cellulaire. De plus, d'après une étude menée par Ortiz *et al.*, Creld2 médie le trafic intracellulaire des sous-unités du récepteur à l'acétylcholine nicotinique et intervient dans leur assemblage (Ortiz et al., 2005), ce qui pourrait sous-entendre un rôle plus général de Creld2 dans le repliement des protéines et leur trafic par le RE.

Plus récemment, Creld2 a été identifié par RNAseq comme faisant partie des transcrits définissant la signature transcriptomique des PCs (Shi et al., 2015). De plus son expression dans les PCs est sous le contrôle des gènes Prdm1 et Xbp1 (Tellier et al., 2016) bien qu'il n'y ait pas de site de fixation pour Prdm1 sur son promoteur (Minnich et al., 2016).

Creld2 est localisé sur le RE des cellules souches mésenchymateuses et régulé par BMP9 qui est un inducteur de la différenciation ostéogénique (Zhang et al., 2013). Mise à part son implication dans la différenciation des cellules souches en ostéoblastes et sa surexpression dans des modèles de chondrodysplasies (maladies du squelette) (Hartley et al., 2013), son rôle est encore peu connu.

5 Contexte et objectifs

Le développement des LB en cellules sécrétrices d'Ac, les plasmocytes ainsi nommés par Paul Gerson Unna en 1891, est essentiel au maintien d'une réponse immunitaire humorale appropriée. Cela est d'autant plus important qu'une dérégulation de la production d'anticorps chez un individu peut entraîner de graves anomalies telles que le myélome multiple et la macroglobulinémie de Waldenström caractérisées par la prolifération des plasmocytes et/ou plasmablastes dans la moelle osseuse ou encore certaines maladies auto-immunes. Malgré le rôle central des Ac dans les réponses immunes normales et pathologiques, les mécanismes régulant leur sécrétion sont encore mal compris. De plus, il est probable que les mécanismes régulant la sécrétion des Ac impactent directement sur la différenciation et la survie des plasmocytes.

Afin d'adresser ces questions nous nous sommes intéressés à deux protéines fortement exprimées par les plasmocytes, la Stx5 et Creld2. Nous avons mis en place un système permettant l'extinction de ces protéines dans une lignée cellulaire ainsi que dans des plasmocytes primaires. Cela nous a permis de montrer que nos deux candidats étaient essentiels pour la physiologie des PCs. Nous avons ensuite utilisé notre modèle cellulaire afin de comprendre comment nos deux candidats affectent la survie, la différenciation ainsi que la sécrétion des PCs.

Enfin, nous avons souhaité confirmer in vivo l'impact de Creld2 sur les PCs et la réponse immune et nous avons étudié en détail le phénotype de souris déficientes pour Creld2 spécifiquement dans le lignage B.

II MATERIELS ET METHODES

1 Génie Génétique

1.1 Préparation des shRNA

L'utilisation des shRNA présente plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques de silencing. Elle repose sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux capables de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte permettant une expression stable puisque lors de la division des cellules mères, le shRNA est transmis aux cellules filles. Ainsi l'expression des shRNA permet un knockdown permanent des gènes d'intérêts ce que l'utilisation de siRNA ne permet pas. De plus, en agissant sur les transcrits, le silencing est rapide et compatible avec la courte durée de vie des PCs en culture. Ceci est avantageux par rapport à l'utilisation du système Crispr-Cas9 par exemple.

Les shRNA sont synthétisés, selon les préconisations du Consortium RNAi (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public>), à partir de 2 oligonucléotides portant une séquence cible de 21pb du gène d'intérêt (**Figure 1a**).

Les oligonucléotides sens et anti-sens sont solubilisés dans de l'eau à une concentration de 20µM puis mélangés (5µL oligo sens + 5µL oligo anti-sens + 5µL tampon NEB2 10x + 35µL H₂O) et incubés 4 minutes à 95°C, et enfin refroidi progressivement à température ambiante sur la nuit. Ces oligonucléotides sont flanqués de séquences pouvant être digérées avec les enzymes de restriction AgeI et EcoRI afin d'obtenir des extrémités cohésives compatibles avec la ligation dans nos vecteurs d'intérêts.

1.2 Clonage dans les vecteurs lentiviraux pLKO.1-TRC et pLKO.3G

Les shRNA sont introduits dans un premier temps dans le vecteur pLKO.1-TRC (addgene #10878) (**Figure 1b**) digéré au préalable par les 2 enzymes AgeI et EcoRI. La ligation s'effectue avec la T4 DNA ligase (NEB) puis le produit de la ligation est transformé dans les bactéries compétentes STBL3 (Gibco #10193952). Des minipréparations d'ADN plasmidique (Macherey-Nagel #740588.50) sont réalisées sur les colonies ampicilline-résistantes puis séquencées (GATC Supreme Run) avec l'oligonucléotide de séquençage pLKO.1 : 5' CAA GGC TGT TAG AGA GAT AAT TGG A 3'.

Le vecteur pLKO.1 a été modifié par délétion d'un certain nombre de gènes impliqués dans la virulence du VIH et il possède une séquence d'auto-inactivation en 3'LTR qui le rend incapable de produire des

virus infectieux une fois intégré dans le génome de l'hôte. Les mêmes shRNA sont clonés dans le vecteur pLKO.3G (addgene #14748) (Figure 1a). Le vecteur pLKO.3G est un variant du vecteur pLKO.1, il contient un rapporteur fluorescent eGFP au lieu d'une cassette de sélection à la puromycine, il nous permettra d'infecter les cellules primaires de souris. Les shRNA ne peuvent pas être clonés directement dans ce vecteur car il contient un 2^e site AgeI, c'est pourquoi les séquences sont transférées du pLKO.1 au pLKO.3G par coupure des 2 vecteurs avec les enzymes NdeI et BlnI.

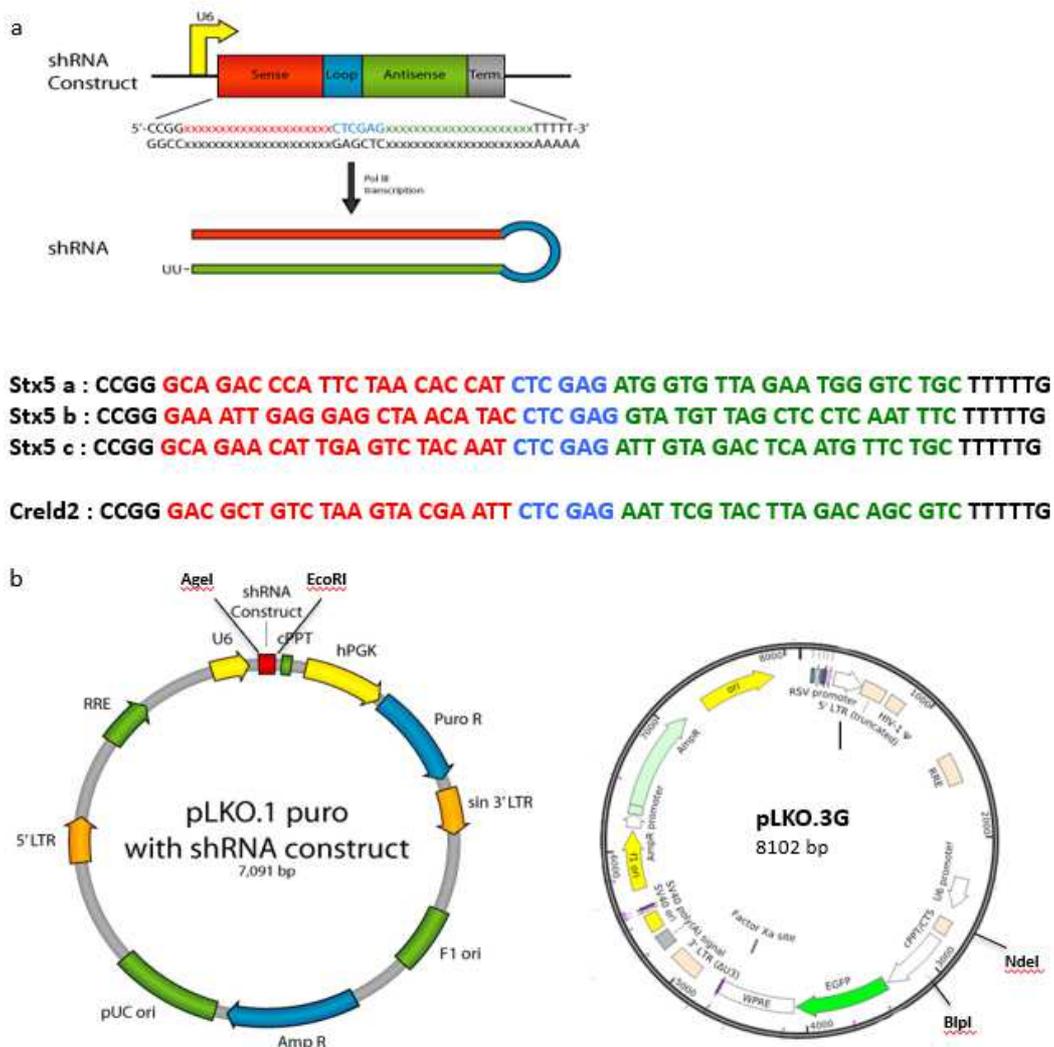


Figure 1 : shRNA et vecteurs d'expression.

a) **Séquence complète des oligonucléotides (sens) des shRNA Stx5 et Crel2.** Le shRNA est une structure en tige et boucle appelé épingle à cheveux comportant un motif sens et anti-sens de 21pb. Il y a complémentarité de bases entre les 2 brins et à chaque extrémité les sites de restriction AgeI et EcoRI ont été rajouté pour le clonage dans le vecteur pLKO.1. b) **Carte génétique des vecteurs pLKO.1 et pLKO.3G.** Le vecteur pLKO.1 porte les sites de restriction AgeI et EcoRI permettant l'insertion du shRNA. Le shRNA est ensuite cloné dans le vecteur pLKO.3G aux sites NdeI et BlnI à partir du vecteur pLKO.1 contenant le shRNA d'intérêt.

2 Culture cellulaire

2.1 La lignée cellulaire I.29

La lignée cellulaire I.29 constitue un modèle d'étude *in vitro* de la différenciation plasmocytaire. C'est une lignée de lymphocytes B murins, issue d'un lymphome (Alberini et al., 1987) exprimant à sa surface des IgM ($\mu+$), capable de se différencier en plasmocytes en réponse à une stimulation au LPS. Ces cellules représentent une lignée en suspension et sont cultivées à +37°C sous une atmosphère de 5% CO₂ en milieu RPMI 1640 + Glutamax supplémenté avec 10% de FCS (Fetal Calf Serum), 1% de Pénicilline/Streptomycine, 0,1mM d'acides aminés non-essentiels, 1mM de pyruvate de sodium et 50 μ M de β -mercaptoethanol.

2.2 Production de particules lentivirales

La production des particules lentivirales nécessite 3 plasmides différents pour permettre la synthèse de ces virus par les cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney) :

- 1) le plasmide pLKO.1-TRC ou pLKO.3G permettant l'expression des shRNAStx5 et shRNACreId2 grâce à l'ARN Polymérase III (Pol III) placée sous le contrôle du promoteur U6 afin d'obtenir une expression forte des shRNA,
- 2) le plasmide psPAX2 (Addgene #12260) qui porte les séquences GAG/POL/TAT/REV. Le gène *gag* code les protéines de matrice intermembranaire, de capsid (qui protège le core) et de nucléocapsid (formant le core) qui protège le génome viral constitué de 2 molécules d'ARN identiques. Le gène *pol* code les 2 enzymes nécessaires au cycle de réplication du virus : la rétrotranscriptase qui transcrit l'ARN viral en ADN pro-viral, transporté du cytoplasme vers le noyau et l'intégrase qui permet l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte. Les gènes accessoires *tat* et *rev* facilitent l'assemblage des particules lentivirales,
- 3) le plasmide pMD2.G (Addgene #12259) ou le plasmide pHCMV-EcoEnv (Addgene #15802) qui portent une séquence ENV, essentielle pour l'attachement du virus et son entrée dans la cellule hôte. La glycoprotéine d'enveloppe du pMD2.G est la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) de large tropisme tandis que le plasmide pHCMV-EcoEnv exprime la protéine d'enveloppe virale du virus de la leucémie murine écotrope de Moloney (le spectre d'infection se limite à la souris).

Il est à noter que nous avons utilisé comme contrôle le vecteur pLKO.1 vide, c'est-à-dire sans séquence codante pour un shRNA.

La lignée cellulaire HEK293T dérive de la lignée HEK293 et comporte l'antigène grand T du virus simiesque SV40. Elle est plus adhérente et moins sensible aux conditions toxiques auxquelles elle est exposée lors de la transfection et présente donc un meilleur rendement pour la production de particules lentivirales. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM+Glutamax (4,5g/L de glucose) avec 10% de sérum de veau fœtal, de la pénicilline à 100U/mL et de la streptomycine à 100µg/mL.

2.3 Transfection des cellules HEK293T avec les plasmides lentiviraux

Les cellules HEK293T sont comptées etensemencées à $5 \cdot 10^6$ cellules par boîte T75, la veille de la transfection. Quatre boîtes pour chaque shRNA sont prévues. Le lendemain, les cellules sont transfectées au phosphate de calcium avec les 3 plasmides nécessaires à la production de particules lentivirales. Avant la transfection le milieu est remplacé par du milieu neuf additionné de 10% HEPES (Gibco #15630-056). En parallèle, 24µg de pLKO.1shRNA (ou pLKO.3GshRNA), 20µg de psPAX2 et 4µg de pMD2.G (ou pHCMV-EcoEnv) sont dilués dans 500µL H₂O plus 125µL CaCl₂ à 2,5M. Le mélange est incubé pendant 5 minutes. Puis goutte à goutte, sous agitation, le mélange est ajouté dans 500µL de tampon HeBS2x (Sigma #51558). Le mélange est ensuite incubé pendant 30 minutes à température ambiante puis dispersé sur les cellules. Après 7 à 8h d'incubation à 37°C, le milieu est enlevé et remplacé par 5 mL de milieu utilisé pour la culture des cellules I29.

2.4 Collecte des particules lentivirales

Les étapes de réplication virale conduisent à la synthèse de protéines virales qui, après auto-assemblage, constituent des particules virales qui sortiront des cellules par bourgeonnement. La production de très nombreux virus par les cellules HEK293T conduit à leur mort par effet lytique du virus. Après 36 heures de transfection, les particules virales sont récupérées dans le surnageant des cellules HEK293T et filtrées à travers un filtre de 0,45µm. Le surnageant est aliquoté et congelé à -80°C.

2.5 Transduction lentivirale

- Transduction et différenciation de la lignée cellulaire I29

Les cellules I29 sont centrifugées à 1500 rpm puis resuspendues dans du milieu frais à hauteur de 12 millions de cellules par mL. Les cellules (500 μ L) sont ajoutées au 3 mL de milieu contenant les particules lentivirales dans une boîte 6 puits. La transduction s'effectue par centrifugation de la boîte à 2000 rpm pendant 1 heure puis les cellules sont incubées à 37°C. Le lendemain, le milieu avec les particules lentivirales est retiré, et du milieu frais est ajouté. 48 heures après la transduction, les cellules sont mises en présence de 10 μ g/mL de Puromycine (Sigma-Aldrich P8833) afin de sélectionner les cellules transduites. Les cellules stablement transduites avec les shRNA sont mises en culture à une concentration de 2.10⁵ cellules/mL en présence ou en absence de 10 μ g/mL LPS pendant 5 jours.

- Transduction et différenciation des cellules B

Nous avons établi un système nous permettant de transduire, différencier et cultiver des plasmocytes primaires murins. Les cellules B sont mises en culture dans du milieu supplémenté avec la protéine recombinante CD40-L (Peprotech, Inc #315-15) (80ng/mL), et de l'interleukine (IL)-4 (1U/mL) qui vont permettre la stimulation et la prolifération des cellules. Le lendemain, les cellules sont transduites avec nos shRNA d'intérêts clonés dans le vecteur lentiviral pLKO.3G de la même manière que pour la lignée I.29. 16h après la transduction, les cellules sont lavées et mises en culture avec du LPS à 10 μ g/ml ce qui va induire leur différenciation cellulaire, ainsi que de l'IL-4 et de l'IL-5 (5ng/mL) favorisant la survie cellulaire. Une cinétique est ensuite réalisée pour suivre le phénotype, la différenciation et la survie des PCs.

3 Cytométrie en flux

3.1 Les anticorps

Le tableau ci-après présente les anticorps utilisés pour les caractérisations phénotypiques de la lignée cellulaire I29, des cellules B primaires et des cellules de souris.

Antigène	Fluorochrome	Fournisseur
B220 (CD45R)	BV786	BD
	APC-eFluor 780	eBioscience
CD19	PE-CF594	BD
	APC	Sony
CD138	BV421	BD
CD4	AF700	Sony
CD8	Percp	BD
CD93 (AA4.1)	Fitc	eBioscience
CD38	BV421	BD
CD73	Percp cy5.5	BioLegend
CXCR5	biotinylé	BD
PD1 (CD279)	FITC	eBioscience
Bcl6	AF647	BD
FAS (CD95)	PE-cy7	BD
GL7	AF488	eBioscience
IgK	Percp cy5.5	BD
IgM	APC	eBioscience
IgG1	BV605	BD

Tableau 1 : Anticorps utilisés pour les immunomarquages analysés par cytométrie en flux.

PE, Phycoerythrin ; Cy, Cyanine ; AF, Alexa Fluor ; FITC, Fluorescein Isothiocyanate ; APC, Allophycocyanine ; Percp, Peridinin Chlorophyll Protein Complex.

3.2 Immunomarquages membranaires et intracellulaires

Les cellules sont lavées, centrifugées et incubées pendant 30 min à 4°C en présence des Ac décrits dans le tableau 1. Elles sont ensuite lavées en PBS et un marqueur de viabilité (Zombie aqua™ Biolegend #423102) est ajouté afin de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes. Les cellules sont lavées puis fixées en PBS 1% formaldéhyde si elles ne sont pas analysées immédiatement au cytomètre en flux ou utilisées pour un marquage intracellulaire.

Afin de procéder aux marquages intracellulaires, les cellules sont resuspendues dans 250µL de tampon fixation/perméabilisation (kit Foxp3 Staining Buffer, eBioscience #00-5523-00), puis incubées 30 minutes à 4°C et enfin lavées avec 2mL de tampon de perméabilisation 1x (kit Foxp3 Staining Buffer). Les Ac sont dilués dans le tampon de perméabilisation et incubés 30 minutes à 4°C.

Les cellules sont fixées avec du PBS 1% formaldéhyde puis mise en PBS avant d'être analysées à l'aide d'un analyseur multi-couleur BD LSR-Fortessa (BD Biosciences) équipé de 4 lasers : 405nm, 488nm, 651nm, 640nm permettant l'analyse de 16 paramètres de fluorescence.

3.3 Les sondes

Le tableau ci-dessous présente les sondes utilisées pour l'étude de certains compartiments cellulaires.

Sonde	Concentration	Filtre	Fournisseur	Application
ER-Tracker Blue-White DPX	50nM	V-B-655/8	Invitrogen	marqueur du RE
LysoTracker Red DND-99	50nM	PE	life technologies	marqueur des lysosomes
Mitotraker Green	50nM	FITC	Invitrogen	marqueur des mitochondries
Mitotracker Deep Red	50nM	Red C-670	Invitrogen	

Tableau 2 : Sondes utilisées pour marquer le réticulum endoplasmique (RE), les organelles acides ainsi que les mitochondries.

Les sondes sont diluées dans du milieu de culture RPMI préchauffé puis incubées avec les cellules pendant 20 à 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et marquées avec un marqueur de viabilité. Les cellules ne sont pas fixées car certaines sondes sont sensibles au formaldéhyde.

3.4 Analyse des résultats

La population d'intérêt, en l'occurrence les lymphocytes, est visualisée dans une fenêtre selon 2 axes : le Forward Scatter Chanel (FSC) qui représente la taille des cellules et le Side Scatter Chanel (SSC) qui représente la granularité des cellules. La population lymphocytaire est sélectionnée en excluant les débris cellulaires, ainsi que les doublets et les cellules mortes. Pour chaque expérience les fenêtres sont réalisées de cette manière. L'expression des différents marqueurs par cette population peut être visualisée par des histogrammes ou en nuage de points. Les témoins négatifs de fluorescence correspondent à des cellules non marquées ou marquées avec un isotype contrôle. Les résultats sont analysés en pourcentage de cellules ou en médiane géométrique d'intensité de fluorescence (MFI) avec le logiciel FlowJo.

4 Etude de la sécrétion des immunoglobulines

4.1 ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) permet de doser la présence d'anticorps dans les surnageants de culture ou dans le sérum. Concrètement les plaques sont incubées sur la nuit à 4°C avec 50µL d'un anticorps de souris anti-IgM (SouthernBiotech #1021-01) ou du NP(13)-BSA et de NP(4)-BSA (Biosearch Technologies) dilué dans du PBS à une concentration finale de 5µg/ml. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois au PBS-Tween 0,05% et, après saturation des sites aspécifiques avec du PBS + 2% BSA pendant 1h à 37°C, les surnageants ou les sérums sont dilués en cascade au 1/3 dans les plaques qui sont ensuite incubés pendant 1h à 37°C. Après lavage des plaques, un anticorps secondaire de souris anti-IgM ou IgG1 (SouthernBiotech #1020-05) couplé à une peroxydase (HRP) dilué au 1/4000^e dans du PBS est rajouté pendant 2h à température ambiante afin d'amplifier le signal via sa liaison avec le fragment Fc des Ig. Un substrat spécifique de la peroxydase de raifort, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) (BD Biosciences #555214), est ensuite ajouté à tous les puits. La réaction enzymatique se traduit par une colorimétrie bleue qui devient jaune suite à l'ajout de 50µl d'acide sulfurique à 0,5M pour stopper la réaction. Cette réaction est dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450nm à l'aide d'un Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies). La quantification des Ig est possible grâce à une gamme standard (SouthernBiotech #0101-01).

4.2 ELISpot

Le dosage ELISpot repose sur le même principe que l'ELISA. C'est l'un des dosages cellulaires les plus sensibles permettant de détecter et de dénombrer les différentes cellules qui sécrètent une protéine spécifique *in vitro*. Dans notre cas, chaque spot correspond à une cellule sécrétrice d'anticorps. L'intensité du spot correspond au nombre d'immunoglobulines sécrétées par un plasmocyte. La plaque ELISpot est tout d'abord incubée avec un Ac anti-IgM (5µg/ml) ou avec le NP(13)-BSA et NP(4)-BSA à 4°C sur la nuit. Le lendemain la plaque est lavée à l'eau puis saturée avec 150µl milieu de culture pendant 2h à 37°C. Les cellules sont ensuite transférées sur la plaque en quadruplicat à hauteur de 2000 cellules/puits pour les I.29 et de 2,5.10⁵ cellules/puits pour les splénocytes et les cellules médullaires puis incubées sur la nuit à 37°C. Après 3 lavages au PBS-Tween 0,01% et 2 lavages au PBS, la plaque est incubée avec un Ac anti IgM-HRP ou anti IgG1-HRP dilué au 1/4000^e pendant 2h à température ambiante. Les spots sont détectés à l'aide de 100µl d'une solution de révélation composée d'un

comprimé d'AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazole) (Sigma-Aldrich) dissous dans 2,5mL de DMF (diméthylformaldéhyde) diluée dans 47,5mL de tampon acétate à 50mM. 25µl de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés extemporanément à la solution. La réaction est stoppée par de l'eau. Les plaques sont lues par un lecteur de plaques Fluorospot (MabTech).

5 Analyse moléculaire

5.1 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel polyacrylamide et immunotransfert

Les cellules (au minimum 1 million) sont récupérées après centrifugation et lavées au PBS. Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse froid (20mM Tris HCl pH7,5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40 et 1% d'un mélange de cocktail d'inhibiteurs de protéases/phosphatases) et incubé dans la glace pendant 30 minutes et vortexé toutes les 5 minutes. Le lysat est centrifugé à 13000rpm pendant 10 minutes et le surnageant est prélevé. La concentration protéique des extraits est déterminée par un dosage BCA (Pierce BCA Protein Assay kit #23225). Des échantillons de 20µg à 50µg de protéines sont dénaturés dans un tampon chargé en SDS et β-mercaptoéthanol et chauffés pendant 5 min à 95°C avant d'être centrifugés et déposés sur gels. Les gels de migration sont des gels NuPAGE 4-12% Bis-Tris polyacrylamide (life technologies NP0323BOX) et le tampon de migration du MOBS 1x. La migration des échantillons s'effectue à 120V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Les protéines sont ensuite transférées en milieu liquide sur membrane de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) 0,45µm pendant 1 heure à 120V. La membrane est ensuite saturée pendant 30 minutes, sous agitation, dans du tampon TBS-Tween 0,05% lait 5%. Les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à +4°C.

Anticorps	Espèce	Dilution	Poids moléculaire	Fournisseur
CRELD2 (G17)	rabbit polyclonal	1/400	38,2 kDa	Santa Cruz
Syntaxin 5	rabbit polyclonal	1/1000	35/42 kDa	Santa Cruz
LC3B (D11)	rabbit polyclonal	1/1000	14/16 kDa	Cell Signaling

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les western-blots.

Les anticorps secondaires anti-lapin couplés à la peroxydase sont utilisés au 1/5000^{ème}, à température ambiante pendant 1 heure. La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du TBS-Tween 0,05% puis 2 fois avec du TBS. La révélation s'effectue avec le kit ECL (Pierce #32166) et les images sont prises avec le système ChemiDoc-It Imaging System.

5.2 Mesure de l'expression des ARNm par RT-qPCR en temps réel

- Extraction et rétrotranscription des ARNm

En partant d'environ 5 millions de cellules traitées et non traitées, les ARNm sont extraits en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les ARNm sont dosés au Nanodrop à une longueur d'onde de 260nm. La pureté des ARNm est évaluée par le rapport de l'absorbance 260nm/280nm. Les ARNm sont rétrotranscrits en ADNc en utilisant le kit Superscript Vilo (Invitrogen).

- Réaction en chaîne par polymérase quantitative PCR (qPCR)

Le milieu réactionnel est composé de 10uL de Sybr Green, 0.5uL d'amorces sens et antisens à 10uM, 2 uL d'ADNc à 1ng/uL et 7uL d'eau RNase et DNase Free.

Les séquences des amorces sont les suivantes :

Stx5 sens : CGT-GGC-TAT-TGA-GAT-GG réverse : CCC-GAC-TCT-GGA-TGT-AGG-AA

Creld2 sens : CTA-GAG-GCT-TGG-TGG-CAG-AC réverse : GTA-GGT-GCC-TGG-AAG-ACA-GC

Les échantillons ainsi préparés sont distribués en plaque 96 puits et la qPCR est effectuée sur le Light Cycler 480 (Roche). Les datas sont analysées avec le logiciel de l'appareil avec Advanced Relative Quantification en utilisant un gène de référence.

6 Microscopie électronique : évaluation de la morphologie des compartiments intracellulaires

La microscopie électronique à transmission est une technique puissante qui permet la visualisation des ultrastructures cellulaires telles que le RE, les lysosomes, les autophagolysosomes et les mitochondries. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la plate-forme de microscopie électronique de Toulouse dirigée par S. Balor.

Les cellules sont reprises dans 1mL de milieu de culture auquel on ajoute 1mL d'un mélange de glutaraldéhyde 4% / paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate Sörensen 0,1M pH7,2 pendant 15 minutes à température ambiante. Après cette étape de pré-fixation, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1500rpm puis elles sont fixées avec 2,5% glutaraldéhyde / 2% PFA toujours en tampon Sörensen pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules fixées sont lavées 3 fois en tampon Sörensen puis envoyées sur la plate-forme d'imagerie Genotoul de Toulouse en tampon PFA 1%.

7 Le modèle animal : les souris Mb1-cre x Creld2

7.1 Génération des cohortes de souris

Nous utilisons un modèle murin $Creld2^{tm1c(EUCOMM)Hmgu}$ floxé (LoxP – flanked) permettant la délétion cellulaire spécifique du gène codant pour Creld2 (Figure 2b). Ces souris sont croisées avec des souris exprimant une cre-recombinase placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des LB (Mb1-cre) (Figure 2a). Les souris Mb1-cre^{tg/+} (tg = transgénique) sont maintenues à l'état hétérozygote. A l'issue du croisement, nous obtenons des souris Mb1-cre^{tg/+} / creld2^{fl/+} qui sont croisées avec des souris Creld2^{fl/fl}. Nos souris expérimentales sont les souris homozygotes pour Creld2 : Mb1cre^{tg/+} Creld2^{fl/fl} (KO) et hétérozygotes pour Creld2 : Mb1cre^{tg/+} Creld2^{fl/+} (HET) et nos contrôles sont les souris Mb1cre^{+/+} Creld2^{fl/fl} (WT). Le projet a reçu un avis favorable sur le plan éthique par le Comité d'éthique en Expérimentation Animale CEEA 26.

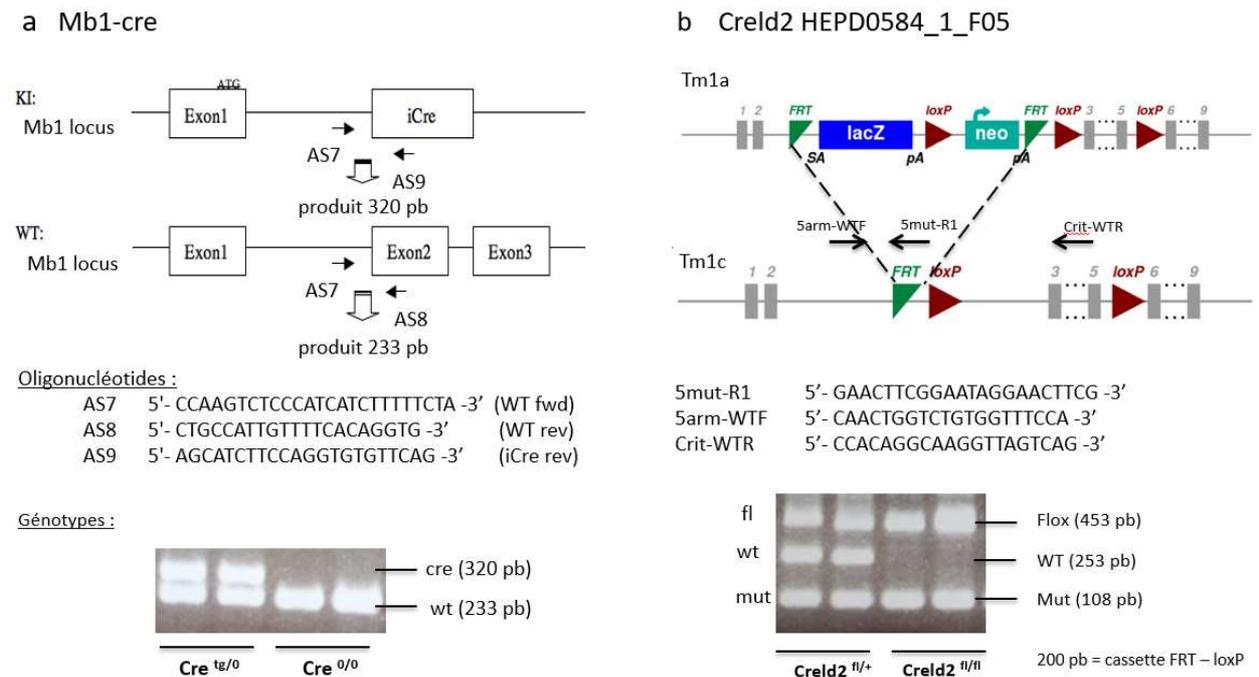


Figure 2 : Constructions alléliques et génotypage des souris Mb1-cre (a) et Creld2 flox (b).

Les allèles Tm1c sont générés par exposition des allèles Tm1a à la recombinaison flpe ce qui engendre la délétion des cassettes Neo et LacZ positionnées entre les 2 sites FRT (b). Les exons 3 à 5 sont encadrés de sites loxP permettant la délétion de la région critique pour l'expression de *Creld2* lorsque les souris sont croisées avec les souris exprimant la cre recombinase. Le produit d'amplification entre les oligos 5arm-WTF et 5mut-R1 est une petite bande (Mut) d'environ 100 pb qui justifie la présence de l'insert. Les oligos 5arm-WTF et Crit-WTR permettent l'amplification par PCR d'une bande WT de 253 pb et d'une bande Flox de 200 pb plus grande due à la région FRT-loxP.

7.2 Immunisation avec un antigène T-dépendant, le NP-KLH

Pour l'immunisation primaire, on pèse 100µg de NP-KLH par souris dans un Falcon stérile de 15mL, la poudre est dissoute dans du PBS 1x pour obtenir une concentration de 2mg/mL. On ajoute ensuite de l'imject alum (vol/vol) sous agitation constante, et l'émulsion se fait pendant 30 minutes. L'immunisation des souris est réalisée par injection intrapéritonéale avec 100µL de NP-KLH émulsifié dans l'alum. Pour l'immunisation mémoire, le NP-KLH, dissous dans le PBS est injecté directement à une concentration finale de 1mg/mL (Marion Espéli and Michelle Linterman (eds.), T Follicular Helper Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology).

7.3 Préparation des cellules murines

- Cellules de la rate

Les rates sont prélevées et broyées sur un tamis cellulaire de 70µm (Falcon #104599) posé sur un tube Falcon de 50mL, les splénocytes sont récupérés dans du milieu de culture identique à celui des cellules I.29. Les tubes sont centrifugés et les globules rouges sont lysés dans 1mL de tampon ACK (4,13g Ammonium Chloride, 0,5g Potassium bicarbonate, 15mg EDTA dans 500mL H₂O) pendant 5 minutes à température ambiante puis 10mL de PBS sont ajouté. Les tubes sont centrifugés et les cellules sont resuspendues dans 1mL de milieu de culture. Les cellules sont comptées sur des lames Fast-Read (Biosigma).

- Cellules de la moelle osseuse

Les os de la patte postérieure sont prélevés, le tibia est séparé du fémur et chaque extrémité des os est coupée. La moelle osseuse est récupérée dans un eppendorf de 1,5mL, rempli au préalable avec 200µL de PBS, après centrifugation des tubes 2 minutes à 13 000 rpm. La suite de la procédure est identique à la préparation des splénocytes.

III RESULTATS

1 Etude de l'impact de la Stx5 et de Creld2 sur des cellules B murines différenciées *in vitro* et *ex vivo*

1.1 Validation des shRNA dans la lignée I.29

Nous avons fait synthétiser trois shRNA différents spécifiques de la Stx5 (shRNA Stx5_(a), _(b) et _(c)) et un shRNA spécifique de Creld2 (les séquences des shRNA sont décrites dans la partie Matériels et Méthodes Figure 1). Afin de valider l'efficacité de ces shRNA, nous les avons testés dans la lignée murine de lymphome B, I.29. Pour cela, plusieurs lignées cellulaires stables de cellules I.29 ont été établies : une lignée exprimant le vecteur contrôle vide (sans shRNA), une lignée exprimant le shRNA Stx5_(a), deux lignées exprimant le shRNA Stx5_(c) et trois lignées exprimant le shRNA Creld2.

Ces lignées ont dans un premier temps été validées par Western-Blot et PCR quantitative afin de confirmer respectivement la diminution d'expression des protéines et des gènes d'intérêts. La taille des protéines obtenues sur les gels correspond aux tailles théoriques des protéines c'est-à-dire 35 et 42 kDa pour la Stx5 et 60kDa pour Creld2. Suite aux résultats obtenus, nous avons décidé de travailler avec la lignée I.29 exprimant le shRNA Stx5_(c) et celle exprimant le shRNA Creld2₍₁₎. En effet, l'extinction protéique et transcriptionnelle de la Stx5 à l'aide du shRNA Stx5_(c) est d'environ de 50% par rapport à la lignée I.29 exprimant le vecteur contrôle tandis que les shRNA Stx5_(a) et Stx5_(b) ne semble pas inhiber l'expression de la Stx5. Les trois lignées I.29 exprimant le shRNA Creld2 sont quasiment équivalentes entre elles en terme d'expression transcriptionnelle, nous avons donc décidé de travailler avec la lignée exprimant le shRNA Creld2₍₁₎ dont nous avons vérifié l'extinction protéique qui est de l'ordre de 80% (**Figure 1.1A**).

La lignée I.29 a la capacité de se différencier en cellule sécrétrice d'Ac et de sécréter de grandes quantités d'IgM après stimulation avec du LPS (van Anken et al., 2003). Comme attendu, la différenciation induite par le LPS s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules sécrétrices d'Ac détectées par ELISpot (**Figure 1.1B**). En revanche, les lignées transduites avec les shRNA Stx5 et Creld2 présentent une forte réduction du nombre de spots. La taille des spots informe sur la quantité d'Ig sécrétée par une cellule. Cette caractérisation permet de distinguer les cellules sécrétant beaucoup plus d'IgM que les autres, ce qui suggère que les cellules différenciées transduites avec les shRNA et plus particulièrement avec le shRNA Creld2, produisent moins d'Ac par rapport aux cellules contrôles transduites avec un vecteur vide. Ce résultat est corrélé avec une diminution du taux d'IgM dans les surnageants de culture (**Figure 1.1C**).

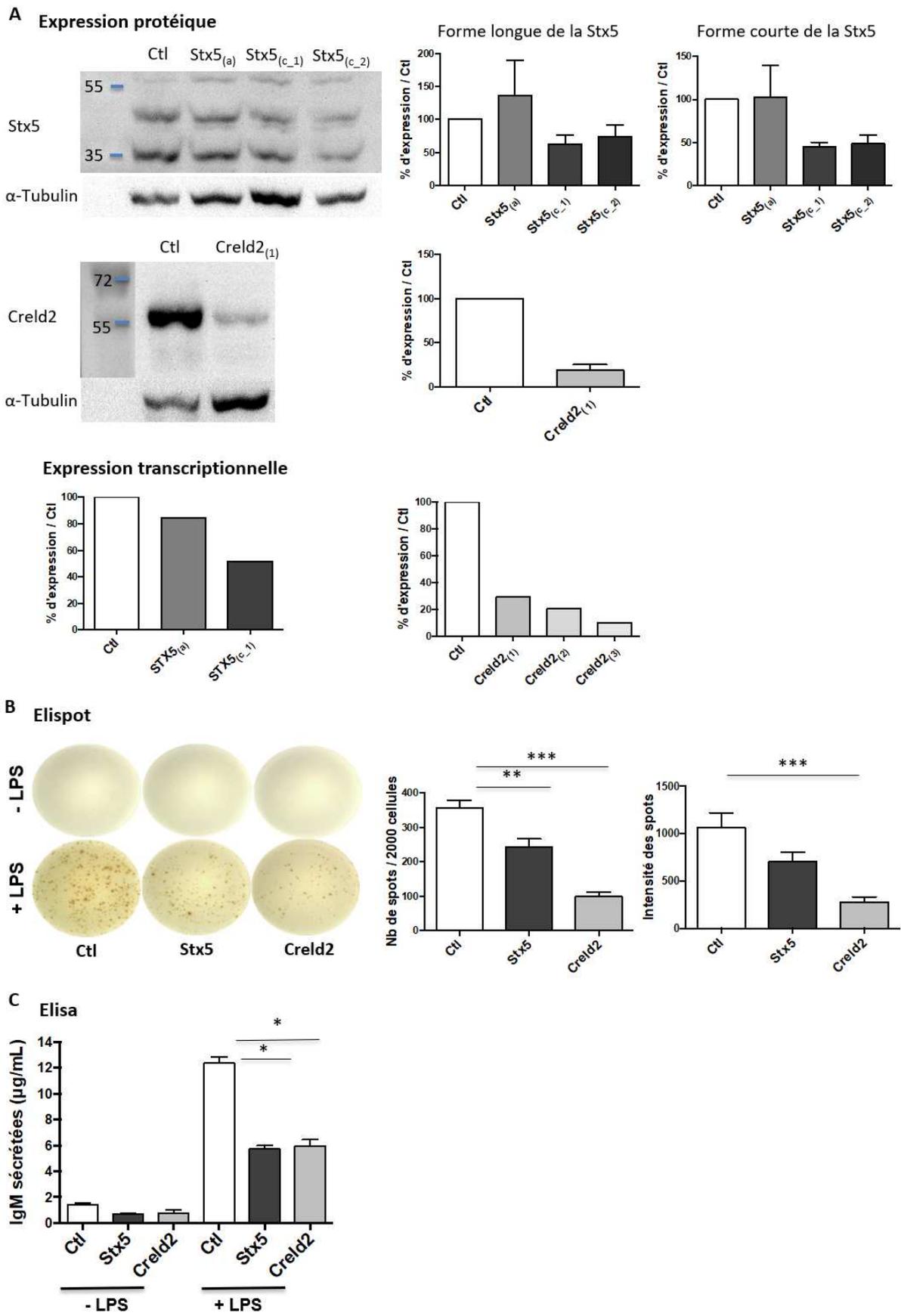


Figure 1.1 : Validation du knock-down de la Stx5 et Creld2 avec la lignée cellulaire I.29.

(A) (Haut) Western-blots représentatifs de la détection de la Stx5 et de Creld2 à l'état basal, dans le lysat des cellules I.29 stablement transduites avec les shRNA indiqués (gauche). Expérience répétée au moins 2 fois. L'expression protéique a été calculée en faisant le ratio de l'intensité de la détection de nos protéines d'intérêts et de la Tubulin. L'expression protéique du contrôle a été fixée arbitrairement à 100 (droite). (Bas) Quantification du niveau des transcrits de chaque gène par rapport au gène de ménage GAPDH. (B) Mesure, par Elispot, de la sécrétion d'IgM par chaque cellule stimulée ou non avec du LPS sur une période de 18h entre jour 4 et jour 5. Les histogrammes représentent le nombre de spots obtenus pour 2000 cellules différenciées (gauche) et l'intensité des spots (droite) représentatifs de 4 expériences. (C) Mesure, par Elisa, des IgM sécrétées dans les surnageants des cellules différenciées ou non après 5 jours de culture. Il s'agit de la moyenne de 4 expériences \pm l'erreur standard moyenne (SEM), le test statistique employé est le test Mann-Whitney, les différences observées sont identifiées par * p value <0.05, ** p value <0.01, *** p value <0.001.

1.2 Rôle des protéines Stx5 et Creld2 dans la différenciation et le maintien des PCs *ex vivo*

Afin de tester la relevance des protéines Stx5 et Creld2 dans la biologie des PCs nous avons développé un système nous permettant de cultiver, différencier et transduire des PCs primaires *ex vivo*. Les splénocytes sont mis en culture en présence de CD40L recombinant et d'IL-4 pendant 24 heures pour promouvoir l'entrée en cycle des LB et assurer leur survie (**Figure 1.2A**). Les cellules sont ensuite transduites avec les particules virales préparées avec le vecteur pLKO.3G contrôle (vecteur vide) codant pour la GFP et le vecteur pLKO.3G codant pour les shRNA Stx5 ou Creld2, et la GFP. Après une période de 24h, les cellules transduites sont lavées et différenciées avec du LPS. L'analyse de l'impact du knock-down des protéines d'intérêts sur les PCs primaires est réalisée à partir du 1^{er} jour de différenciation jusqu'au 7^e jour.

Une caractéristique importante des cellules en culture *ex vivo* est leur viabilité. Les cellules ont été cultivées sur une période de 10 jours au total, le premier graphique (**Figure 1.2B**) présente la viabilité de la culture des LB après l'ajout de LPS et des cytokines dans le milieu de culture. Au temps 0, soit 2 jours après leur mise en culture et leur transduction avec les lentivirus, les cultures présentaient plus de 65% de viabilité pour les cellules contrôles et transduites avec le shRNA Creld2, et un peu moins pour les cellules transduites avec le shRNA Stx5. Le graphique montre une diminution de la viabilité des cellules qui atteint un seuil d'environ 30% au jour 7. Les cellules transduites avec les shRNA Stx5 et Creld2 présentent un léger désavantage de survie entre J2 et J5 par rapport aux cellules contrôles.

Il existe des marqueurs propres à l'état de maturation, d'activation et de différenciation des LB. Le B220 (CD45R) est utilisé communément comme un marqueur pan-cellule B et le CD19 est exprimé dès le stade pro-B mais diminué au sein des PCs. L'utilisation de ces 2 marqueurs nous permet de sélectionner

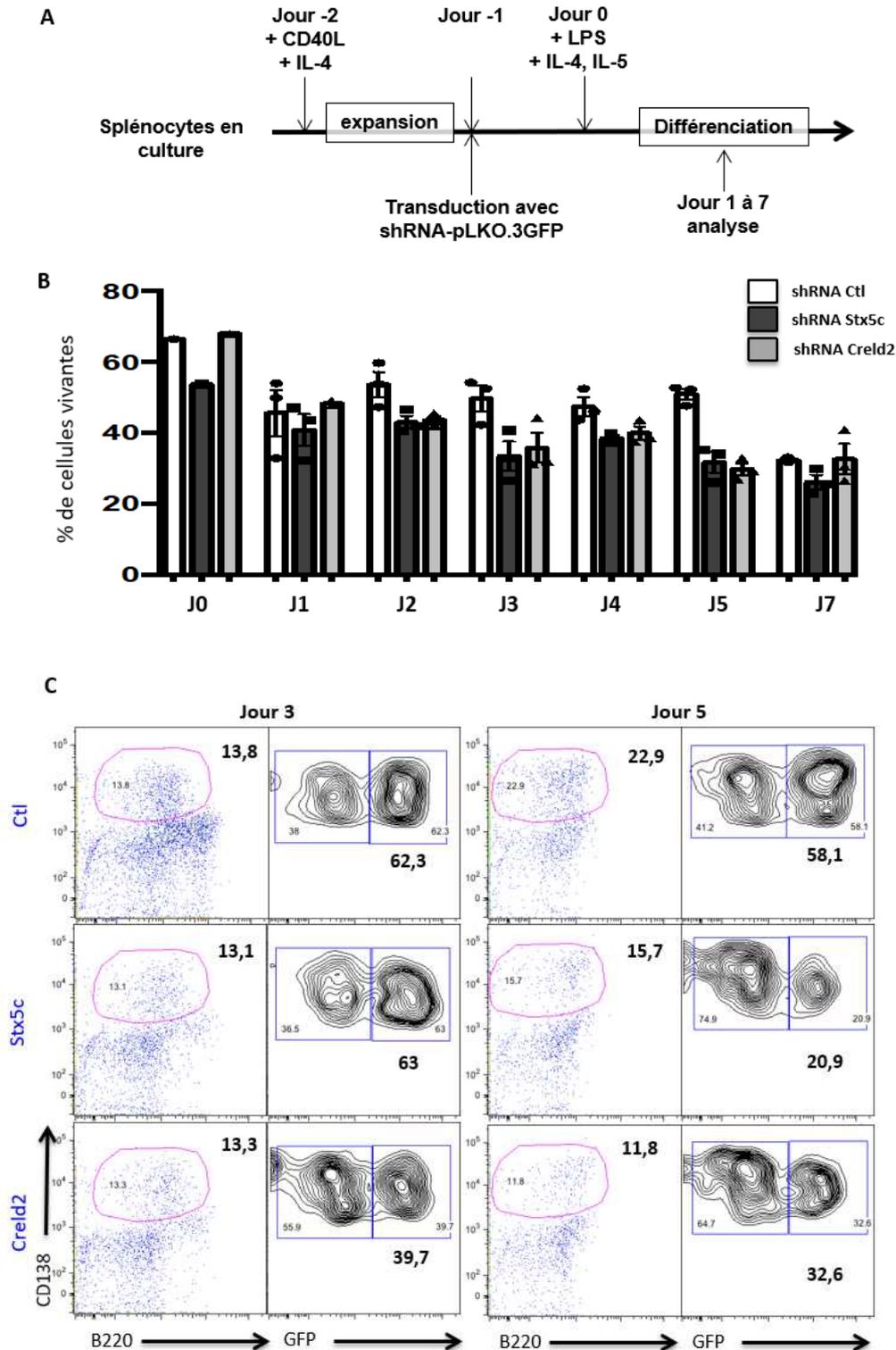
les LB et d'observer que leur fréquence est la même entre les cellules contrôles et les cellules shRNA Stx5 ou shRNA Creld2 (non montré dans la figure 1.2).

Les PCs transduits avec le vecteur contrôle ou avec les shRNA spécifiques de la Stx5 et de Creld2 expriment le CD138 et la GFP. Le CD138 est le marqueur de surface par excellence pour la détermination des PCs en phase terminale de différenciation et la GFP nous permet de comparer dans le même échantillon les PCs "wild-type" (GFP⁻) et les PCs dont l'expression de la Stx5 et de Creld2 a été diminuée (GFP⁺) (**Figure 1.2C**). A jour 1, il y a à peu près 20% de PCs GFP⁺ dans les 3 conditions expérimentales (**Figure 1.2E**).

Au 2^e jour de différenciation, le nombre de PCs commence à augmenter progressivement dans le milieu de culture et leur fréquence est quasi similaire entre le contrôle et les shRNA d'intérêts (**Figure 1.2D**). Comme nous le montre la fréquence des PCs GFP⁺, entre 60 et 70% de ces cellules sont transduites dès le jour 2 pour le contrôle (**Figure 1.2E**). Ce pourcentage reste constant jusqu'au jour 7 démontrant que la transduction n'affecte pas la survie des PCs. Aux jours 2 et 3, le pourcentage des PCs GFP⁺ est également autour de 60% pour les cellules transduites avec le shRNA Stx5, suggérant que le knock-down de la Stx5 n'affecte pas ou peu la différenciation précoce des PCs. En revanche, le pourcentage de PCs GFP⁺ dans le cas du shRNA Creld2 plafonne entre 40 et 50% entre jour 2 et jour 3 (**Figure 1.2B et D**). Ces résultats nous suggèrent que le knock-down de Creld2, contrairement au knock-down de la Stx5, semblent affecter la différenciation précoce des PCs.

Contrairement à la condition contrôle, après le 4^e jour de différenciation, la fréquence des PCs cesse d'augmenter et diminue progressivement, à la fois dans les conditions du knock-down de la Stx5 et de Creld2 (**Figure 2D**). Au jour 5, la fréquence des PCs GFP⁺, pour les cellules Stx5 knock-down, chute drastiquement (**Figure 2C et E**), passant de 60% pour le contrôle à 20% pour la Stx5. Cette forte baisse du pourcentage des PCs GFP⁺ s'accompagne d'une diminution moins importante de la fréquence des PCs totaux ce qui laisse à penser que les PCs déficients pour la Stx5 sont intrinsèquement désavantagés en terme de survie par rapport aux cellules non transduites. En outre, la fréquence des PCs GFP⁺ pour notre contrôle se maintient dans le temps puisqu'au 7^e jour, celle-ci reste inchangée (**Figure 2D**). Pour les cellules Creld2 knock-down, la fréquence des PCs transduits, bien qu'elle soit fortement diminuée dès le 4^e jour de différenciation par rapport à celle des cellules contrôle, semble se maintenir dans le temps. Cette observation suggérerait que les PCs GFP⁺ Creld2 knock-down ne présentent pas de problème de survie intrinsèque aux cellules mais un problème de différenciation précoce. Ce résultat est à prendre avec précaution car d'après la littérature, Creld2 peut être sécrété spontanément, donc les cellules GFP⁻ pourraient être une source possible de Creld2 participant ainsi au maintien des cellules GFP⁺.

Il semblerait donc que, dans des PCs différenciés et cultivés *ex vivo*, l'absence de la Stx5 et de Creld2 soit un désavantage intrinsèque pour les cellules transduites vis-à-vis des cellules non transduites. Nous avons également noté que la fréquence des LB ne varie pas selon le contrôle ou le knock-down des protéines d'intérêt, ce qui signifie que la Stx5 et Creld2 sont bien spécifiques au maintien des PCs.



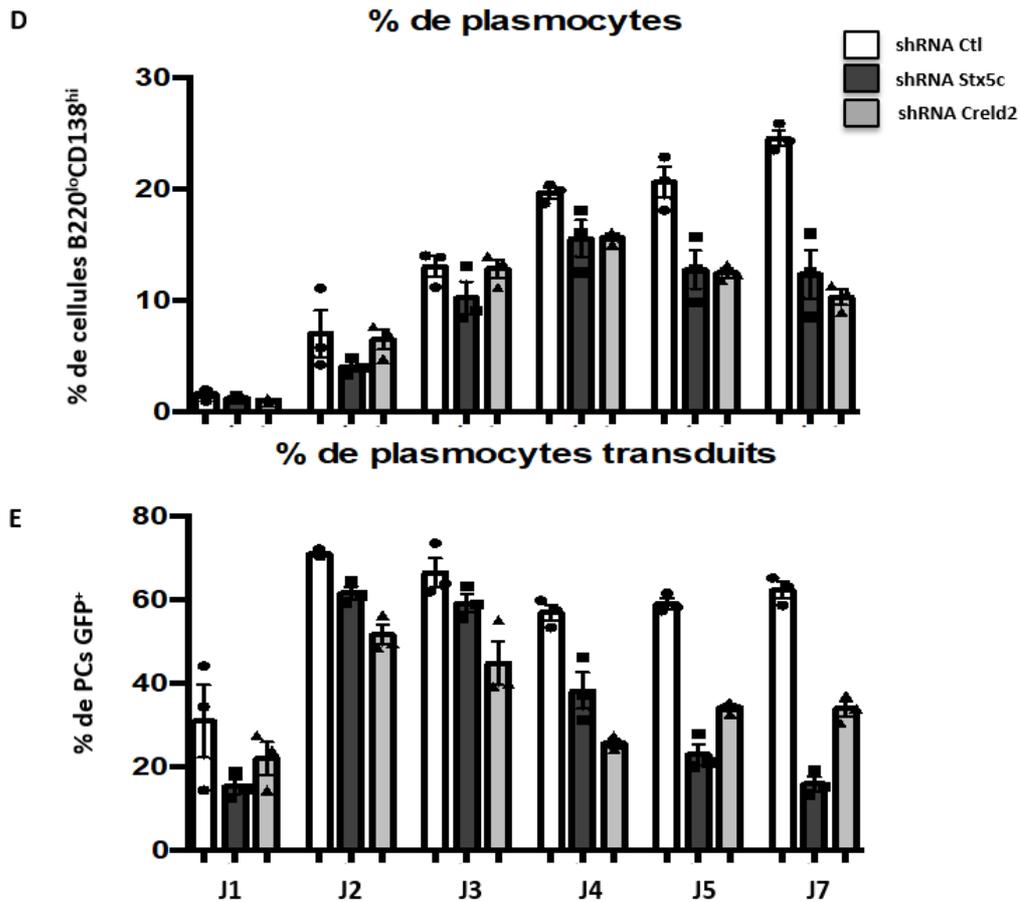


Figure 1.2 : Effet de la Stx5 et de Creld2 sur la différenciation et la survie plasmocytaire *ex vivo*.

(A) Représentation schématique du modèle de différenciation *ex vivo* des cellules B. (B) Histogramme présentant le pourcentage de cellules vivantes déterminé par un marqueur de viabilité en cytométrie de flux (C) Dot plots représentatifs de la fréquence des PCs (B220^{lo} CD138^{hi}) à jour 3 et 5 et de la fréquence des PCs GFP⁺ après transduction avec le contrôle, le vecteur contenant le shRNA Stx5 ou Creld2. (D) Quantification de la fréquence de PCs et (E) des PCs GFP⁺ générés après différenciation avec du LPS à jour 1, 2, 3, 4, 5 et 7 sur les cellules transduites avec le shRNA Stx5 ou Creld2. Les fréquences de cellules CD138 et CD138 GFP⁺ sont présentées comme la moyenne \pm SEM obtenue avec les triplicats d'une expérience réalisée deux fois pour le shRNA Stx5 et une fois pour le shRNA Creld2.

1.3 Rôle de la Stx5 et de Creld2 dans la production et la sécrétion d'anticorps *ex vivo*

La confirmation de la différenciation plasmocytaire des cellules B s'appuie sur leur fonction de production et de sécrétion d'immunoglobulines. Cette caractéristique a été comparée chez les cellules cultivées dans chacune des conditions d'intérêts : cellules transduites avec un vecteur contrôle ou shRNA Stx5 ou shRNA Creld2, par cytométrie en flux et par Elisa.

Par évaluation phénotypique des cellules à l'aide des marqueurs CD138 et IgM (de surface et intracellulaire) nous avons suivi l'évolution de la production d'Ig au cours de la différenciation des cellules entre jour 2 et jour 5. La proportion des PCs GFP⁺ exprimant des IgM pour la Stx5 et le contrôle est quasiment similaire aux jours 2 et 3, de l'ordre de 65% et 75% respectivement (**Figure 1.3A**). A jour 4, cette fréquence baisse pour atteindre 40% avec la Stx5 tandis qu'elle se maintient pour le contrôle. Cette même diminution est entamée plus précocement, à jour 3, pour les cellules Creld2 knock-down. A jour 5, la proportion des cellules CD138⁺GFP⁺IgM⁺, déficientes pour la Stx5 et Creld2, ne représentent plus que 30% de la population cellulaire tandis qu'elle se maintient toujours aux environs de 70% pour les cellules contrôles.

De manière intéressante, nous pouvons observer que l'intensité moyenne de fluorescence du marqueur IgM est augmentée dans les PCs GFP⁺ shRNA Creld2 dès le 2^e jour de différenciation et dès le 3^e jour dans les PCs GFP⁺ shRNA Stx5 ce qui démontre d'une hausse des IgM intracellulaires (**Figure 1.3B**). Les IgM sont bien produites mais bloquées dans la cellule ce qui pourrait se comprendre dans le cas de la Stx5 puisque son inhibition peut bloquer la sécrétion constitutive et donc empêcher le trafic des Ig vers le Golgi. Aux 4^e et 5^e jour cette différence disparaît ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'il y ait moins de PCs GFP⁺ en culture (voir Figure 1.2E).

Par la technique de l'Elisa, nous avons suivi l'évolution de la quantité d'Ac présente dans chaque puits à 2, 3, 4 et 5 jours de culture. Nous avons observé une accumulation graduelle du taux d'IgM au cours du temps dans les puits contrôles (**Figure 3C**). Par contre, dans les puits des cellules transduites avec les particules lentivirales shRNA Stx5 et shRNA Creld2, les taux d'Ig sont 2 à 3 fois inférieur à ceux observés pour le contrôle. Il est néanmoins difficile de statuer quant à la sécrétion des immunoglobulines car la baisse observée dans les puits des cellules déficientes en Stx5 et Creld2 est le reflet de la diminution du nombre de PCs à jour 4 et 5 observée dans la figure 1.2D.

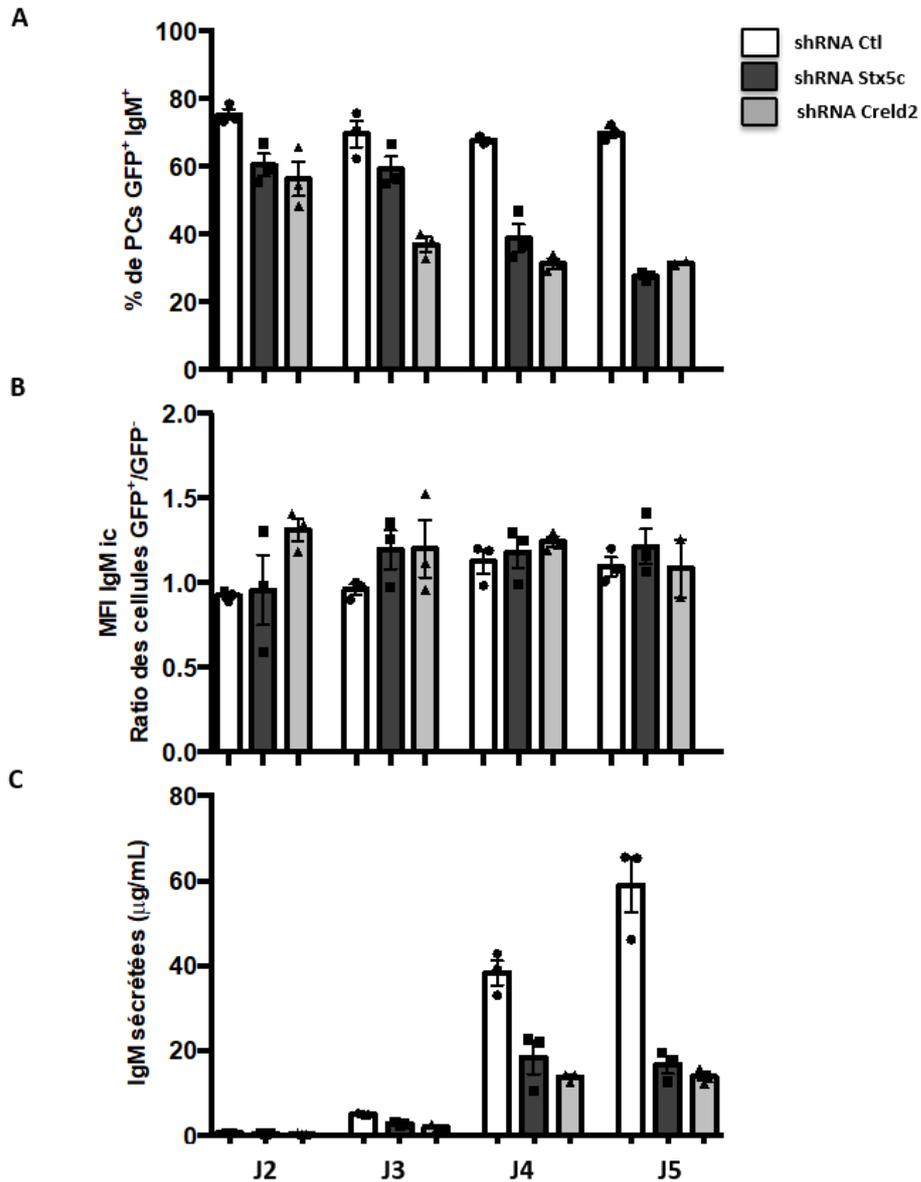


Figure 1.3 : Effet de la Stx5 et de Creld2 sur la production et la sécrétion d'IgM ex vivo.

(A) Analyse de la fréquence des PCs transduits IgM⁺ (CD138^{hi}/GFP⁺/IgM⁺) par cytométrie en flux. (B) Calcul du ratio de l'intensité de la moyenne géométrique de fluorescence des IgM intracellulaires à partir des PCs GFP⁺ et des PCs GFP⁻. (C) Mesure de la sécrétion des IgM dans les surnageants de culture par Elisa. Les analyses sont réalisées entre le jour 2 et le jour 5 post-stimulation.

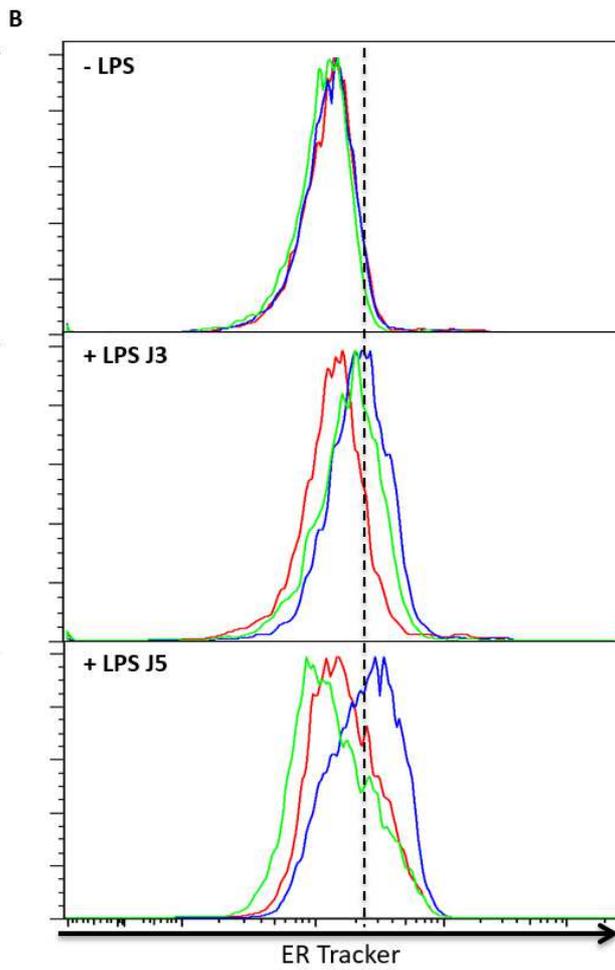
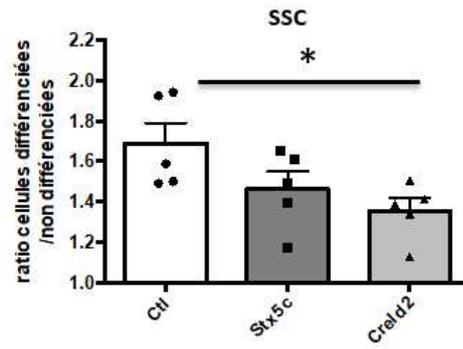
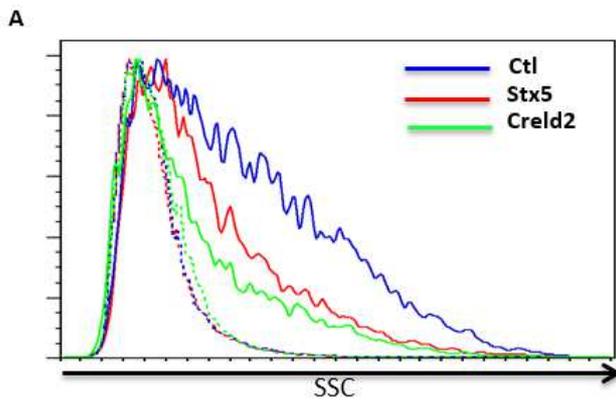
1.4 Etude de l'expansion du réticulum endoplasmique (RE) et de l'autophagie *in vitro*

Nous avons ensuite cherché à comprendre par quels mécanismes la Stx5 et Creld2 affectaient la survie des PCs et la sécrétion d'Ac. Pour cela, nous avons utilisé l'outil que nous avons généré pour valider les shRNA à savoir la lignée I.29.

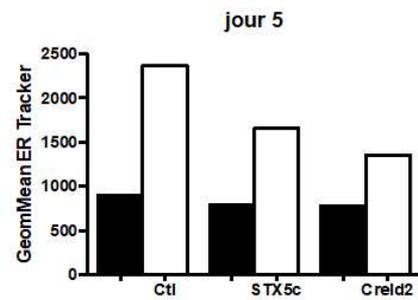
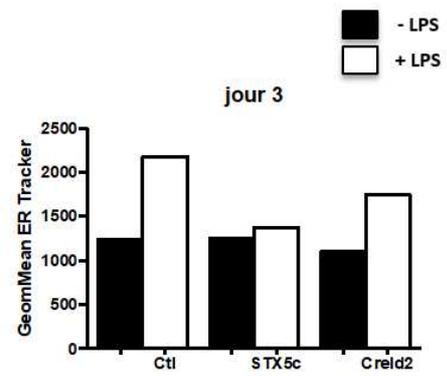
1.4.1 La Stx5 et Creld2 contrôlent l'expansion du RE

La différenciation plasmocytaire est associée à une forte augmentation de la taille et de la granularité cellulaire. C'est également le cas lorsque les cellules I.29 contrôles sont activées avec du LPS (**Figure 4.1A**). Cette expansion cellulaire est moins marquée en l'absence de la Stx5 et diminuée de manière significative en l'absence de Creld2 (**Figure 4.1A**). La granularité correspond à la complexité de la cellule représentée notamment par la densité des organites et les irrégularités internes, de ce fait nous sommes intéressés au RE dont le volume est fortement augmenté dans les plasmocytes. A jour 3, le volume du RE mesuré avec un marqueur spécifique est presque doublé dans les cellules contrôles. La réduction de l'expression de la Stx5 semble bloquer ou tout du moins retarder l'expansion des membranes du RE (**Figure 4.1B**). L'inhibition de Creld2 n'empêche pas l'expansion du RE (jour 3) néanmoins le volume membranaire est bien inférieur à celui du contrôle (**Figure 4.1B**).

Enfin, nous avons souhaité confirmer par microscopie électronique que cette réduction de la granularité était bien due à un défaut d'expansion du RE. Nos données préliminaires soutiennent effectivement ces résultats (**Figure 4.1C**). Dans les cellules non différenciées, le RE est très fin et à proximité immédiate du noyau qui occupe une position centrale au sein de la cellule. Lorsque les cellules sont stimulées, le RE s'expand et plus particulièrement dans les cellules contrôles par rapport aux cellules Stx5 et Creld2 knock-down. En plus de s'expandre et de repousser le noyau vers une extrémité de la cellule, le RE présente des saccules hyper-dilatés témoignant d'une très forte production d'Ac. Cette forme très dilatée du RE est peu retrouvée dans les cellules Stx5 et Creld2 knock-down. Une quantification du volume de RE détecté par microscopie électronique est en cours.



— Ctl
— Stx5
— Creld2



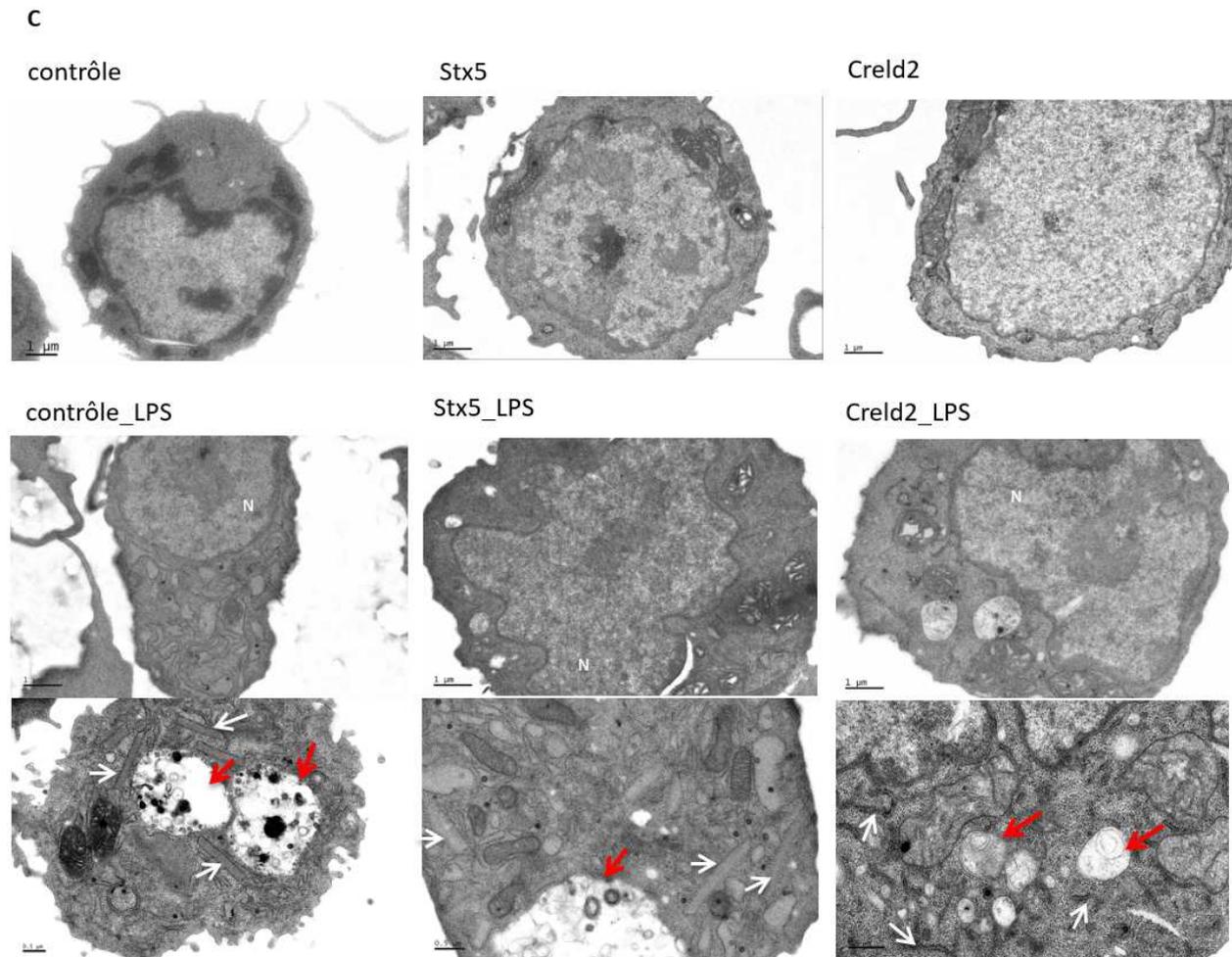


Figure 1.4.1 : La Stx5 et creld2 contrôlent l'expansion du RE.

(A) Analyse par cytométrie en flux de la granularité des cellules différenciées par le LPS ou non à jour 5. Les traits pleins correspondent aux cellules stimulées et les pointillés correspondent aux cellules non stimulées. Représentation du ratio de la moyenne géométrique de la taille SSC des cellules différenciées et non différenciées de 5 expériences indépendantes. (B) Histogramme d'une expérience représentative sur 3 de la détection du RE par une sonde spécifique à jour 3 et 5. (C) Images analysées par microscopie électronique pour les cellules contrôles, Stx5 et Creld2 knock-down non stimulées et stimulées pendant 4 jours. Les flèches blanches pointent le RE, les rouges pointent les autophagosomes. Echelle : 1 μM et 0,5 μM pour les 3 dernières photos.

1.4.2 La Stx5 et Creld2 contrôlent l'autophagie

L'autophagie est un processus très important dans la physiologie et la maintenance des PCs en supportant le métabolisme énergétique et la viabilité au dépend de l'expansion du RE et de la synthèse des Ig (Pengo et al., 2013). D'après la littérature, le complexe Stx5 SNARE pourrait être impliqué dans la régulation de ce phénomène (Renna et al., 2011). L'autophagie s'accompagne d'une augmentation des compartiments acides qui peut être mesurée avec un marqueur spécifique. Pour cela, nous avons utilisé une sonde fluorescente, le LysoTracker Red DND-99, capable de traverser librement les membranes cellulaires des cellules vivantes et de s'accumuler sélectivement dans les organites acides et nous avons pu confirmer cette augmentation dans les cellules I.29 différenciées (**Figure 1.4.2A**). Pourtant dans les cellules I.29 shRNA knock-down, le marquage à l'aide de la sonde est beaucoup plus faible ce qui signifie que le nombre ou le volume des compartiments acides est affecté.

Considérant ce résultat, nous avons voulu vérifier de manière plus directe si l'autophagie et en particulier la formation des autophagosomes qui correspond à un stade plus précoce que le recrutement des lysosomes (voir figure 15 dans la partie Introduction) étaient touchés. Sachant que la protéine LC3 est présente de la formation du phagophore jusqu'à la destruction de l'autolysosome, nous avons réalisé un western-blot contre cette protéine. Celle-ci se décline sous 2 formes, la forme LC3-I qui est la forme soluble de la protéine et la forme LC3-II qui est la forme membranaire. Après stimulation, des cellules I.29, nous observons bien une augmentation de la forme membranaire vis-à-vis de la forme soluble (**Figure 1.4.2B**), confirmant la différenciation plasmocytaire dans notre système. En revanche, cette augmentation est diminuée de moitié dans les cellules Creld2 knock-down et très fortement diminuée dans les cellules Stx5 knock-down ce qui suggère un défaut de la formation des autophagosomes lorsque l'expression de ces deux protéines est réduite. Nous pourrions confirmer ce résultat par microscopie électronique après étude d'un nombre suffisamment grand de photos.

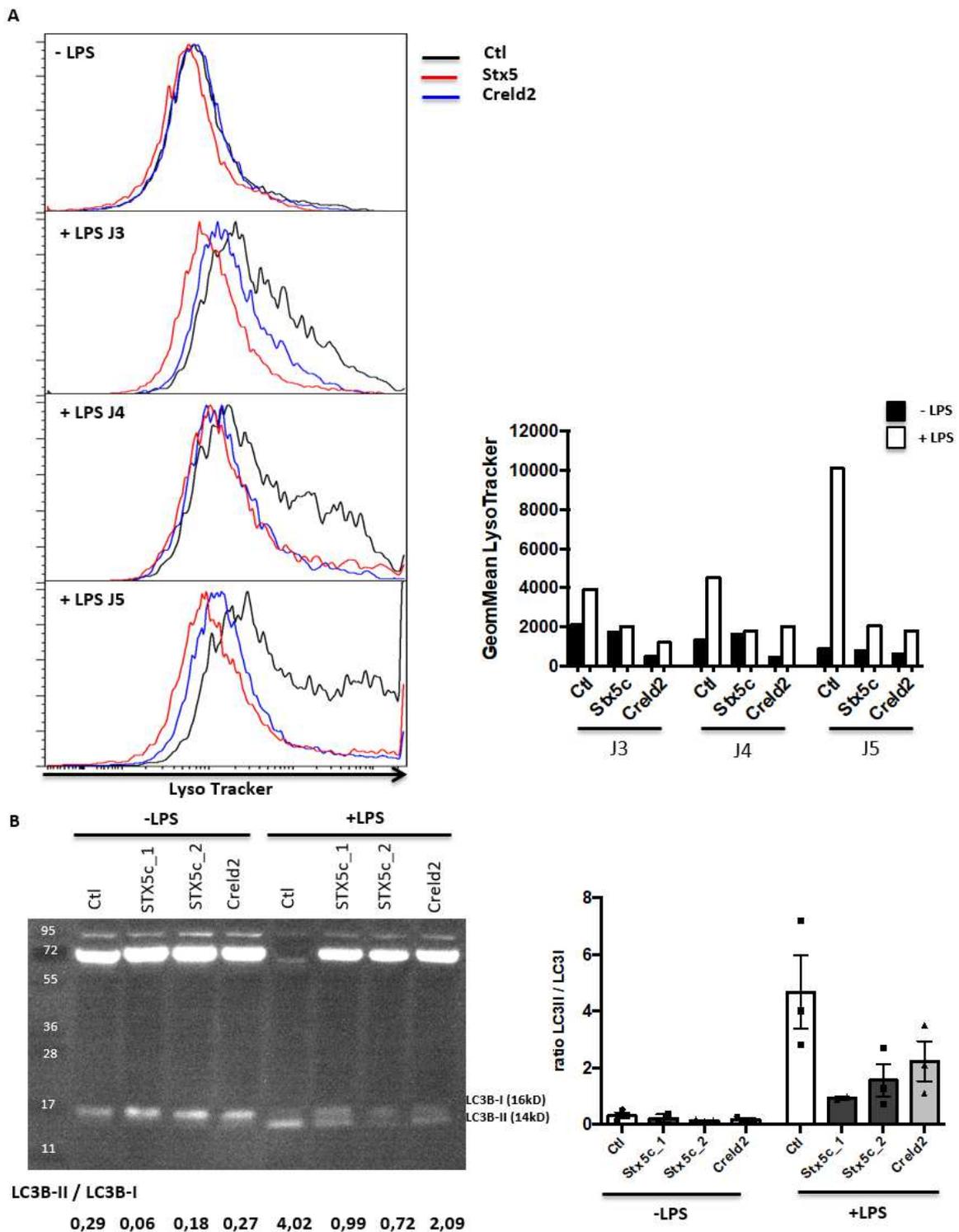


Figure 1.4.2 : La Stx5 et Creld2 jouent un rôle dans l'autophagie.

(A) Analyse par cytométrie en flux des lysosomes avec la sonde spécifique des compartiments acides sur cellules différenciées par le LPS ou non à jour 3, 4 et 5 (gauche). Histogramme de la moyenne géométrique du LysoTracker, représentatif de 3 expériences indépendantes (droite). (B) Western-blot représentatif de la détection de la protéine LC3 dans le lysat de cellules I.29 stablement transduites avec les vecteurs indiqués, à l'état basal (-LPS) et après 5 jours d'activation (+LPS) (gauche). Histogramme présentant le ratio de la quantification de l'intensité des bandes LC3-II et LC3-I de 3 expériences indépendantes (droite).

2 Etude de l'impact de Creld2 à l'aide d'un modèle de souris knockout

Suite aux résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo*, nous avons obtenu un modèle murin permettant la délétion conditionnelle de Creld2 afin d'étudier son effet sur la différenciation, la survie et la sécrétion des PCs *in vivo*. Nous avons croisé ce modèle Creld2 floxé avec des souris exprimant une cre-recombinase placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des LB (mb1-cre) afin d'obtenir une délétion spécifiquement dans les cellules de la lignée B. Le gène *mb1* code pour la sous-unité de signalisation du BCR, CD79A, qui est exprimé exclusivement dans les cellules B à partir du stade pro-B dans la moelle osseuse (Hobeika, 2006). L'intégration d'une cre recombinase humanisée dans le locus du gène *mb1* permet d'obtenir une recombinaison très efficace entre les sites loxP.

Les souris expérimentales sont les souris homozygotes pour Creld2 floxé et exprimant la cre soit $mb1\text{-cre}^{\text{tg}/+} \text{Creld2}^{\text{fl/fl}}$ ($\text{Creld2}^{\text{B-KO}}$) et hétérozygotes pour Creld2 floxé et exprimant la cre soit $mb1\text{-cre}^{\text{tg}/+} \text{Creld2}^{\text{fl/+}}$ ($\text{Creld2}^{\text{B-Het}}$), et nos contrôles sont les souris $mb1\text{cre}^{+/+} \text{Creld2}^{\text{fl/fl}}$ ($\text{Creld2}^{\text{WT}}$). Dans un premier temps, la différenciation B et les populations plasmocytaires ont été caractérisées phénotypiquement dans la rate et la moelle osseuse de ces souris à l'état basal. Les taux sériques d'immunoglobulines ont également été mesurés par ELISA. Dans un second temps, la réponse humorale de ces souris a été étudiée suite à une immunisation avec un antigène T-dépendant et les réponses immunes primaires, secondaires et mémoires ont été étudiées.

2.1 Invalidation de Creld2 dans les cellules B

A partir de 10 millions de splénocytes nous avons effectué un enrichissement en cellules B. Deux millions de cellules ont été cultivées dans du milieu de culture pour I.29 additionné avec du LPS, de l'IL-4 et de l'IL-5 afin de les différencier *in vitro* en PCs. Des western-blots ont été réalisés sur des lysats de cellules B enrichies à J0 et sur des B différenciées à J4 afin de valider notre modèle de souris Creld2 KO dans les cellules B.

Nous avons confirmé que Creld2 est surexprimé dans des cellules B de la rate différenciées *in vitro* pendant 4 jours avec du LPS. Pour les 3 souris $\text{Creld2}^{\text{B-KO}}$, la protéine Creld2 n'est plus que faiblement détectable dans les cellules B non-différenciées et différenciées (la population de PCs représente environ 15% des cellules, donnée de cytométrie en flux). Nous avons donc un modèle murin où Creld2 est bien délété dans les cellules B des souris knock-out (**Figure 2.1**).

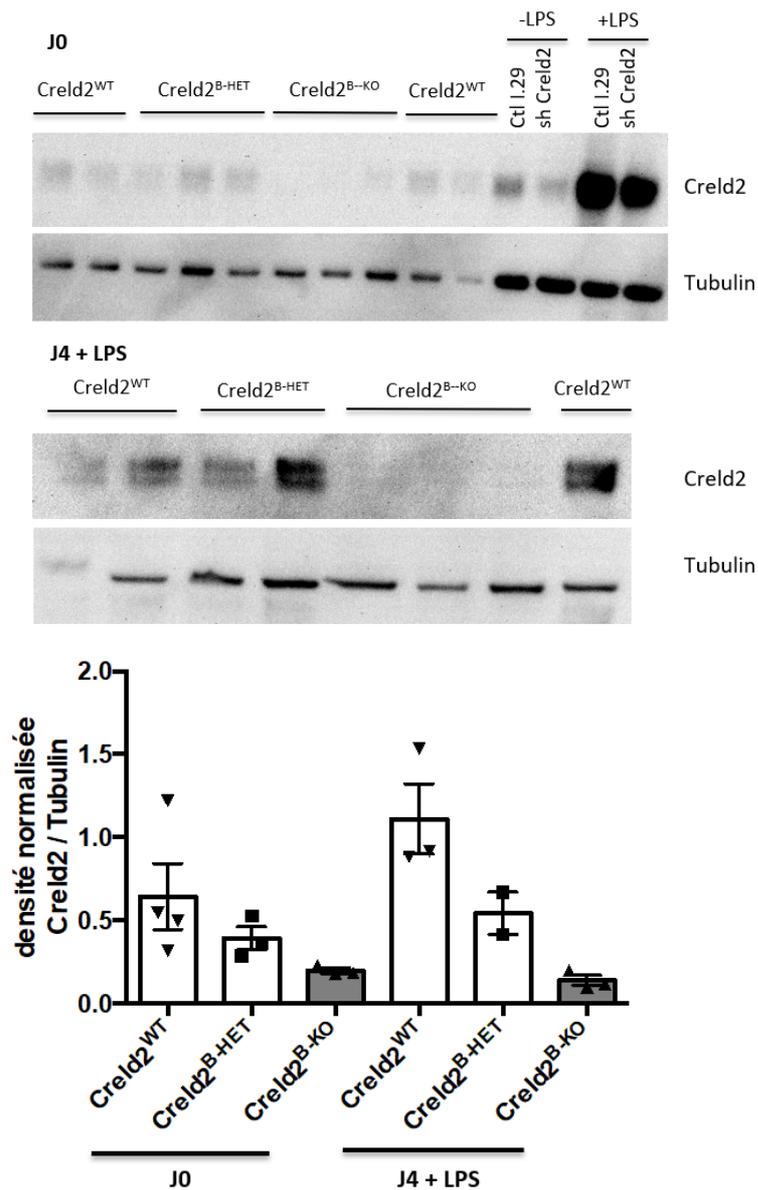


Figure 2.1 : Invalidation de Creld2 dans les cellules B.

Détection de la protéine Creld2 par Western-blot avec un Ac anti-Creld2 polyclonal dans les extraits de cellules B spléniques, enrichies et cultivées *in vitro* pendant 4 jours avec du LPS. Les protéines totales sont détectées par un Ac dirigé contre la Tubulin (haut). Normalisation de l'intensité des bandes Creld2 avec la Tubulin (bas). Il s'agit d'une expérience menée avec 3-4 souris par groupe.

2.2 Creld2 n'est pas indispensable à la maturation des LB

Après avoir validé notre modèle, nous avons procédé à l'étude du développement des cellules B par analyse multiparamétrique en cytométrie de flux.

Les cellules B de la MO ont été sélectionnées sur la base des marqueurs B220, IgM, CD93 et Igκ. Les PCs de la MO qui sont entièrement différenciés, sont caractérisés par l'expression du marqueur CD138 et la perte d'expression du marqueur B220.

Nous avons mis en évidence que les cellules B immatures et matures des souris invalidées pour Creld2 se développent de façon équivalente à celles des souris contrôles (**Figure 2.2A**) et il en va de même pour le nombre de PCs totaux (**Figure 2.2B**).

Dans la rate, les cellules B spléniques peuvent être divisées en B immatures (transitionnelles (T)1, T2, T3), en B matures folliculaires (B Fo) et en B matures de la zone marginale (B MZ) basé sur l'expression des marqueurs AA4.1, IgM, B220, CD23 et CD21 comme décrit par (Ogura et al., 2017).

En périphérie, le nombre des différentes sous-populations de B et des PCs se maintient entre les souris des 3 groupes (**Figure 2.2 C, D et E**).

En conclusion, il n'y a pas de différence notable dans la maturation des LB en l'absence de Creld2.

Au niveau de la sécrétion d'Ac à l'état basal, on observe une légère diminution des IgG et des IgA dans le sérum des souris (non montré).

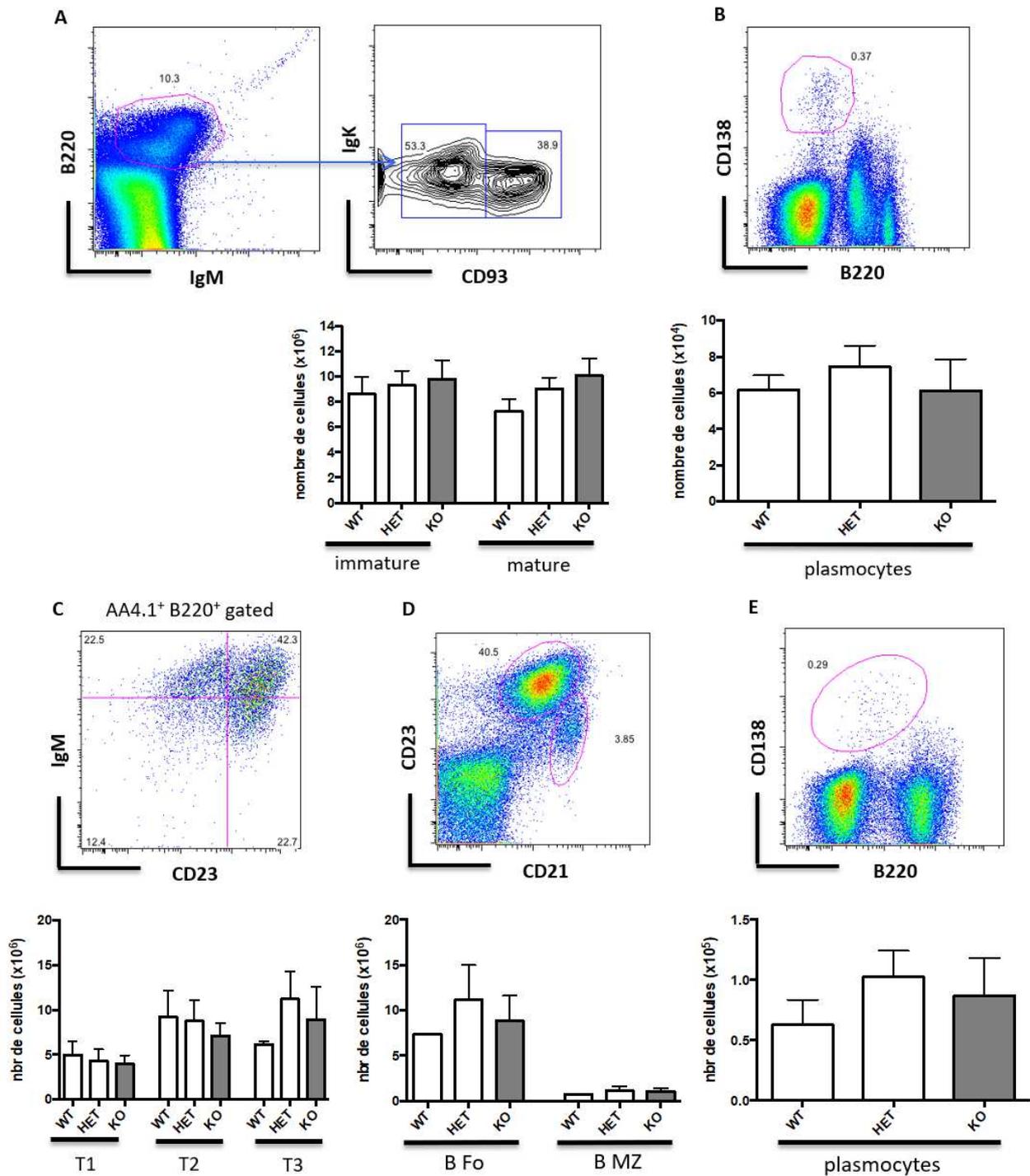


Figure 2.2 : Développement des LB chez les souris mb1-cre x Creld2.

Analyse par cytométrie en flux du développement des cellules B dans la moelle osseuse (A et B) et dans la rate (C, D et E) de souris sauvages (WT) et de souris où Creld2 est délété sur un allèle (HET) ou sur les deux allèles (KO). Les sous-populations de B sont définies par les marqueurs de surface suivants : les cellules de la moelle osseuse, B immatures (B220^{low}/IgM⁺/CD93⁺), B matures (B220^{high}/IgM⁺/CD93⁺), PCs (B220⁺/CD138⁺); les cellules de la rate B transitionnels T1 (B220⁺/AA4.1⁺/IgM^{high}/CD23⁺), T2 (B220⁺/AA4.1⁺/IgM^{high}/CD23⁺), T3 (B220⁺/AA4.1⁺/IgM^{low}/CD23⁺), les cellules B folliculaires (Fo) (CD21⁺/CD23^{high}), et les cellules B de la zone marginale (MZ) (CD21⁺/CD23^{low}). Les histogrammes représentent le nombre absolu de cellules pour 3 expériences d'environ quatre souris par groupe pour la MO et d'une expérience représentative sur 2 pour la rate.

2.3 Immunisation T-dépendante : réponse primaire et secondaire

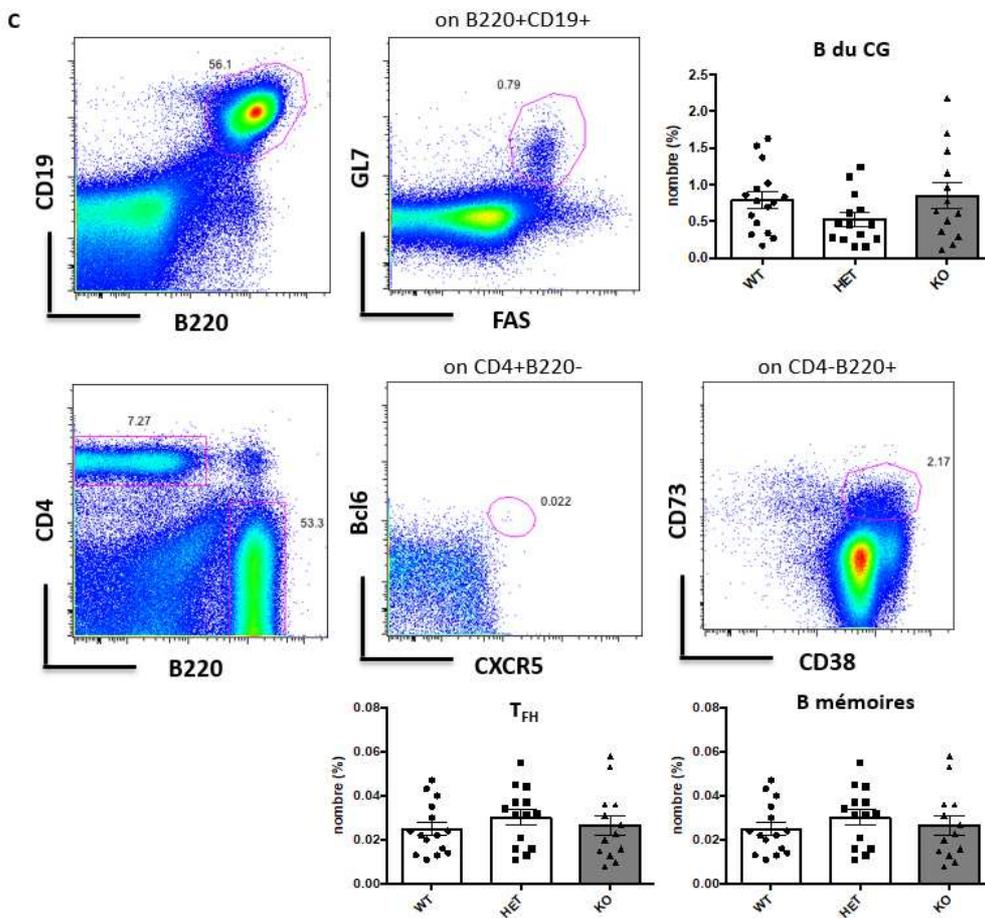
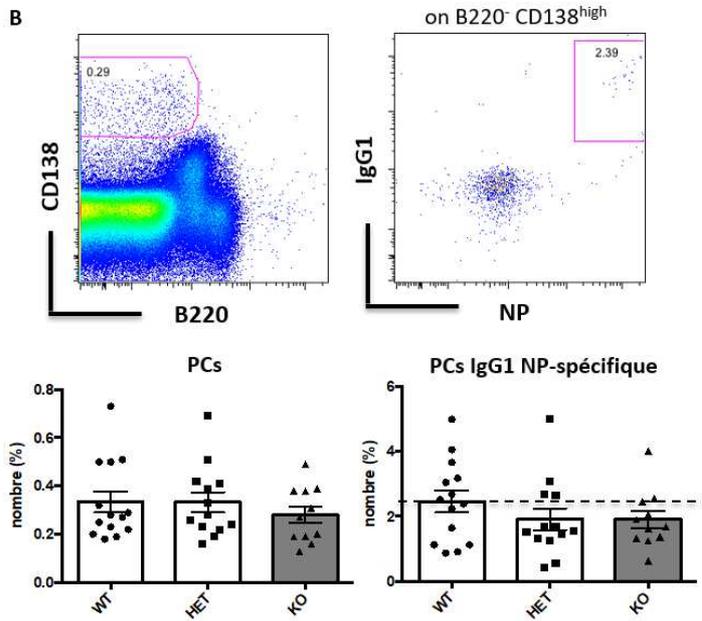
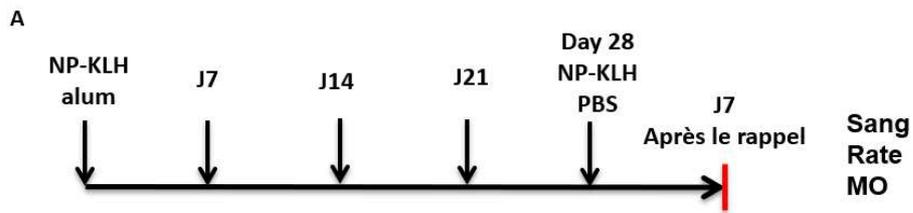
2.3.1 Absence de défaut de différenciation lymphocytaire

Les souris contrôles et creld2 floxées ont été immunisées avec 100ug de 4-hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-Keyhole Limpet Hemocyanin (NP-KLH) émulsifié avec de l'hydroxyde d'aluminium (Alum) par voie intrapéritonéale, deux fois, à 28 jours d'intervalle afin de mesurer la réponse immune primaire et secondaire. Le développement de la réponse immune est mesuré par analyse des titres sériques d'Ac spécifiques de NP par Elisa tous les 7 jours suivants la première injection puis 7 jours après le rappel antigénique lors de l'euthanasie des souris. Les organes lymphoïdes (rate et MO) sont prélevés pour être analysés par cytométrie en flux et par ELISpots. **(Figure 2.3.1A).**

Dans la MO, les cellules B immatures et matures des souris invalidées pour Creld2 se développent de façon équivalente à celles des souris contrôles. Le pourcentage de plasmocytes totaux est équivalent pour les 3 groupes. Cependant, les souris Creld2^{B-KO} et Creld2^{B-HET} semblent présenter légèrement moins de PCs IgG1 spécifiques de NP que les souris Creld2^{WT} **(Figure 2.3.1B).**

Dans la rate, le pourcentage de cellules B du CG et de PCs des souris KO est comparable à celui des souris WT, ce qui suggère que la réponse immune est normale. L'absence de Creld2 ne semble pas impacter non plus les populations des cellules T_{FH} et des B mémoires **(Figure 2.3.1C).** Les pourcentages de PCs IgM et IgG1 spécifique de NP sont également comparables entre les 3 groupes de souris.

Les souris mutantes sont donc capables de monter une réponse immunitaire T-dépendante efficace.



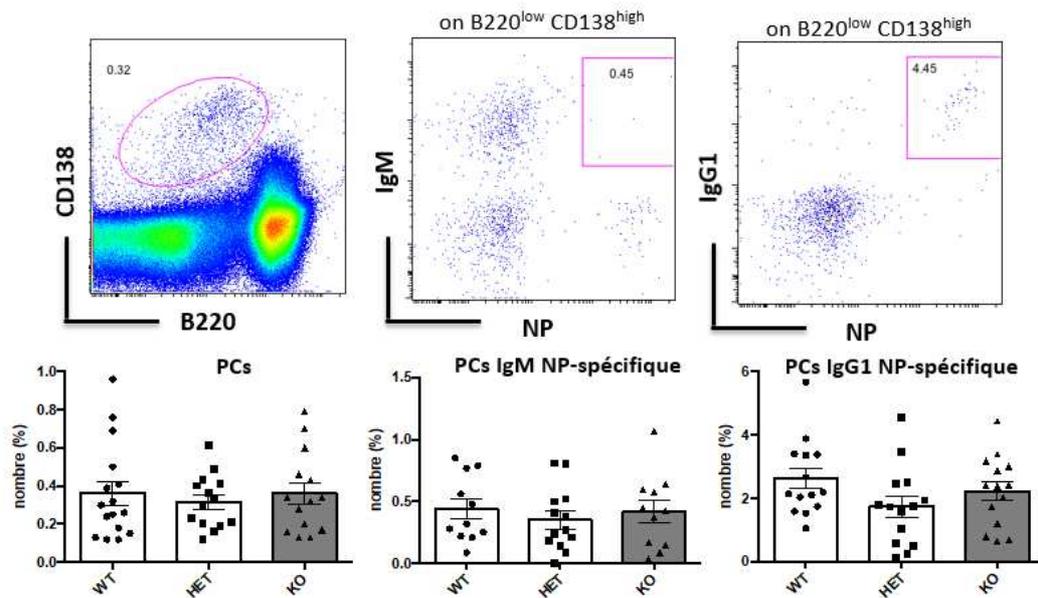


Figure 2.3.1 : Développement de la réponse immune T-dépendante.

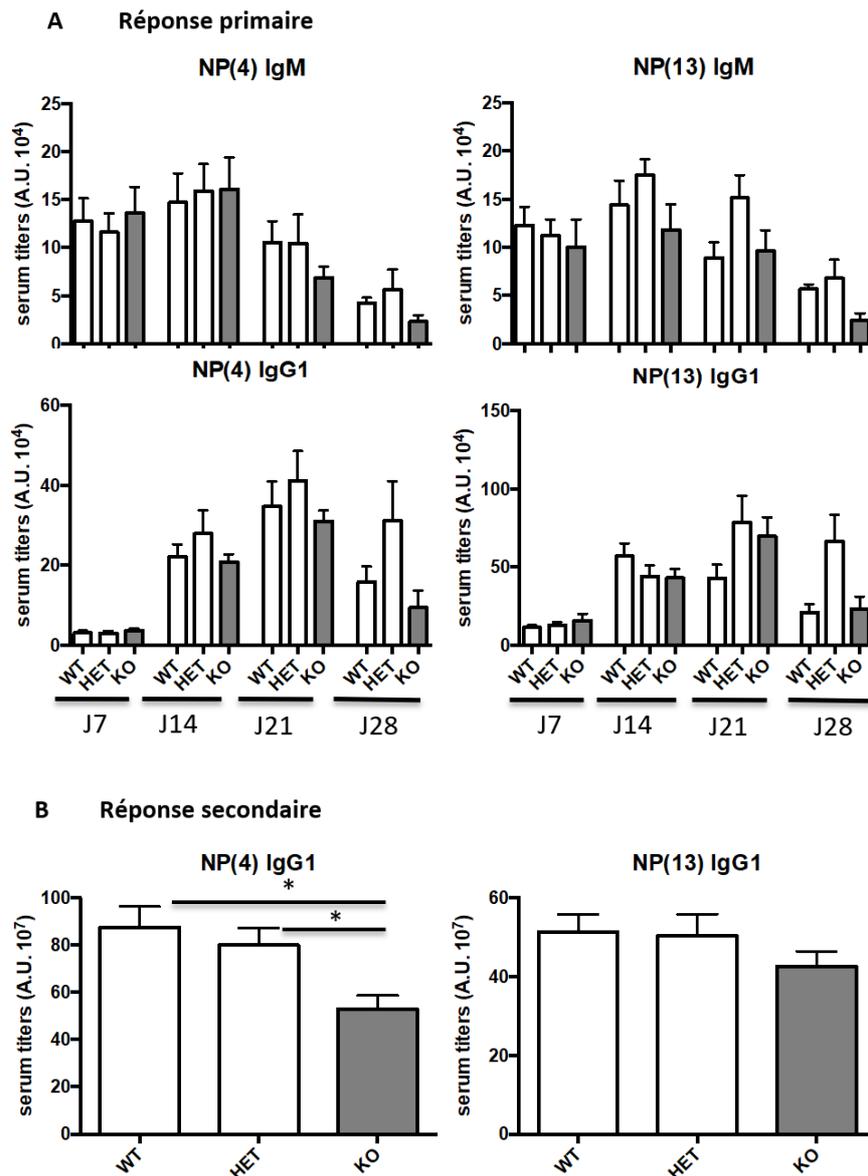
(A) Diagramme représentatif du protocole d'immunisation T-dépendante avec les différents points d'expériences. (B) Analyse par cytométrie en flux des cellules B dans la moelle osseuse, les cellules B immatures sont CD93⁺/IgK⁺, les B matures sont CD93⁻/IgK⁺, les PCs sont B220⁻/CD138⁺ et les PCs IgG1 spécifiques de NP sont CD138⁺/NP⁺/IgG1⁺. (C) Analyse par cytométrie en flux des cellules B dans la rate, les cellules B du centre germinatif sont FAS^{high}/GL7^{high}, les cellules T folliculaires helpers (T_{FH}) sont CD4⁺/CXCR5^{high}/BCL6^{high}, les cellules B mémoires sont B220⁺/CD38^{high}/CD73^{high}, les PCs sont B220⁻/CD138⁺, les PCs IgM spécifiques de NP sont CD138⁺/NP⁺/IgM⁺ et les PCs IgG1 spécifiques de NP sont CD138⁺/NP⁺/IgG1⁺. Les histogrammes représentent le pourcentage de chaque population de B dans les 3 groupes de souris. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

2.3.2 Etude de la sécrétion d'Ac par Elisa

Après la première injection, l'analyse des taux sériques d'Ac anti-NP suggère que les souris Creld2^{B-KO} montent une réponse immunitaire Ag-spécifique similaire aux souris Creld2^{WT} et Creld2^{B-HET}. En revanche, à partir de jour 21, soit 3 semaines après la première injection, les taux d'IgM et d'IgG1 spécifiques de NP diminuent chez les souris KO alors qu'ils se maintiennent chez les souris HET et WT. Au jour 28, les niveaux d'Ac circulants commencent à diminuer et ils semblent plus faibles dans le sérum des souris Creld2^{B-KO} par rapport aux 2 autres groupes (**Figure 2.3.3A**).

La réponse secondaire est beaucoup plus rapide et plus intense que la réponse primaire, en effet le taux d'Ac atteint 7 jours après la deuxième injection est 1000 fois plus élevé que lors de la réponse primaire. De façon intéressante, les taux d'IgG1 spécifiques de NP, de forte affinité (se fixant au NP(4)) sont significativement plus bas pour les souris Creld2^{B-KO} par rapport aux souris Creld2^{WT} et Creld2^{B-HET} (**Figure 2.3.3B**).

Le ratio NP4/NP13 nous permet de juger de la maturation d'affinité des Ac spécifiques de NP. Nous confirmons que l'affinité des Ac est plus élevée au cours de la réponse secondaire qu'au cours de la réponse primaire. Nos résultats montrent que les IgG1 produites par les souris CreId2^{B-KO} sont beaucoup moins affines pour le NP que celles produites par les 2 groupes de souris contrôles suggérant un défaut de maturation et/ou un défaut de maintien au long cours des plasmocytes de forte affinité (**Figure 2.3.3C**).



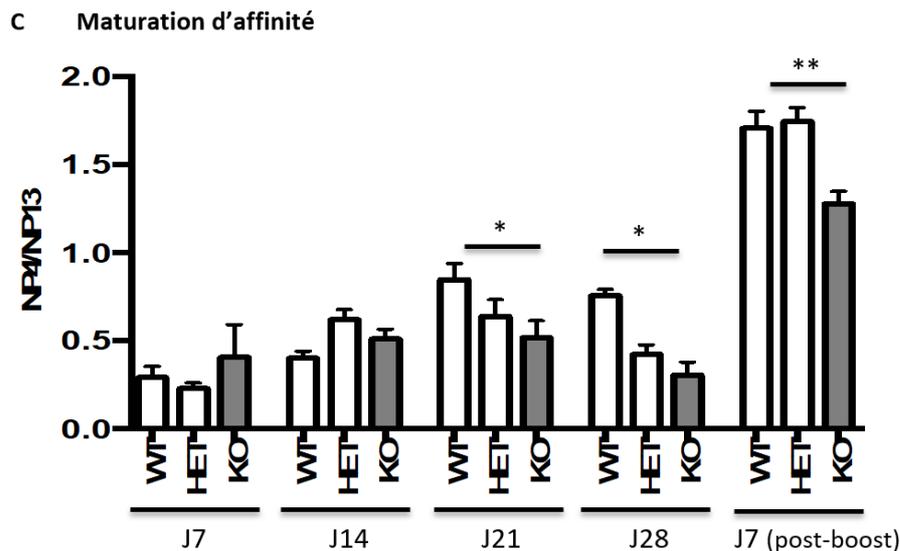


Figure 2.3.3 : L'absence de Creld2 affecte la maintenance et la maturation d'affinité des Ac

Détermination des titres d'Ac NP-spécifique dans le sérum des souris (A) lors de la réponse primaire à jour 7, 14, 21 et 28 et (B) lors de la réponse secondaire, 7 jours après le rappel. Lors de la réponse primaire, les IgM et les IgG1 de faible (NP4) et de forte affinité (NP13) sont dosées. Lors de la réponse secondaire, seules les IgG1 de faible affinité et de forte affinité sont dosées. (C) Le rapport NP4/NP13 permet de mesurer la maturation d'affinité des Ig lors des réponses primaires et secondaires. Moyenne +/- SEM, n=2 pour la réponse primaire et n=3 pour la réponse secondaire. Test statistique Mann-Whitney *p<0,05 et **p<0,01.

2.3.3 Etude de la sécrétion d'Ac par ELISpot

A l'issue du rappel antigénique, la fréquence des cellules sécrétrices d'Ac ainsi que leur capacité sécrétoire intrinsèque au sein de la MO et de la rate a été évaluée par ELISpot. Après quantification des cellules sécrétrices d'IgG1 spécifiques de NP(4), il n'y a pas de différence entre les différents groupes de souris dans la rate. En revanche, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative de ces cellules dans la MO des souris Creld2^{B-KO} par rapport aux souris Creld2^{WT}. Le groupe de souris Creld2^{B-HET} semble présenter 2 populations distinctes, l'une avec un faible niveau de spots spécifiques de NP, l'autre avec un niveau de spots comparable aux souris WT. L'intensité des spots représente la sécrétion d'Ac par une cellule. Bien que non significatif, cette sécrétion semble légèrement plus faible pour les cellules issues de la MO des souris KO par rapport aux 2 autres groupes (**Figure 2.3.2**).

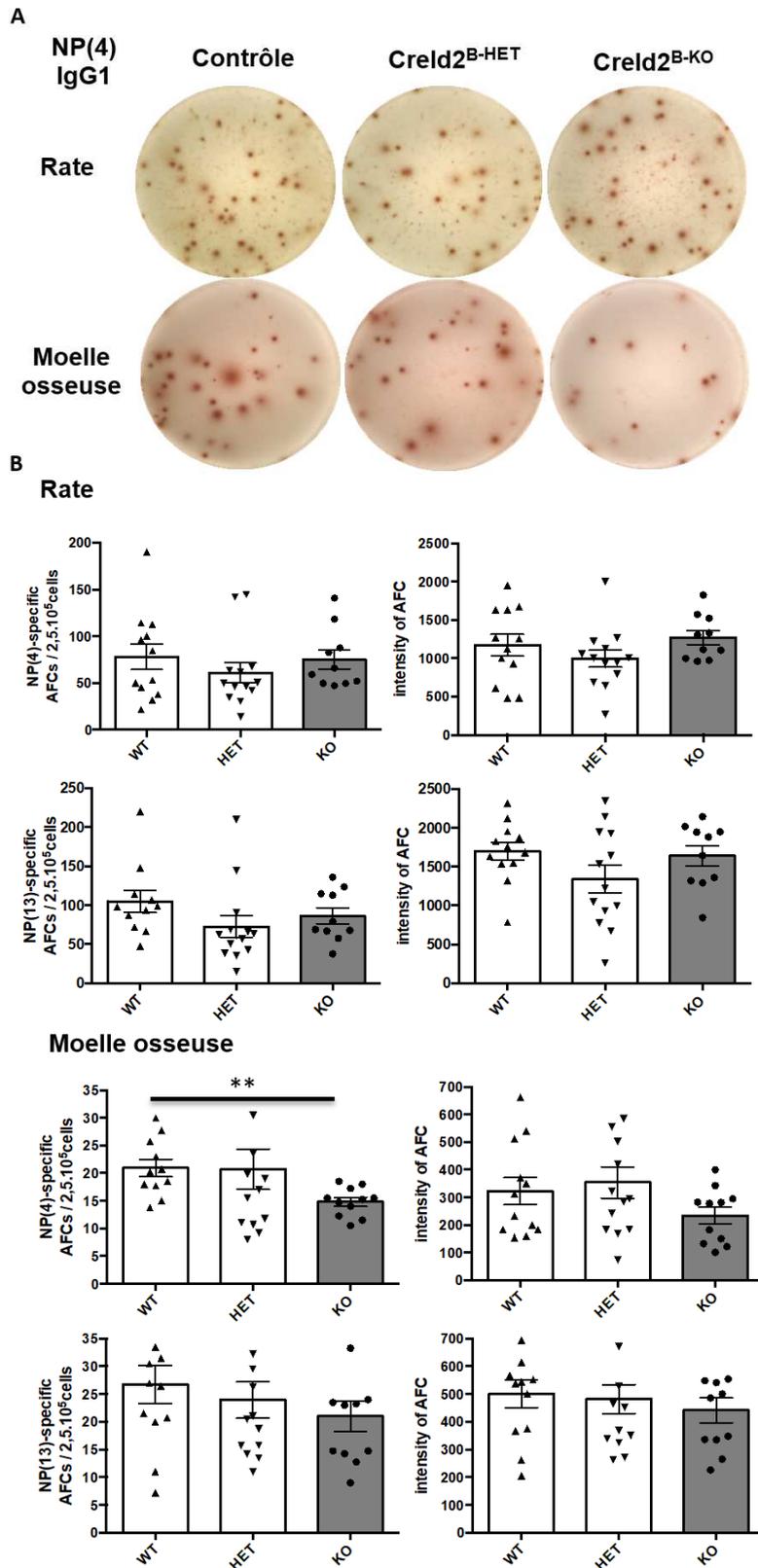


Figure 2.3.2 : Diminution de la sécrétion d'Ac chez les souris Credl2 KO.

(A) Puits représentatifs de la sécrétion d'IgG1 par les cellules de la rate et de la moelle osseuse (250 000 cellulesensemencées). (B) Fréquence et intensité des spots correspondant aux cellules sécrétrices d'Ac (IgG1) spécifiques de NP(4) et de NP(13) dans la rate et la MO des souris contrôles (WT) et Credl2 floxés (HET et KO). Les résultats correspondent à 3 expériences combinées. Test statistique Mann-Whitney, **p < 0,01.

2.4 Immunisation T-dépendante : réponse mémoire

2.4.1 Rôle de Creld2 dans le maintien des différentes populations de la réponse immune

La réponse mémoire a été évaluée 32 jours après le rappel antigénique (NP-KLH). Dans la MO, le nombre de PCs est comparable entre les 3 groupes. Le nombre d'IgG1 spécifique de NP varie beaucoup entre les souris d'un même groupe, il est donc difficilement interprétable. Dans la rate, les nombres de Tfh, de B mémoires et de B du CG semblent légèrement diminués chez les souris Creld2^{B-KO} par rapport aux souris Creld2^{WT}. Enfin, le nombre de PCs de la rate est équivalent entre les 3 groupes. De plus, les PCs IgM⁺ et IgG1⁺ spécifiques de NP dans la rate ne sont plus détectables par cytométrie en flux. (**Figure 2.4.1**)

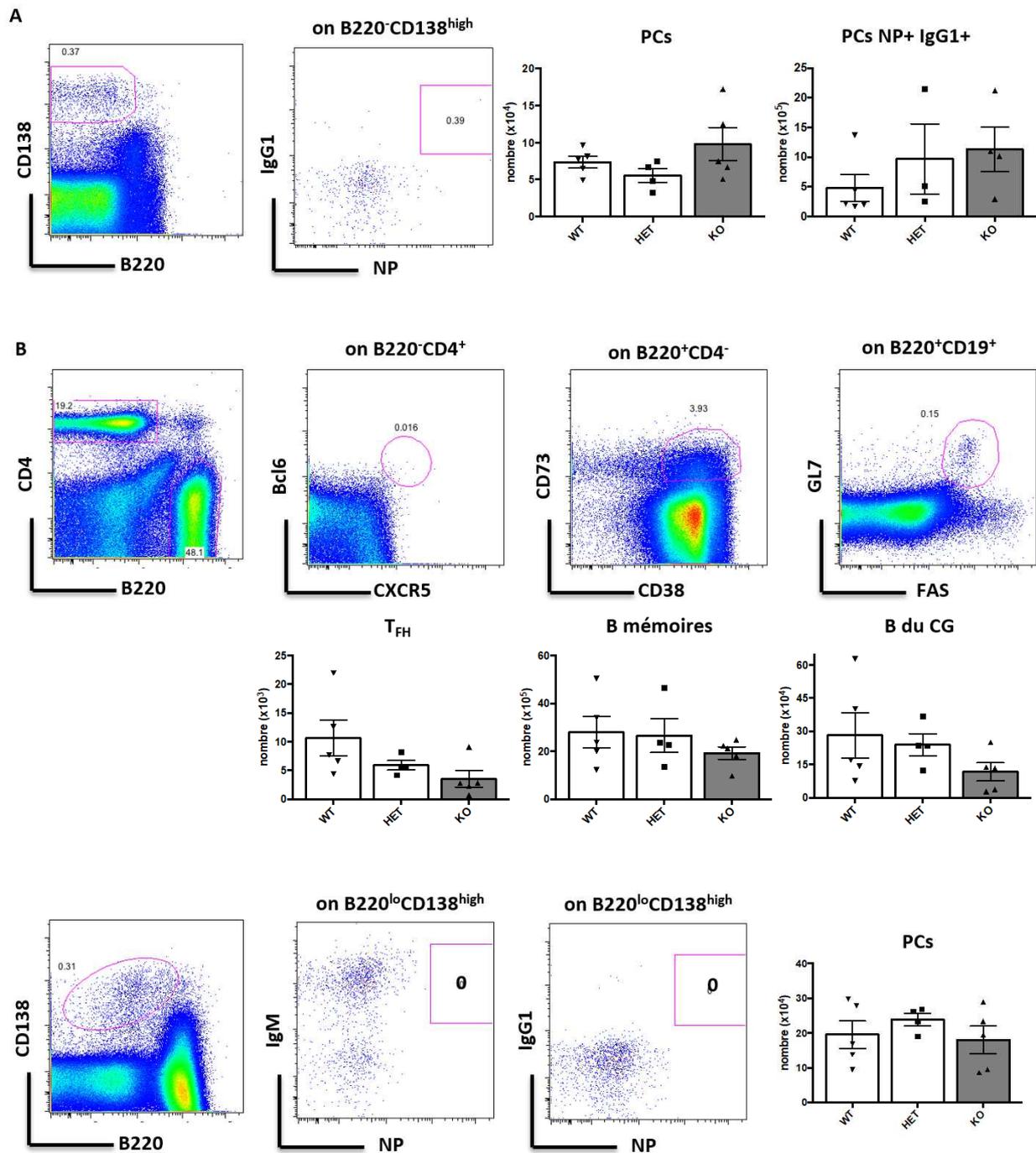


Figure 2.4.1 : Réponse mémoire

Analyse par cytométrie en flux des cellules B (A) dans la moelle osseuse les PCs sont B220⁻/CD138^{high} et les PCs IgG1 spécifiques de NP sont CD138⁺/NP⁺/IgG1⁺ et (B) dans la rate les cellules T folliculaires helpers (T_{FH}) sont CD4⁺/CXCR5^{high}/BCL6^{high}, les cellules B mémoires sont B220⁺/CD38^{high}/CD73^{high}, les cellules B du centre germinatif (CG) sont FAS^{high}/GL7^{high} et les PCs sont B220^{lo}/CD138⁺. Les histogrammes représentent le nombre absolu de cellules pour chaque population de B dans les 3 groupes de souris. Les résultats sont issus d'une seule expérience.

2.4.2 Rôle de Creld2 dans le maintien au long cours de la sécrétion d'Ig

Un mois après l'immunisation secondaire, il semblerait que les niveaux d'Ac circulants soient comparables entre les 3 groupes (**Figure 2.4.2A**), néanmoins lorsqu'on observe la maturité des Ac, celle-ci est plus faible chez les souris Creld2^{B-KO} confirmant les résultats obtenus lors de la réponse secondaire. Le fait que les Ac soient présents en quantité égale sous-entend qu'il n'y a pas de problème de survie des PCs dans la MO. Le défaut de maturation de l'affinité pourrait être dû à un problème de sélection ou d'hypermutations somatiques dans la zone sombre des CGs. Il pourrait également être dû à un défaut de survie spécifiquement des plasmocytes de forte affinité. De plus les B du CG et les T_{FH} se sont « résorbées » plus rapidement chez les souris KO que chez les souris contrôles. Par Elispot, nous avons mis en évidence une légère diminution des PCs spécifiques de NP dans la MO (**Figure 2.4.2B**).

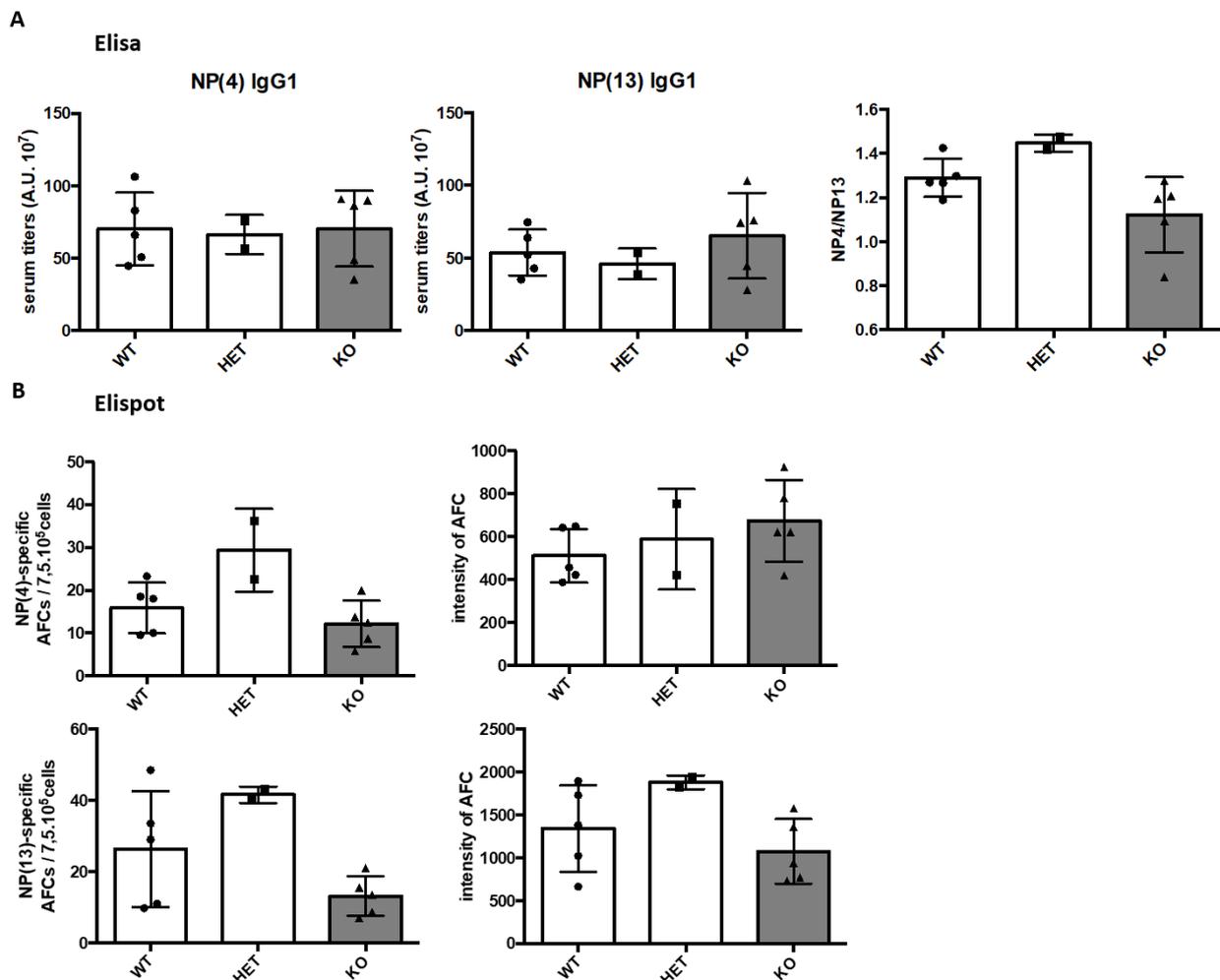


Figure 2.4.2 : Etude de la sécrétion d'Ac un mois suivant le rappel antigénique

Détermination des titres d'IgG1 NP(4) et (13)-spécifiques dans le sérum des souris lors de la réponse mémoire par (A) Elisa et (B) Elispot. Expérience réalisée une seule fois.

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie1 : Modèle cellulaire

Les PCs jouent un rôle central au sein de la réponse immune humorale et notamment dans la protection contre les infections ou dans le cas de la vaccination car ce sont de véritables usines de production d'Ac. Cependant, les mécanismes contrôlant la production et la sécrétion de ces très grandes quantités d'anticorps et ceux permettant aux PCs de survivre à une telle charge protéique sont encore mal connus. C'est dans ce contexte que Marion Espéli en collaboration avec Andrew Peden (Université de Sheffield, UK) a développé une analyse des SNAREs exprimés par les PCs couplée à une analyse plus globale par spectrométrie de masse du protéome des PCs afin d'identifier des molécules impliquées dans l'homéostasie des PCs et la sécrétion d'Ac. Cette approche a permis d'identifier plusieurs SNAREs ainsi qu'une vingtaine de protéines spécifiquement surexprimées dans les PCs par rapport aux cellules B, certaines ne présentant pas encore de fonctions connues. Après une étude préliminaire de plusieurs d'entre elles, notre choix s'est porté sur la caractérisation du rôle de 2 protéines, la Stx5 et Creld2 sur la différenciation des PCs, la survie et la sécrétion d'Ac. Pour cela, nous avons développé un modèle de culture de cellules B *in vitro* et *ex vivo* couplé à l'extinction de l'expression des gènes d'intérêts par l'utilisation de shRNA ciblant nos 2 protéines d'intérêts.

Contrairement au système de mutagénèse Crispr-Cas9, les shRNA ne permettent pas une extinction complète des gènes d'intérêts. Cependant ce système nous a permis de travailler sur des plasmocytes primaires qui sont très difficiles à garder en culture et pour lequel l'approche Crispr n'était pas réaliste. De plus, une extinction partielle de l'expression de nos protéines d'intérêts est suffisante pour bloquer en partie la sécrétion d'Ac et pour affecter significativement la survie des PCs. Au vu de nos résultats, il est possible qu'une délétion complète de la Stx5 et de Creld2 eut bloqué totalement la différenciation plasmocytaire rendant donc difficile l'analyse de leurs mécanismes d'action.

- Rôle du complexe Stx5 SNARE et de Creld2 dans la différenciation des PCs, la survie et la sécrétion d'Ac

Nous avons mis en évidence que le knock-down de la Stx5 ne perturbe pas la différenciation plasmocytaire précoce par contre, le maintien des PCs à plus long terme est affecté. Il semble que la sécrétion d'Ac soit également affectée. Le lien de causalité entre ces deux observations est pour l'instant difficile à établir. En effet, la diminution des Ac sécrétés est corrélée à la diminution du nombre

de PCs. Il est également possible que le défaut de survie des PCs soit lié au défaut de sécrétion. L'augmentation des IgM intracellulaires observée à jour 3 au moment où la survie des PCs commence à diminuer pourrait supporter cette hypothèse. Afin de répondre à cette question plusieurs expériences sont envisageables : i) compter le nombre de cellules vivantes à chaque jour de prélèvement afin de normaliser la concentration des Ig secrétées par la quantité totale de cellules, ii) trier les cellules GFP⁺ pour ôter le biais induit par les PCs non transduits, et mettre en culture le même nombre de cellules, iii) employer une version modifiée du Fluorospot qui permet de détecter directement les Ac sécrétés par un PC donné. Cette technique consiste en l'incubation des PCs sur une membrane pré-coatée avec un Ac anti-Ig, puis après 18h d'incubation, les PCs sont fixés sur la membrane et les Ac sécrétés sont détectés par un Ac secondaire couplé à un fluorochrome. En complément nous avons testé l'effet d'une petite molécule inhibitrice appelée Retro-2 sur la capacité de sécrétion de PCs déjà différenciés. Retro-2 a précédemment été rapporté comme régulant la fonction de la Stx5 (Stechmann et al., 2010). Ces expériences suggèrent que la Stx5 contrôle la sécrétion d'Ac indépendamment de la différenciation des PCs (voir détail ci-après).

Le knock-down de Creld2 semble affecter la différenciation précoce des PCs mais pas leur maintien. Ce dernier point se discute car d'après la littérature Creld2 peut être sécrété (Oh-hashii et al., 2011, 2015) en l'occurrence il pourrait l'être par les cellules non transduites promouvant ainsi la survie des PCs. Un dosage par Elisa sur des surnageants de culture shRNA creld2 versus contrôle pourrait mettre en évidence la présence de Creld2 sécrété. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la sécrétion de Creld2 est augmentée en présence d'une surexpression de MANF et d'après des études transcriptomiques, MANF est surexprimé dans les PCs, ce qui suggèrent que Creld2 pourrait être fortement sécrété par ces cellules.

De plus, il serait intéressant d'étudier l'initiation du programme transcriptionnel des PCs GFP⁺ versus GFP⁻ dans les mêmes conditions de culture par PCR quantitative de gènes tels que Pax5, Blimp1 et XBP1s. En parallèle nous pourrions étudier l'impact de nos protéines d'intérêt sur la survie et la prolifération à des temps plus tardifs par des marquages d'une part avec l'annexine-V et l'iodure de propidium pour détecter les cellules apoptotiques et nécrotiques et d'autre part avec le ki67, qui est un marqueur de la prolifération cellulaire.

Une autre perspective à ce travail serait de réaliser la surexpression de nos 2 protéines afin de déterminer si cela engendrerait une augmentation de la différenciation des cellules B en PCs et de la sécrétion d'Ac, deux notions importantes en thérapie cellulaire afin d'offrir une protection humorale aux patients immunosupprimés suite à une infection par le VIH ou une transplantation.

Lors d'une étude sur la ricine, qui est une toxine extraite de la graine de ricin, considérée comme une arme biologique mortelle, deux inhibiteurs du transport rétrograde qui sont Retro-1 et Retro-2 ont prouvés leur efficacité sur des souris intoxiquées (Stechmann et al., 2010). Une cible de ces inhibiteurs semble être la Stx5. M. Espéli a testé l'effet de Retro-2 sur des PCs différenciés *in vitro* avec du LPS et par injection d'une dose unique à des souris C57BL/6. Elle a montré que Retro-2 diminue la sécrétion d'Ac à la fois par les PCs en culture et par les PCs de la moelle osseuse des souris sans en altérer leur nombre. Le potentiel de cette molécule comme inhibiteur de la sécrétion d'Ac dans le cas de maladies autoimmunes comme le lupus reste à investiguer.

- Rôle de la Stx5 et de Creld2 dans l'expansion du RE et l'autophagie *in vitro*

Nous avons mis en évidence que la Stx5 et Creld2 contrôlent l'expansion du RE et l'autophagie.

La diminution de l'expansion du RE pourrait être l'une des boucles de rétrocontrôle négatif limitant la production d'Ac lorsque ces protéines sont absentes. Il serait intéressant d'établir si l'expansion du RE est également inhibée lorsque Creld2 ou la Stx5 sont délétés ou bloqués une fois que les PCs sont différenciés. Des expériences de cinétiques avec l'inhibiteur retro-2 pourraient nous permettre de répondre à cette question.

Il a précédemment été montré que la différenciation plasmocytaire s'accompagnait d'une augmentation de l'autophagie et que ce processus était essentiel pour le maintien des PCs au long cours. Cependant et un peu contre intuitivement, l'absence d'autophagie semble conduire à une production excessive d'Ac (Pengo et al., 2013). Nous confirmons dans notre modèle cellulaire que la différenciation en cellule productrice d'Ac s'accompagne d'une augmentation de l'autophagie. Le défaut de ce processus dans nos cellules knock-down pour la Stx5 et Creld2 pourrait contribuer aux défauts de survie et de différenciation observés. En revanche il n'est pas clair, pourquoi cela ne s'accompagne pas, au moins transitoirement, par une augmentation de la sécrétion d'Ac. Il est possible que l'effet de la Stx5 et de Creld2 sur d'autres mécanismes cellulaires compense le défaut d'autophagie. Il nous reste encore à caractériser à quel stade la Stx5 et Creld2 affectent l'autophagie. L'analyse de nos photos de microscopie électronique ainsi que l'utilisation de drogues bloquant le processus autophagique à différentes étapes pourraient nous permettre d'obtenir des éléments de réponses.

Enfin, Creld2 pourrait également jouer un rôle dans la survie des PCs en régulant la réponse au stress du RE par la voie UPR. En effet, des données préliminaires indiquent que le knockdown de Creld2 entraîne une diminution de la forme active de XBP1 nécessaire à la production d'Ac ainsi que de Bip (*Binding Immunoglobulin Protein*) qui est la protéine chaperonne des Ig.

Partie 2 : Modèle animal

Les réponses immunes étant des processus complexes dépendants de nombreux types cellulaires et de l'organisation tridimensionnelle des organes lymphoïdes, il était intéressant d'avoir un modèle animal pour cette étude afin de comprendre comment Creld2 agit sur la différenciation, la maintenance, la sécrétion d'Ac et le développement d'une réponse immune T-dépendante.

Nous avons montré que Creld2 n'est pas nécessaire pour la différenciation précoce des LB. De plus, ni la maturation des LB dans les OL secondaires, ni la différenciation tardive en PCs ne sont affectées. En outre, l'absence d'expression de Creld2 dans les lymphocytes B n'impacte pas l'initiation d'une réponse humorale T-dépendante en revanche, Creld2 semble important (i) pour la production d'Ac de forte affinité et (ii) pour le maintien des PCs de forte affinité au sein de la MO.

(i) Y aurait-il un défaut au niveau du CG ?

Le processus d'hypermutation somatique des gènes codant pour les régions variables des Ig intervient dans les CG des OL secondaires après contact avec l'Ag. Il augmente la diversification des Ig et permet la production et la sélection d'anticorps très affins pour l'Ag grâce à la protéine AID (*activation-induced cytidine deaminase*). La production d'Ac de plus faible affinité pourrait être la conséquence d'une diminution de la fréquence des mutations somatiques. Une autre possibilité serait que Creld2 impacte sur le processus de sélection des clones de forte affinité, un processus contrôlé par la présentation de l'Ag par les B aux T_{FH}. Afin de tester ces possibilités nous pourrions réaliser un tri cellule-unique de LB du CG spécifiques de notre antigène d'immunisation (NP) suivi d'une analyse de la séquence de la chaîne lourde V_{H186.2} (référence : Natt and Espéli Methods in molecular biology 2015). Par cette approche nous pourrions établir si la fréquence de mutation est anormale et si la mutation W33L qui décuple l'affinité du BCR pour NP est moins sélectionnée en absence de Creld2.

(ii) Serait-ce un défaut au niveau de la migration/survie des PCs de la MO ?

Nous savons que la migration des PCs vers la MO dépend en partie de l'axe CXCR4/CXCL12, peut-être pourrions-nous imaginer une déficience de cet axe, nous savons également que le nombre de niches est limité (Radbruch et al., 2006) et qu'il existe une compétition entre les cellules, l'absence de Creld2 aurait-il un impact sur l'installation des PCs de haute affinité dans les niches ?

D'après Pengo, l'autophagie est non seulement fortement induite après l'activation des cellules B pendant la différenciation plasmocytaire *ex vivo*, mais aussi *in vivo* dans les PCs de la moelle osseuse de

courte et de longue durée de vie. En étudiant des souris CD19cre Atg5f/f, ils ont rapporté qu'en absence d'autophagie, les cellules B déficientes pour ATG5 peuvent se différencier normalement, proliférer, accroître leur taille et exprimer des marqueurs spécifiques aux PCs. En revanche le nombre de PCs de longue durée de vie spécifique de l'Ag était fortement diminué, suggérant qu'une autophagie fonctionnelle est nécessaire au maintien au long cours des PCs de forte affinité, potentiellement en réduisant le stress du RE et par conséquent la production d'Ac au profit de la survie. La réduction du nombre de PCs de forte affinité que nous observons dans la MO pourrait donc être liée au défaut d'autophagie que nous avons rapporté *ex vivo* dans notre système knock-down. Il serait donc intéressant d'étudier le processus autophagique dans les PC déficients pour Creld2.

Différencier des LB purifiés des souris *ex vivo* nous permettrait d'étudier la sécrétion d'Ac en l'absence de Creld2 sécrété. Une autre perspective serait l'utilisation d'une cre fusionnée avec un promoteur ubiquitaire afin de réaliser un KO complet de Creld2, nous permettant ainsi de nous affranchir de la présence de Creld2 sécrété.

S'il n'existe pas de modèle de souris KO pour la Stx5, il existe par contre un modèle pour son partenaire Sec22b. La protéine Sec22b appartient à la famille des longin-SNAREs (R-SNAREs) qui lors du transport antérograde va former un complexe avec les membres, membrin et rBet1 associés à la Stx5 permettant la fusion des vésicules COPII au Golgi. D'après nos données préliminaires, cette protéine est également fortement surexprimée dans les PCs par rapport aux cellules B. Nous venons d'obtenir les souris Sec22b fl/fl que nous avons croisé avec des souris mb1-cre afin d'étudier le rôle de Sec22b dans la différenciation plasmocytaire, la sécrétion d'Ac et la réponse immune humorale.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en lumière le rôle de la Stx5 et de Creld2 dans la différenciation, la survie et la sécrétion d'anticorps par les plasmocytes ainsi que leur maintien au long cours dans la moelle osseuse des souris Creld2^{B-KO}. Ces 2 régulateurs pourraient représenter de potentielles cibles thérapeutiques mais avant cela une caractérisation bien plus en profondeur est nécessaire.

Bibliographie

Ahuja, A., Anderson, S.M., Khalil, A., and Shlomchik, M.J. (2008). Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4802–4807.

Alberini, C., Biassoni, R., DeAmbrosis, S., Vismara, D., and Sitia, R. (1987). Differentiation in the murine B cell lymphoma I.29: individual mu + clones may be induced by lipopolysaccharide to both IgM secretion and isotype switching. *Eur. J. Immunol.* *17*, 555–562.

Amessou, M., Fradagrada, A., Falguières, T., Lord, J.M., Smith, D.C., Roberts, L.M., Lamaze, C., and Johannes, L. (2007). Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell Sci.* *120*, 1457–1468.

von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 867–878.

van Anken, E., Romijn, E.P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., and Heck, A.J.R. (2003). Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* *18*, 243–253.

Aragon, I.V., Barrington, R.A., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2012). The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6 α -independent development of antibody-secreting B cells. *Mol. Immunol.* *51*, 347–355.

Arnold, J., Murera, D., Arbogast, F., Fauny, J.-D., Muller, S., and Gros, F. (2016). Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Cell Death Differ.* *23*, 853–864.

Balsat, M., and Cornillon, J. (2011). [m-TOR inhibitors: biology and use in the treatment of haematological diseases]. *Bull. Cancer (Paris)* *98*, 935–943.

Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 15–27.

Baumgarth, N., Tung, J.W., and Herzenberg, L.A. (2005). Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin. Immunopathol.* *26*, 347–362.

Bekeredjian-Ding, I., and Jegu, G. (2009). Toll-like receptors – sentries in the B-cell response. *Immunology* *128*, 311.

Benhamron, S., Pattanayak, S.P., Berger, M., and Tirosh, B. (2015). mTOR Activation Promotes Plasma Cell Differentiation and Bypasses XBP-1 for Immunoglobulin Secretion. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 153–166.

Benson, M.J., Dillon, S.R., Castigli, E., Geha, R.S., Xu, S., Lam, K.-P., and Noelle, R.J. (2008). Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3655–3659.

Berrih-Aknin, S., Frenkian-Cuvelier, M., and Eymard, B. (2014). Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *J. Autoimmun.* *48–49*, 143–148.

Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013). Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 382–392.

- Cancro, M.P. (2009). Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 657–661.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 118–132.
- Cesta, M.F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicol. Pathol.* *34*, 455–465.
- Cheng, Q., Mumtaz, I.M., Khodadadi, L., Radbruch, A., Hoyer, B.F., and Hiepe, F. (2013). Autoantibodies from long-lived “memory” plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 2011–2017.
- Chevrier, S., Genton, C., Kallies, A., Karnowski, A., Otten, L.A., Malissen, B., Malissen, M., Botto, M., Corcoran, L.M., Nutt, S.L., et al. (2009). 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.* *106*, 3895–3900.
- Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhäuser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* *12*, 151–159.
- Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature* *367*, 425–428.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Cyster, J.G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 127–159.
- Dascher, C., Matteson, J., and Balch, W.E. (1994). Syntaxin 5 regulates endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* *269*, 29363–29366.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 137–148.
- DeFranco, A.L. (2016). The germinal center antibody response in health and disease. *F1000Research* *5*.
- Deng, X.-M., Yan, S.-X., and Wei, W. (2015). IL-21 acts as a promising therapeutic target in systemic lupus erythematosus by regulating plasma cell differentiation. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 31–39.
- DiLillo, D.J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K.M., Kelsoe, G., and Tedder, T.F. (2008). Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 361–371.
- Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., and Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* *7*, 344–353.
- Elgueta, R., de Vries, V.C., and Noelle, R.J. (2010). The immortality of humoral immunity. *Immunol. Rev.* *236*, 139–150.
- Ersching, J., Efeyan, A., Mesin, L., Jacobsen, J.T., Pasqual, G., Grabiner, B.C., Dominguez-Sola, D., Sabatini, D.M., and Victora, G.D. (2017). Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. *Immunity* *46*, 1045–1058.e6.

- Espeli, M., Bökers, S., Giannico, G., Dickinson, H.A., Bardsley, V., Fogo, A.B., and Smith, K.G.C. (2011). Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 296–305.
- Fagarasan, S., and Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 290, 89–92.
- Fletcher, A.L., Acton, S.E., and Knoblich, K. (2015). Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 350.
- García de Vinuesa, C., O’Leary, P., Sze, D.M., Toellner, K.M., and MacLennan, I.C. (1999). T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur. J. Immunol.* 29, 1314–1323.
- Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C., and Brewer, J.W. (2008). The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol. Immunol.* 45, 1035–1043.
- Gauld, S.B., Merrell, K.T., and Cambier, J.C. (2006). Silencing of autoreactive B cells by anergy: a fresh perspective. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 292–297.
- Glatman Zaretsky, A., Konradt, C., Dépis, F., Wing, J.B., Goenka, R., Atria, D.G., Silver, J.S., Cho, S., Wolf, A.I., Quinn, W.J., et al. (2017). T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Cell Rep.* 18, 1906–1916.
- Goldfinger, M., Shmuel, M., Benhamron, S., and Tirosh, B. (2011). Protein synthesis in plasma cells is regulated by crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Eur. J. Immunol.* 41, 491–502.
- Gordon, D.E., Bond, L.M., Sahlender, D.A., and Peden, A.A. (2010). A targeted siRNA screen to identify SNAREs required for constitutive secretion in mammalian cells. *Traffic Cph. Den.* 11, 1191–1204.
- Halliley, J.L., Tipton, C.M., Liesveld, J., Rosenberg, A.F., Darce, J., Gregoret, I.V., Popova, L., Kaminiski, D., Fucile, C.F., Albizua, I., et al. (2015). Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* 43, 132–145.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194, 45–56.
- Hartley, C.L., Edwards, S., Mullan, L., Bell, P.A., Fresquet, M., Boot-Handford, R.P., and Briggs, M.D. (2013). Armet/Manf and Creld2 are components of a specialized ER stress response provoked by inappropriate formation of disulphide bonds: implications for genetic skeletal diseases. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5262–5275.
- Hay, J.C., Klumperman, J., Oorschot, V., Steegmaier, M., Kuo, C.S., and Scheller, R.H. (1998). Localization, dynamics, and protein interactions reveal distinct roles for ER and Golgi SNAREs. *J. Cell Biol.* 141, 1489–1502.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J. Exp. Med.* 161, 1554–1568.
- Hiepe, F., Dörner, T., Hauser, A.E., Hoyer, B.F., Mei, H., and Radbruch, A. (2011). Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 170–178.

- Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 11, 137.
- Jacobi, A.M., and Diamond, B. (2005). Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 202, 341.
- Jones, D.D., Gaudette, B.T., Wilmore, J.R., Chernova, I., Bortnick, A., Weiss, B.M., and Allman, D. (2016). mTOR has distinct functions in generating versus sustaining humoral immunity. *J. Clin. Invest.* 126, 4250–4261.
- Kadowaki, H., and Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes* 4, 306–333.
- Kirk, S.J., Cliff, J.M., Thomas, J.A., and Ward, T.H. (2010). Biogenesis of secretory organelles during B cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 87, 245–255.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 22–33.
- Kurosaki, T. (2010). The study of B cells and antibodies in Japan: a historical perspective. *Int. Immunol.* 22, 217–226.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Lee, Y.K., Brewer, J.W., Hellman, R., and Hendershot, L.M. (1999). BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* 10, 2209–2219.
- Linterman, M.A., Liston, A., and Vinuesa, C.G. (2012). T-follicular helper cell differentiation and the co-option of this pathway by non-helper cells. *Immunol. Rev.* 247, 143–159.
- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.
- Mahévas, M., Michel, M., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2013). Long-lived plasma cells in autoimmunity: lessons from B-cell depleting therapy. *Front. Immunol.* 4, 494.
- Mahévas, M., Michel, M., Vingert, B., Moroch, J., Boutboul, D., Audia, S., Cagnard, N., Ripa, J., Menard, C., Tarte, K., et al. (2015). Emergence of long-lived autoreactive plasma cells in the spleen of primary warm auto-immune hemolytic anemia patients treated with rituximab. *J. Autoimmun.* 62, 22–30.
- Manz, R.A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int. Immunol.* 10, 1703–1711.
- Martin, D.D.O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D.E., and Hayden, M.R. (2015). Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci.* 38, 26–35.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.
- Matthias, P., and Rolink, A.G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 497–508.

- McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-Specific Memory B Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 487–513.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* *1*, 379–385.
- Mesin, L., Ersching, J., and Victora, G.D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* *45*, 471–482.
- Milne, C.D., and Paige, C.J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* *18*, 20–30.
- Minguet, S., Dopfer, E.P., Pollmer, C., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Reth, M., Huber, M., and Schamel, W.W. (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2475–2487.
- Minnich, M., Tagoh, H., Bönelt, P., Axelsson, E., Fischer, M., Cebolla, B., Tarakhovsky, A., Nutt, S.L., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2016). Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* *17*, 331–343.
- Miyazaki, K., Wakana, Y., Noda, C., Arasaki, K., Furuno, A., and Tagaya, M. (2012). Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* *125*, 5658–5666.
- Mond, J.J., Vos, Q., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995). T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol.* *7*, 349–354.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* *7*, 293–301.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290–302.
- Núñez, C., Nishimoto, N., Gartland, G.L., Billips, L.G., Burrows, P.D., Kubagawa, H., and Cooper, M.D. (1996). B cells are generated throughout life in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 866–872.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* *325*, 1001–1005.
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.
- Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 38226–38234.
- Ogura, M., Inoue, T., Yamaki, J., Homma, M.K., Kurosaki, T., and Homma, Y. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species suppress humoral immune response through reduction of CD19 expression in B cells in mice. *Eur. J. Immunol.* *47*, 406–418.
- Oh-hashii, K., Koga, H., Ikeda, S., Shimada, K., Hirata, Y., and Kiuchi, K. (2009). CRELD2 is a novel endoplasmic reticulum stress-inducible gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *387*, 504–510.

Oh-hashii, K., Kunieda, R., Hirata, Y., and Kiuchi, K. (2011). Biosynthesis and secretion of mouse cysteine-rich with EGF-like domains 2. *FEBS Lett.* *585*, 2481–2487.

Oh-hashii, K., Norisada, J., Hirata, Y., and Kiuchi, K. (2015). Characterization of the Role of MANF in Regulating the Secretion of CRELD2. *Biol. Pharm. Bull.* *38*, 722–731.

Ortiz, J.A., Castillo, M., del Toro, E.D., Mulet, J., Gerber, S., Valor, L.M., Sala, S., Sala, F., Gutiérrez, L.M., and Criado, M. (2005). The cysteine-rich with EGF-like domains 2 (CRELD2) protein interacts with the large cytoplasmic domain of human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha4 and beta2 subunits. *J. Neurochem.* *95*, 1585–1596.

Pabst, R. (1988). The spleen in lymphocyte migration. *Immunol. Today* *9*, 43–45.

Peault, B., and Tavian, M. (2003). Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *996*, 132–140.

Pelanda, R., and Torres, R.M. (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a007146.

Peng, S.L. (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 230–236.

Pengo, N., Scolari, M., Oliva, L., Milan, E., Mainoldi, F., Raimondi, A., Fagioli, C., Merlini, A., Mariani, E., Pasqualetto, E., et al. (2013). Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat. Immunol.* *14*, 298–305.

Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., et al. (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.* *14*, 290–297.

Porstner, M., Winkelmann, R., Daum, P., Schmid, J., Pracht, K., Côte-Real, J., Schreiber, S., Haftmann, C., Brandl, A., Mashreghi, M.-F., et al. (2015). miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors *Mitf* and *Bach2*. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1206–1215.

Puri, K.D., Di Paolo, J.A., and Gold, M.R. (2013). B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Int. Rev. Immunol.* *32*, 397–427.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 741–750.

Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* *381*, 751–758.

Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A.R., Menzies, F.M., Peden, A.A., Floto, R.A., and Rubinsztein, D.C. (2011). Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *J. Cell Sci.* *124*, 469–482.

Ribatti, D. (2017). The discovery of plasma cells: An historical note. *Immunol. Lett.* *188*, 64–67.

Roth, K., Oehme, L., Zehentmeier, S., Zhang, Y., Niesner, R., and Hauser, A.E. (2014). Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *85*, 15–24.

Rozanski, C.H., Utley, A., Carlson, L.M., Farren, M.R., Murray, M., Russell, L.M., Nair, J.R., Yang, Z., Brady, W., Garrett-Sinha, L.A., et al. (2015). CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody

- Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *194*, 4717–4728.
- Sandoz, P.A., and van der Goot, F.G. (2015). How many lives does CLIMP-63 have? *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 222–228.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* *293*, 2111–2114.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* *25*, 225–236.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81–93.
- Shi, W., Liao, Y., Willis, S.N., Taubenheim, N., Inouye, M., Tarlinton, D.M., Smyth, G.K., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., and Corcoran, L.M. (2015). Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat. Immunol.* *16*, 663–673.
- Song, H., and Cerny, J. (2003). Functional Heterogeneity of Marginal Zone B Cells Revealed by Their Ability to Generate Both Early Antibody-forming Cells and Germinal Centers with Hypermutation and Memory in Response to a T-dependent Antigen. *J. Exp. Med.* *198*, 1923–1935.
- Stavnezer, J., and Kang, J. (2009). The Surprising Discovery That TGF β Specifically Induces the IgA Class Switch. *J. Immunol.* *182*, 5–7.
- Stechmann, B., Bai, S.-K., Gobbo, E., Lopez, R., Merer, G., Pinchard, S., Panigai, L., Tenza, D., Raposo, G., Beaumelle, B., et al. (2010). Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge. *Cell* *141*, 231–242.
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G.K., Kallies, A., Busslinger, M., and Nutt, S.L. (2016). Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* *17*, 323–330.
- Todd, D.J., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 663–674.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* *20*, 707–718.
- Tsubata, T. (2017). B-cell tolerance and autoimmunity. *F1000Research* *6*, 391.
- Vale, A.M., and Schroeder, H.W. (2010). Clinical consequences of defects in B-cell development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 778–787.
- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* *5*, 520.

Vikstrom, I., Carotta, S., Lüthje, K., Peperzak, V., Jost, P.J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S.L., et al. (2010). Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* *330*, 1095–1099.

de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G.B., and MacLennan, I.C.M. (2000). Germinal Centers without T Cells. *J. Exp. Med.* *191*, 485–494.

Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., and Mond, J.J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol. Rev.* *176*, 154–170.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881–891.

Yu, Y.-H., and Lin, K.-I. (2016). Factors That Regulate the Generation of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Adv. Immunol.* *131*, 61–99.

Zandvoort, A., and Timens, W. (2002). The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol.* *130*, 4–11.

Zhang, J., Weng, Y., Liu, X., Wang, J., Zhang, W., Kim, S.H., Zhang, H., Li, R., Kong, Y., Chen, X., et al. (2013). Endoplasmic reticulum (ER) stress inducible factor cysteine-rich with EGF-like domains 2 (Creld2) is an important mediator of BMP9-regulated osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One* *8*, e73086.

Zhou, J., Tan, S.-H., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2013). Dual suppressive effect of MTORC1 on autophagy: tame the dragon by shackling both the head and the tail. *Autophagy* *9*, 803–805.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

Caractérisation de nouveaux régulateurs de la survie et de la fonction des plasmocytes

PONCET Laetitia

4 décembre 2017

Résumé

Les plasmocytes correspondent au dernier stade de différenciation des lymphocytes B et ce sont les cellules responsables de la production des anticorps. Ces cellules jouent un rôle essentiel au sein de la réponse immune humorale et notamment dans la protection contre les infections ou dans le cas de la vaccination. Cependant, il est maintenant clairement établi que les plasmocytes sont aussi impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes via la production d'autoanticorps pathologiques. Malgré le rôle central que joue ces cellules dans les réponses immunes normales et pathologiques, les mécanismes contrôlant la production et la sécrétion de très grandes quantités d'anticorps en permanence ainsi que ceux permettant aux plasmocytes de survivre à une telle charge protéique sont encore mal connus. Ce mémoire porte donc sur l'étude de nouveaux régulateurs de la fonction et de la survie des plasmocytes.

Dans ce contexte nous avons développé un modèle de culture de cellules B primaires couplé à l'extinction de l'expression des gènes d'intérêts par l'utilisation de shRNA. Plus précisément, après différenciation *ex vivo* de lymphocytes B de souris, nous avons montré que deux des régulateurs étudiés, contrôlent la différenciation et la survie des plasmocytes ainsi que la sécrétion d'anticorps. Il s'agit des protéines Syntaxine-5 et Creld2, toutes deux fortement exprimées par les plasmocytes. Ces observations nous ont amené à caractériser les mécanismes d'action de ces deux protéines *in vitro* et il semblerait qu'elles aient chacune un rôle dans l'expansion du RE nécessaire à la production des immunoglobulines et dans l'autophagie, cruciale pour l'homéostasie et la maintenance des PCs. En parallèle, nous avons évalué le rôle de la protéine Creld2 dans un modèle murin où Creld2 est spécifiquement invalidé dans les lymphocytes B dès les stades les plus précoces du développement. Au cours de la réponse humorale T-dépendante, nous avons mis en évidence que Creld2 promeut la maturation d'affinité, la sécrétion d'anticorps spécifiques et la survie au long cours des plasmocytes de forte affinité dans la moelle osseuse.

En conclusion nous avons développé un modèle de culture de plasmocytes *ex vivo* ainsi qu'un modèle de souris knock-out pour Creld2, nous permettant de tester deux régulateurs qui pourraient se révéler être des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des maladies auto-immunes.

Mots-clés : plasmocytes, immunoglobulines, Stx5, Creld2, réponse immune