

**UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE**

**REGULATION DE LA MORT ET SURVIE  
DES PLASMOCYTES HUMAINS NORMAUX  
ET DE LEURS EQUIVALENTS TUMORAUX,  
LES CELLULES DE MYELOME MULTIPLE**

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE  
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
Spécialité : Immunologie**

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**GEFFROY Alexandrine**

*le 21 septembre 2007, devant le jury ci-dessous*

<i>Président</i>	<b>Pr Régis BATAILLE</b>
<i>Rapporteurs</i>	<b>Pr Karin TARTE Pr Bernard KLEIN</b>
<i>Examineur</i>	<b>Dr Thierry DEFRANCE</b>
<i>Directeur de thèse :</i>	<b>Dr Catherine PELLAT-DECEUNYNCK</b>

# SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	6
<i>Régulation de la mort et Survie des Plasmocytes humains normaux et de leurs équivalents tumoraux, les cellules de myelome multiple</i>	9
<b>I) Lymphopoïèse B</b>	10
<b>II) Immunopoïèse B</b>	11
<b>A) Réponse immunitaire à médiation humorale thymo-indépendante</b>	12
<b>B) Réponse immunitaire à médiation humorale thymo-dépendante</b>	14
1) Foyers d'expansion et de différenciation extrafolliculaires	15
2) Réaction du centre germinatif	16
3) Mémoire sérologique	17
<b>III) Identification des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire</b>	20
<b>A) Phénotype</b>	20
<b>B) Morphologie</b>	21
<b>IV) Régulation transcriptionnelle de la différenciation plasmocytaire</b>	23
<b>A) Bcl-6</b>	23
<b>B) Pax-5</b>	24
<b>C) Blimp-1</b>	25
<b>D) XBP-1</b>	27
<b>E) IRF-4</b>	27
<b>V) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation : rôle de l'environnement</b>	29
<b>A) Coopération cellulaire</b>	30
1) Cellules dendritiques	30
2) Cellules stromales	31
3) Synoviocytes	31
4) Lymphocytes T	31
<b>B) Facteurs solubles favorisant la survie</b>	32
1) SDF-1	32
2) Interleukine-6	32
3) BAFF/APRIL	33
<b>C) Complexes immuns</b>	34
<b>VI) Résultats</b>	35
<b>A) Obtention de plasmocytes in vitro</b>	35
1) Génération de plasmocytes à partir de lymphocytes B stimulés via le CD40	36
2) Génération de plasmocytes en réponse aux CpG-ODN	41

3) Les cellules de Myélome Multiple expriment des TLR dont les ligands favorisent leur survie et leur prolifération	47
<b>B) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire in vitro</b>	<b>48</b>
1) Mécanismes moléculaires associés à l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.	49
2) Expression et activité des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas	52
3) Rôle des cellules dérivées des monocytes dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.	55
4) Mécanismes impliqués dans la survie médiée par les ostéoclastes des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.	58
a) BAFF/APRIL	58
b) Contact cellulaire	61
<i>Article 1</i>	<b>64</b>
<b>VII) Discussion-Conclusion</b>	<b>87</b>
<b>A) Impact de la nature des signaux sur la nature des plasmocytes générés : illustration par la génération de plasmocytes en réponse aux CpG-ODN.</b>	<b>87</b>
<b>B) Prolifération cellulaire et différenciation plasmocytaire</b>	<b>89</b>
<b>C) Apoptose et différenciation plasmocytaire</b>	<b>90</b>
<b>D) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire : rôle des cellules dérivées des monocytes.</b>	<b>92</b>
<b>E) Signaux de survie et prolifération des plasmoblastes et des plasmocytes et anomalies du Myélome Multiple</b>	<b>98</b>
<i>Caractérisation de lymphocytes T allogéniques spécifiques des cellules de myelome multiple</i>	<b>100</b>
<i>I) Immunothérapie : généralités</i>	<b>101</b>
<i>II) Intérêt d'un traitement par immunothérapie du Myélome Multiple</i>	<b>103</b>
<i>III) Résultats</i>	<b>104</b>
<b>A) Travaux préliminaires : isolement de lymphocytes T cytotoxiques envers les cellules de Myélome Multiple</b>	<b>104</b>
1) Isolement et caractérisation de lymphocytes T cytotoxiques autologues	104
2) Isolement de lymphocytes T cytotoxiques allogéniques	105
<b>B) Caractérisation des clones du donneur BA : mécanismes de reconnaissance des cellules de Myélome Multiple</b>	<b>106</b>
<i>Article 2</i>	<b>108</b>
<i>IV) Discussion-Conclusion</i>	<b>109</b>
<i>Références bibliographiques</i>	<b>112</b>
<i>ANNEXE 1</i>	<b>124</b>
<i>ANNEXE 2</i>	<b>125</b>

# ABREVIATIONS

Ac : anticorps

Ag : antigène

AID : « activation induced deaminase »

APRIL : « a proliferation inducing ligand »

BAFF : « B-cell activating factor »

BCMA : « B-cell maturation antigen »

BCR : « B-cell receptor »

B-EBV : lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein Barr

CD : cellule dendritique

CDF : cellule dendritique folliculaire

CDI : cellule dendritique interdigitée

CG : centre germinatif

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CpG-ODN : oligodéoxynucléotides de synthèse riches en motifs CG déméthylés

DR : « death receptor »

HLA : « human leucocyte antigen »

ICAM : « intercellular cell adhesion molecule »

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IRF : « interferon regulatory factor »

LB : lymphocyte B

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocyte T

MM : Myélome Multiple

NKCR : « Natural killer cell receptor »

MO : moelle osseuse

OC : ostéoclaste

PB : plasmoblaste

PC : plasmocyte

SDF-1 : « stromal cell derived factor 1 »

STAT : « signal transducer and activator of transcription »

TACI : « transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor »

TCR : « T-cell receptor »

TD : thymo-dépendant

TI : thymo-indépendant

TLR : « toll like receptor »

TNF : « tumor necrosis factor »

TRAIL : « tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand »

# **INTRODUCTION GENERALE**

La vaccination induit un état de protection spécifique vis-à-vis du pathogène présent sous forme d'antigènes (Ag) dans le vaccin. Le transfert passif de la protection à un animal receveur non vacciné par le sérum définit l'immunité spécifique à médiation humorale. Les molécules sériques responsables de cette protection spécifique sont les anticorps (Ac). La production des Ac est assurée par des cellules spécialisées : les plasmocytes (PC). Le pool d'Ac circulants spécifiques d'Ag d'un individu définit sa mémoire sérologique ou humorale, elle lui procure une protection spécifique contre un panel de pathogènes (bactéries, virus, toxines) (Manz et al, 2005).

Les PC représentent le stade terminal de différenciation des lymphocytes B (LB) activés suite à leur rencontre avec un Ag. Suite à une immunisation, des PC spécifiques de l'Ag persistent dans la moelle osseuse (MO) durant une longue période (chez la souris cette période peut correspondre à la durée de vie de l'animal) (Manz et al, 1997 ; Slifka et al, 1998). Ces PC, dits à longue durée de vie, continuent à sécréter de grande quantité d'Ac et participent ainsi au maintien de la mémoire sérologique contre l'Ag initial (Manz et al, 2005). Cette caractéristique de survie à long terme les distingue d'une autre population de PC dits à courte durée de vie. Ces derniers, qui représentent la majorité des PC générés lors d'une réponse immune à médiation humorale, assurent la réponse effectrice immédiate. Bien que la moelle soit le site majeur de résidence des plasmocytes à longue durée de vie, des populations de ce type sont retrouvées dans la rate et dans les ganglions lymphatiques (Slifka et al, 1998 ; Sze et al, 2000 ; Ellyard et al, 2004). Dans certaines conditions pathologiques, les PC s'accumulent et survivent au niveau de sites particuliers qui sont caractérisés par un phénomène d'inflammation. En effet, des PC ont été détectés dans les reins des souris NZB/W (modèle murin de la maladie lupique) et au niveau de la synovie des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Kim et al, 1999 ; Cassese et al, 2001).

Le Myélome Multiple (MM) est une tumeur plasmocytaire essentiellement médullaire qui résulte de la cancérisation des PC qui sont localisés dans la MO. Le MM est la deuxième hémopathie mortelle dans le monde occidental après les lymphômes et devant les leucémies aiguës. Chaque année 3500 nouveaux cas sont diagnostiqués en France. A ce jour, en dépit de l'accroissement constant des connaissances concernant la biologie de ce cancer et du développement de nouvelles thérapies, le MM reste incurable.

Ce manuscrit est divisé en 2 parties. Mon travail sur la biologie des PC normaux, en particulier leur survie fera l'objet de la première partie. La seconde partie quant à elle sera consacrée à des travaux distincts qui ont été réalisés dans le cadre d'un projet d'immunothérapie du MM.



**REGULATION DE LA MORT ET SURVIE  
DES PLASMOCYTES HUMAINS  
NORMAUX ET DE LEURS  
EQUIVALENTS TUMORAUX, LES  
CELLULES DE MYELOME MULTIPLE**

## I) Lymphopoïese B

Le développement des LB commence au stade embryonnaire et se poursuit tout au long de la vie. Avant la naissance, le sac vitellin, le foie fœtal et la moelle fœtale sont les principaux sites de maturation des LB ; après la naissance, le développement des LB matures s'effectue dans la MO.

Les premières cellules de la lignée B sont dénommées cellules pro-B. Elles sont dérivées des cellules souches lymphoïdes. A ce stade se produit le réarrangement des segments géniques V, D, J du locus de la chaîne lourde des immunoglobulines (Ig). Les cellules pro-B prolifèrent et se différencient en cellules pré-B qui se caractérisent par un réarrangement productif de la chaîne lourde  $\mu$  des Ig. Le résultat de ce réarrangement productif est l'expression en surface du récepteur pré-B qui correspond à l'association de la chaîne lourde  $\mu$  réarrangée avec une pseudochaîne légère  $\psi$  et les molécules  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ . Les cellules pré-B se divisent et subissent le processus de réarrangement des segments géniques V, J du locus de la chaîne légère des Ig. Lorsqu'un réarrangement est productif, les chaînes légères réarrangées déplacent les pseudochaînes  $\psi$  pour s'associer à la chaîne lourde  $\mu$  et former une Ig de type M ( $IgM$ ). Les cellules exprimant l' $IgM$  à leur surface sont classées LB immatures. Le développement ultérieur des LB immatures conduit à la coexpression de l' $IgM$  et l' $IgD$  membranaires, qui caractérisent les LB matures. D'un point de vue moléculaire, l'expression de ces deux types d'Ig implique l'épissage alternatif de l'ARN du transcrit primaire de la chaîne lourde pour permettre la production de deux ARNm, l'un codant la forme membranaire de la chaîne  $\mu$  et l'autre celle de la chaîne  $\delta$ . Les LB matures sortent de la MO et rejoignent les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions et la rate, via la circulation sanguine. Les LB matures sont dits naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré l'Ag.

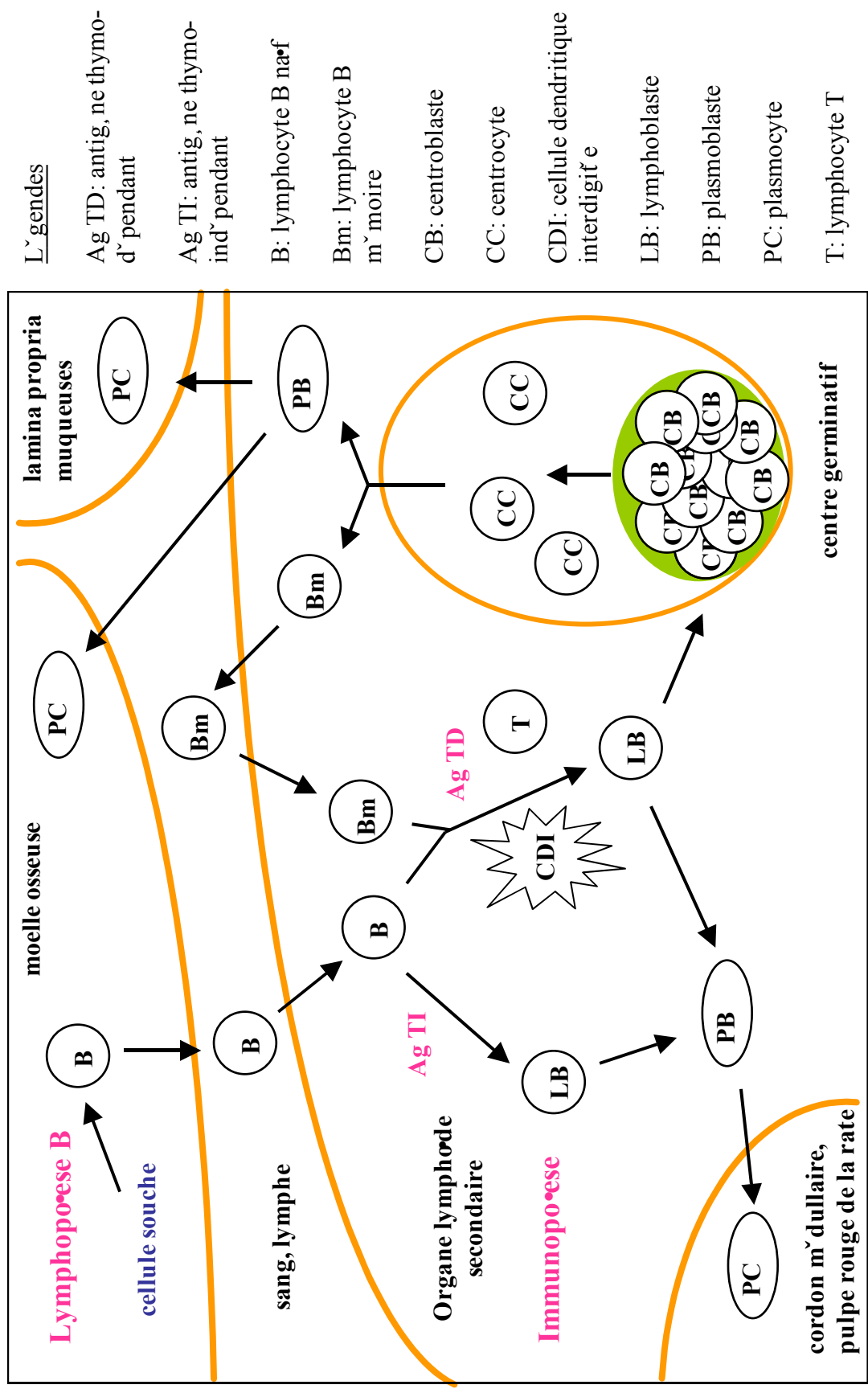
Tout au long de la vie, de nombreuses cellules empruntent chaque jour la voie de différenciation du LB mais très peu d'entre elles deviennent des LB matures. En effet, on estime que 90% des cellules de la lignée B produites quotidiennement meurent sans même quitter la MO. Les réarrangements aberrants des gènes des Ig et le processus de sélection négative, suivi d'une élimination (délétion clonale) des LB immatures qui expriment une  $IgM$  autoréactive contre les Ag du soi exprimé dans la moelle osseuse sont responsables de cette perte.

## II) Immunopoïese B

La première étape nécessaire à la génération de PC est l'activation des LB. Cette étape est initiée lorsque le LB rencontre l'Ag. En plus des signaux délivrés par la liaison de l'Ag à son récepteur sur le LB, l'activation requiert une combinaison de signaux divers provenant des pathogènes et de partenaires cellulaires comme les cellules dendritiques (CD) ou les lymphocytes T (LT). En outre, la nécessité, au cours de cette étape, d'une coopération avec un LT spécifique de l'Ag présenté sous forme de complexes CMH-peptides à la surface du LB, distingue deux classes d'Ag : les Ag thymo-indépendants (TI) et les Ag thymo-dépendants (TD). Cette distinction se répercute sur le type de réponse immune à médiation humorale qui sera elle aussi qualifiée de réponse TI ou TD. Enfin, tandis qu'une réponse primaire sera caractérisée par l'activation de la population de LB naïfs, les réponses ultérieures seront déclenchées par l'activation de LB à mémoire.

Quel que soit le type d'activation, les LB activés seront amenés à se différencier en PC au sein de foyers extrafolliculaires. De plus, comme nous le verrons, au cours d'une réponse immunitaire TD, quelques lymphoblastes donnent naissance à des centres germinatifs (CG), siège de l'établissement de la mémoire B. Les LB sélectionnés au cours de cette réaction peuvent également se différencier en PC.

Une représentation schématique des différentes étapes conduisant à la génération de PC au cours des réponses immunitaires à médiation humorale TI et TD est illustrée par la figure 1.



**Figure 1: Repré sentation sché matique des diffé rentes tapes de la diffé renciation plasmocytaire**

## **A) Réponse immunitaire à médiation humorale thymo-indépendante**

Comme nous l'avons évoqué, les réponses humorales TI diffèrent des réponses humorales TD par l'absence de coopération avec un LT spécifique de l'Ag. Les Ag TI peuvent être divisés en deux types, le type 1 et le type 2. Ils activent les cellules B par des mécanismes différents.

La plupart des Ag TI-1 sont des activateurs polyclonaux des LB, c'est à dire qu'ils activent tous les LB indépendamment de leur spécificité Ag. Ceci dit, lorsque les LB sont exposés à des concentrations faibles d'Ag TI-1, seuls les LB spécifiques d'épitopes de l'Ag seront activés. Le prototype de l'Ag TI-1 est le lipopolysaccharide (LPS), un composant majeur des parois des bactéries GRAM négatives.

Les Ag TI-2 diffèrent des Ag TI-1 car ils présentent une capacité limitée à induire une réponse humorale chez les nouveau-nés et chez les individus qui présentent un déficit inné ou acquis de la protéine tyrosine kinase BTK (« Bruton's tyrosine kinase ») impliquée dans la voie de signalisation du BCR. Les Ag TI-2 sont des molécules qui présentent des motifs répétés, comme les protéines polymériques (par exemple la flagelline bactérienne) ou les polysaccharides de la paroi cellulaire des bactéries. Ce type d'Ag active les cellules B en agrégeant les Ig membranaires des LB spécifiques. Le signal délivré permet l'activation des LB, mais n'est pas suffisant pour induire leur différenciation en PC (Vos et al, 2000). Des signaux accessoires divers délivrés par les pathogènes et/ou des partenaires cellulaires apparaissent nécessaires.

Les LB activés par des Ag TI vont proliférer et seront amenés à se différencier en PC au sein de foyers extrafolliculaires (Garcia de vinuesa, 1999a). La réponse humorale TI est généralement faible et l'IgM est l'Ac sécrété prédominant. Cependant, elle est cruciale car elle permet à l'hôte de développer une réponse humorale rapide et efficace, avec un taux d'Ac suffisant pour pallier la rapide multiplication des pathogènes.

## **B) Réponse immunitaire à médiation humorale thymo-dépendante**

L'activation d'un LB par un Ag TD nécessite des interactions entre trois partenaires : une CD mature présentant l'Ag, un LB et un LT ayant une spécificité compatible. Ces trois types cellulaires ont en commun l'expression du récepteur à chimiokine CCR7, qui rend possible leur rencontre dans les aires T des organes lymphoïdes secondaires où les ligands de CCR7, CCL19 et CCL21, sont libérés à forte concentration (Forster et al, 1999 ; Gunn et al, 1999 ; Reif et al, 2002).

Les CD immatures capturent l'Ag au niveau des tissus infectés. Les CD subissent alors des changements qui vont leur permettre de rejoindre les zones T des tissus lymphoïdes secondaires. Elles diminuent l'expression de molécules d'adhérence (cadherines) pour se détacher de leur support tissulaire. Elles secrètent de nombreuses protéases qui désorganisent la matrice extracellulaire avoisinante et facilitent leur déplacement dans le tissu avant de gagner un vaisseau lymphatique. Enfin, elles acquièrent l'expression du récepteur CCR7 qui assure leur migration par chimiotactisme vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires voisins qui prodiguent CCL19 et CCL21 (Dieu et al, 1998 ; Sallusto et al, 1998 ; Sozzani et al, 1998 ; Yanagihara et al, 1998). Cette migration s'accompagne de l'apprêtement de l'Ag sous forme de complexes CMH-peptides présentés à leur surface et de leur maturation (elles acquièrent en particulier l'expression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86) . Ainsi, une fois dans les aires T, les CD, alors CD interdigitées (CDI), sont capables d'activer les LT naïfs spécifiques de l'Ag. Il faut noter que des Ag solubles peuvent être drainés directement vers des organes lymphoïdes secondaires, des CD résidentes de ces organes les capturent et les présentent sur place.

Les LT naïfs expriment de manière constitutive les récepteurs CCR7 et CXCR4. L'expression de ces récepteurs leur permet de répondre aux signaux chimioattractants des zones T des organes lymphoïdes secondaires et plus particulièrement des CDI (CCL19, CCL21 et SDF-1). Ainsi, ils passent continuellement dans les zones T et s'agglutinent de manière importante autour des CDI. Un contact s'établit entre LT et CD grâce à des molécules d'adhérence. Ce contact qui dure quelques minutes permet au TCR à la surface du LT d'atteindre le complexe CMH-peptide présenté par la CD. Les rares LT dont le TCR est spécifique se retrouvent piégés alors que les autres se détachent. La coopération cellulaire

(synapse 1) ainsi établie aboutit à l'activation du LT. Les LT activés prolifèrent et expriment des molécules stimulatrices comme le ligand du CD40.

Les LB matures qui ont fixé l'Ag par l'intermédiaire de leur Ig membranaire internalisent l'Ag et le présentent après apprêtement associé à des molécules de classe II de CMH. La liaison de l'Ag au BCR induit également l'augmentation de l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 et entraîne leur migration vers les zones T où les ligands de CCR7, CCL19 et CCL21, sont produits (Reif et al, 2002). En pénétrant dans la zone T, les LB sont piégés par les LT qui reconnaissent le complexe CMH-peptide à leur surface. Le contact qui s'établit ensuite entre LT et LB constitue la deuxième synapse immunologique qui conduit à l'activation du LB. Les LB activés ou lymphoblastes se multiplient et forment des foyers d'expansion clonale aux bords de la zone T. La majorité de ces lymphoblastes participent *in situ* à la réaction extrafolliculaire. Quelques-uns vont migrer vers les follicules où ils initieront la réaction du centre germinatif (Jacob et al, 1991).

Une interaction moléculaire essentielle dans cette synapse est la liaison du CD40, exprimé de manière constitutive par les LB, à son ligand, exprimé de façon transitoire par les LT activés. En effet, leur liaison contribue au déclenchement du cycle du LB au repos et ainsi à la prolifération des LB spécifiques de l'Ag.

### ***1) Foyers d'expansion et de différenciation extrafolliculaires***

Au sein des foyers d'expansion clonale, les lymphoblastes se multiplient de manière exponentielle avant de se différencier *in situ* en progéniteurs plasmocytaires que sont les plasmoblastes (PB). Les PB migrent et se localisent ensuite dans les foyers extrafolliculaires des cordons médullaires du ganglion ou de la pulpe rouge de la rate. Ils trouvent dans ces zones une population particulière de CD nécessaire à leur survie tandis qu'ils continuent de proliférer et qu'ils se différencient en PC (Garcia de Vinuesa et al, 1999b). La majorité de ces PC ont une durée de vie de 2 à 3 jours (Smith et al, 1996 ; Sze et al, 2000) après lesquels ils meurent par apoptose *in situ*.

## ***2) Réaction du centre germinatif***

L'activation B médiée par un Ag dit TD est caractérisée par l'apparition de CG. La formation du CG est initiée à partir de quelques lymphoblastes qui migrent, de concert avec quelques LT, des foyers d'expansion clonale vers les follicules primaires adjacents. Ces derniers se développent alors en follicules secondaires. Au cours de la première étape de la formation du CG, les lymphoblastes prolifèrent de manière exponentielle au sein du réseau de cellules dendritiques folliculaires (CDF). Les LB qui formaient le follicule primaire sont repoussés à la périphérie pour constituer le manteau folliculaire. La deuxième étape correspond à la compartimentation en zone sombre et zone claire du CG. Les centroblastes dérivant des lymphoblastes se regroupent à un pôle du follicule constituant la zone sombre du CG. Ils se divisent pour donner naissance à des descendants appelés centrocytes, cellules non proliférantes qui forment la zone claire du CG. Les centrocytes se différencient en PC ou en LB à mémoire.

Au stade centroblaste, des mutations aléatoires se produisent dans les gènes des régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères des Ig. Ce processus dit d'hypermutation somatique est responsable d'une modification de l'affinité du BCR pour l'Ag qui a déclenché la réaction du CG. Les cellules porteuses d'une Ig présentant une forte affinité pour l'Ag sont sélectionnées dans la zone claire, parmi la population de centrocytes. Les centrocytes sont destinés à mourir par apoptose. La sélection d'un centrocyte par l'Ag, Ag présenté sous forme de complexe immun par les CDF, est nécessaire mais pas suffisante à sa survie, d'autres signaux sont fournis par des LT CD4+ présents dans la zone apicale de la zone claire. Au cours de la réaction du CG, un autre processus appelé commutation de classe permet aux LB de changer d'isotype tout en conservant la même spécificité Ag. D'un point de vue moléculaire, il s'agit d'un réarrangement intra-chromosomique entre les gènes de la région variable des chaînes lourdes et de la région constante de n'importe quel isotype. Ce processus et le processus d'hypermutations somatiques sont sous la dépendance de l'enzyme AID (« Activation Induced Deaminase »). Ces étapes permettent de donner naissance à des cellules présentant une Ig de haute affinité et de classe adaptée.

On a longtemps pensé que le processus de sélection au sein du CG conduisait uniquement à la différenciation de cellules présentant une Ig de haute affinité pour l'Ag en PC ou en LB à mémoire. Cependant, les travaux de Smith et coll ont mis en évidence qu'à l'issue



d'une réponse primaire, tandis que la quasi-totalité des PC formés présentent un faible nombre de mutations somatiques et sécrètent des Ac de forte affinité pour l'Ag, les LB à mémoire ont subi un nombre conséquent de mutations et seulement 65% présentent une forte affinité pour l'Ag. Ces données supportent un modèle dans lequel la formation des PC correspondrait à la différenciation de cellules présentant une forte affinité pour l'Ag qui ont été sélectionnées dans les phases précoces de la réaction du CG tandis que la formation des LB à mémoire coïnciderait avec la dissolution des CG (Smith et al, 1997). Ce concept a évolué puisqu'une étude récente montre que des LB à mémoire et des progéniteurs plasmocytaires sont détectés dans le sang à des stades précoces de la réaction du CG. Dans ce contexte, la réaction du CG serait plutôt un processus dynamique dans lequel les progéniteurs plasmocytaires et les LB à mémoire sont continuellement produits dès les phases précoces de la réaction du CG (Blink et al, 2005).

Les PC issus de la réaction du CG vont se localiser pour la majorité d'entre eux dans la MO. Les PC médullaires sont caractérisés par une longue durée de vie, ils sont la source des Ac sériques qui peuvent se maintenir plusieurs années après la résorption de l'infection (Manz et al, 1997 ; Slifka et al, 1998). Ces PC assurent le maintien de la mémoire sérologique contre l'Ag initial, qui va permettre l'exclusion immédiate ou la destruction du pathogène lors d'une nouvelle exposition (Manz et al, 2005). Nous verrons dans le paragraphe suivant que Bernasconi et coll proposent également un réapprovisionnement continu en PC pour rendre compte de la longévité de la mémoire sérologique à l'échelle humaine (Bernasconi et al, 2002). Les LB à mémoire assurent la mémoire B centrale. Ils ont la capacité de se différencier plus rapidement et pour une dose d'Ag plus faible en PC sécréteurs d'Ac de haute affinité et de classe adaptée au pathogène que des LB naïfs lors d'une réponse primaire.

### ***3) Mémoire sérologique***

Suite à une infection ou une vaccination, des taux d'Ac présentant une forte affinité pour l'Ag initial sont détectables dans le sérum pour de longues périodes. La présence de ces Ac nous confère une protection vis-à-vis du pathogène en retardant ou en prévenant une réinfection. Le maintien d'une concentration d'Ac stable implique leur production continue. Comme nous l'avons déjà évoqué, deux équipes ont documenté dans le modèle murin, la longue durée de vie des PC qui s'accumulent dans la MO suite à une immunisation (rappel anti-ovalbumine ou infection par le virus LCMV (« lymphocytic choriomeningitis

virus »)) (Manz et al, 1997, Slifka et al, 1998). Ces PC sont capables de maintenir la production d'Ac plusieurs mois, même en l'absence de LB à mémoire ou d'Ag (Slifka et al, 1998).

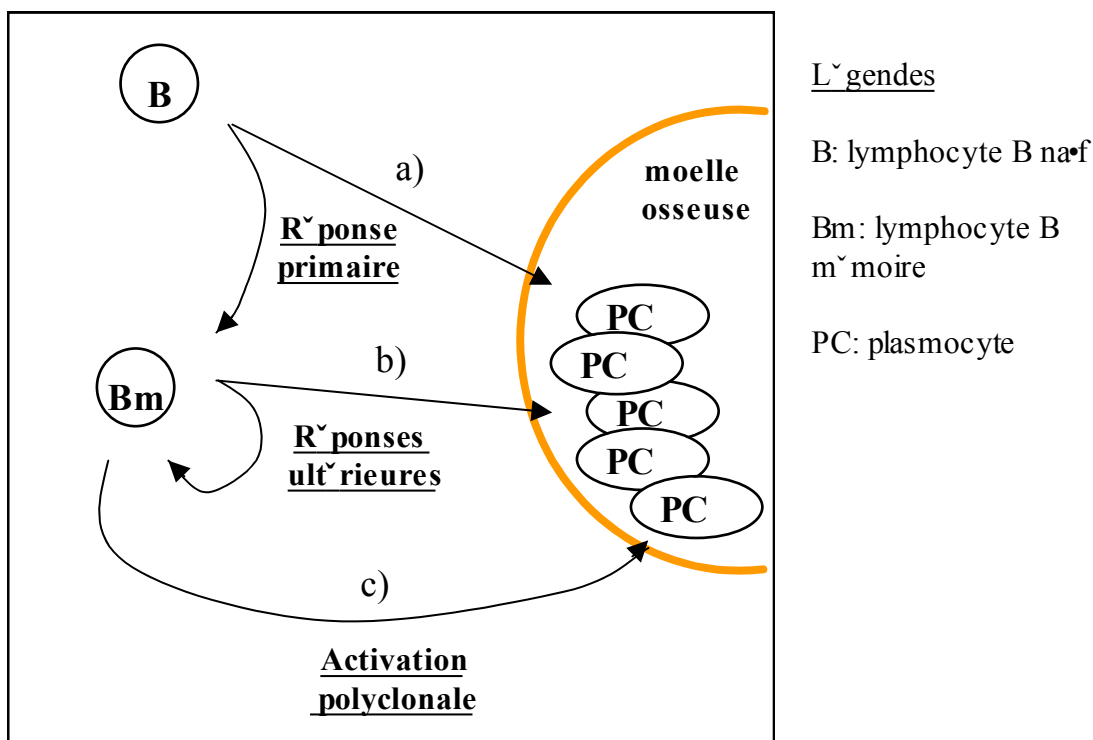
Pour rendre compte de la longévité de la mémoire sérologique à l'échelle humaine, Bernasconi et coll proposent également un réapprovisionnement permanent en PC qui résulterait de l'activation polyclonale continue de LB à mémoire en absence d'Ag (Bernasconi et al, 2002). Ce concept s'appuie sur 4 observations:

- 1) Les LB à mémoire isolés présentent la capacité à proliférer et se différencier in vitro en réponse à une stimulation par des oligodéoxynucléotidiques de synthèse riche en motifs CG méthylés (CpG-ODN) qui miment les ADN bactériens.
- 2) Des PC spécifiques de la toxine tétanique sont détectés dans le sang des années après immunisation et leur fréquence est identique à celle des LB à mémoire de même spécificité.
- 3) Il existe une corrélation entre la concentration d'Ac spécifiques de la toxine tétanique et la fréquence des LB à mémoire de même spécificité proliférant et se différenciant in vitro en réponse aux CpG-ODN.
- 4) Suite à une injection de rappel anti-toxine tétanique, tandis que dans le sang la fréquence de PC spécifiques de la toxine tétanique augmente, la fréquence de PC présentant une spécificité Ag distincte (virus de la rougeole ou *Toxoplasma gondii*) augmente simultanément.

Il faut toutefois noter que deux études récentes ont une interprétation différente de la présence dans la circulation de PC non spécifiques après une injection de rappel anti-toxine tétanique chez des individus vaccinés. Les auteurs postulent pour une mobilisation de PC résidants de la moelle osseuse par compétition avec les PC nouvellement formés. Odendahl et coll s'appuient sur une analyse phénotypique comparative entre PC spécifiques et non spécifiques. Ils ont montré sur la base du niveau d'expression des molécules de CMH de classe II et des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CXCR4 que les PC non spécifiques avaient un phénotype évoquant celui des PC médullaires qui diffèrent des PC spécifiques nouvellement formés (Odendahl et al, 2005). Plus récemment Gonzalez-Garcia et coll ont approfondi l'analyse comparative des deux populations (Gonzalez-Garcia et al, 2006). Ils présentent des données supplémentaires qui incluent, l'expression du CD126 (chaîne du récepteur à l'interleukine-6), l'effet de l'interleukine-6 (IL-6) sur les PC isolés, l'expression

de Blimp-1 et l'expression du récepteur de mort CD95/Fas. Ils enrichissent de cette manière les points de distinction entre PC spécifiques et non spécifiques et soutiennent l'hypothèse de l'intégration des PC nouvellement formés, au sein du pool des PC à longue durée de vie, au détriment des PC déjà résidents. Cependant, cette interprétation est troublante en ce qui concerne les caractéristiques des PC non spécifiques. En effet, ces PC n'ont pas un phénotype similaire aux PC de la moelle en particulier en terme d'expression du CD138 et de Blimp-1. Bien qu'ils suggèrent que ces différences soient le résultat d'une déconnexion de ces cellules avec les signaux fournis par l'environnement médullaire, ces données soulèvent pourtant des interrogations.

Une représentation schématique des mécanismes de génération et de maintien de la mémoire sérologique est illustrée par la figure 2.



**Figure 2 : Modèle de génération et de maintien de la mémoire sérologique.** a) Génération de PC spécifiques à longue durée de vie à partir des LB naïfs au cours de la réponse à médiation humorale primaire pour constituer une réserve. b) Génération de PC spécifiques à longue durée de vie à partir des LB à mémoire au cours de la réponse secondaire et des réponses ultérieures pour augmenter ou réapprovisionner la réserve. c) Différenciation à bas bruit des LB à mémoire activés par des stimuli polyclonaux pour augmenter ou réapprovisionner la réserve en absence d'Ag.

### **III) Identification des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire**

#### **A) Phénotype**

Une fois engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, les cellules acquièrent des caractéristiques différentes des LB activés en particulier en ce qui concerne leur phénotype. Ainsi, par l'analyse de trois marqueurs membranaires que sont le CD20, le CD38 et le CD138, des cellules présentant différents niveaux de maturité ont pu être identifiées au laboratoire. Selon un ordre de maturité croissant, nous distinguons les pré-plasmoblastes (préPB) (CD20+/-CD38+CD138-), les plasmoblastes (PB) (CD20-CD38++CD138-) et les PC (CD20-CD38+++CD138+) (Jego et al, 1999 et 2001).

In vivo, à la sortie des organes lymphoïdes secondaires, les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire migrent en empruntant la circulation sanguine vers des sites où elles se localiseront de manière définitive pour exercer leur fonction effectrice immédiate ou mémoire. Ainsi la logique veut qu'il soit aisé d'établir des correspondances entre le niveau de maturité et la localisation anatomique des cellules. Considérant ces données, le prototype du PC mature ne peut être que le PC médullaire. Il constitue la référence phénotypique en la matière.

Les PC médullaires sont caractérisés par une absence totale ou partielle d'expression d'un certain nombre de marqueurs pan-B. Parmi ces marqueurs, on peut citer :

- le CD20.
- le CD19, pour lequel, il faut noter que l'expression est réduite par rapport aux LB mais pas totalement absente.
- les molécules du CMH de classe II, parmi lesquelles la molécule HLA-DR. Ces pertes ont une répercussion sur le plan fonctionnel. En effet, ces cellules, à l'inverse des LB, sont incapables de participer à la présentation antigénique.
- les Ig membranaires, récepteurs de l'Ag (BCR). Par ce biais, ces cellules ne sont plus capables de répondre à des signaux antigéniques.

Mais également par d'autres marqueurs dont l'expression est acquise ou augmentée:

- les Ig intracytoplasmiques.
- le CD38, ce marqueur est d'ailleurs largement utilisé pour identifier les PC. Ce n'est pas un marqueur spécifique mais son niveau d'expression élevé permet d'isoler les PC humains des autres populations de la MO (Terstappen et al, 1990).
- Le CD27 (Avery et al, 2005). L'expression du CD27 n'est pas restreinte aux PC, il est également exprimé par les LB à mémoire et du CG.
- le CD138 ou syndecan-1 est un héparane sulfate. En 1996, son identification en tant que cible de l'Ac B-B4, spécifique des PC normaux et tumoraux (Pellat-Deceunynck et al, 1994), a mis en évidence son expression sur les PC (Wijdenes et al, 1996). Chez l'homme, les épithélia et les carcinomes expriment syndecan-1 mais parmi les cellules hématopoïétiques, son expression est restreinte aux PC normaux et tumoraux (dans la moelle seules les cellules présentant une forte expression du CD38 sont marquées). Chez la souris, syndecan-1 est également exprimé par les lymphocytes pré-B (Sanderson et al, 1989). Comme nous l'avons vu, au cours de la différenciation, son expression n'est induite qu'à partir du stade PC, il est de ce fait possible de distinguer grâce à ce marqueur le PC de son progéniteur le PB (Jego et al, 1999 et 2001).

L'hétérogénéité du phénotype de ces cellules en fonction de leur localisation anatomique d'origine ne rend pas seulement compte de niveaux de maturité différents. En effet, leur localisation est finement régulée par des molécules d'adhésion et des récepteurs à chimiokines acquis au cours du processus de différenciation (Médina et al, 2002 ; Cyster, 2003). Ce phénomène contribue à l'expression de molécules spécifiques de leur localisation. Par exemple, les PC à IgA qui se localisent au niveau des muqueuses expriment de manière spécifique le récepteur à chimiokines CCR10 (Kunkel et al, 2003).

## **B) Morphologie**

Les critères morphologiques sont beaucoup moins stringents que les critères phénotypiques. Ils permettent tout de même de distinguer les PC des PB.

Les PC sont des cellules de forme ovale d'environ 15µm de diamètre. Colorées au Giemsa, ces cellules présentent un cytoplasme très basophile (bleu foncé). Le noyau est presque toujours repoussé à l'un des pôles du cytoplasme, son grand axe est perpendiculaire à celui de la cellule. L'aspect « dit en mottes » de la chromatine du noyau est caractéristique. L'euchromatine est rassemblée en amas grossiers, séparés par de fins espaces d'hétérochromatine rose claire. Autre particularité très nettement visible dans les PC, le centrosome incolore juxta-nucléaire. En microscopie électronique, ils sont caractérisés par la présence d'un ergastoplasme très développé, signe d'une biosynthèse très active d'Ac.

Les PB sont des cellules qui présentent des critères indiquant leur appartenance aux cellules plasmocytaires avec les caractères de l'immaturité. En microscopie électronique, elles présentent un ergastoplasme moins développé.

## **IV) Régulation transcriptionnelle de la différenciation plasmocytaire**

Sur un plan moléculaire, différentes études ont permis de mettre en évidence que la différenciation plasmocytaire est un processus finement orchestré par une cascade de régulations géniques. Nous verrons dans les paragraphes suivants les facteurs de transcription clés qui ont déjà été identifiés. Bcl-6 et Pax-5 inhibent ce processus au sein du CG tant que les processus de maturation d'affinité et de commutation isotypique ne sont pas achevés tandis que Blimp-1, IRF-4 et XBP-1 induisent la différenciation et favorisent la fonction des PC.

### **A) Bcl-6**

Au sein du compartiment lymphocytaire B, le niveau d'expression le plus élevé de la protéine Bcl-6 est limité aux LB du CG (Cattoretti et al, 1995 ; Allman et al, 1996). D'autre part, suite à une immunisation par un Ag TD, les LB de souris déficientes en Bcl-6 ne forment pas de CG (Dent et al, 1997 ; Fukuda et al, 1997 ; Ye et al, 1997). Enfin, l'expression ectopique de Bcl-6 réprime l'expression de l'ARNm de Blimp-1 et la différenciation plasmocytaire (Reljic et al, 2000). Ces données suggèrent que Bcl-6 contrôle la formation et le maintien de la réaction du CG en inhibant la différenciation plasmocytaire à deux points distincts. Premièrement, seuls les lymphoblastes qui verront l'expression de Bcl-6 augmentée ne se différencieront pas mais s'accumuleront et initieront ainsi la réaction du CG. Deuxièmement, tant que les LB du CG n'auront pas reçu de signaux appropriés, l'expression de Bcl-6 sera maintenue et empêchera une différenciation prématurée en PC.

Le mécanisme par lequel Bcl-6 réprime l'expression de Blimp-1 est sujet à controverse. Ainsi, différents auteurs ont proposé successivement :

- 1) Reljic et coll ont montré que la séquence consensus de liaison de Bcl-6 était identique à celle de STAT-3 et suggéré qu'ainsi Bcl-6 pourrait inhiber l'activation par STAT-3 du gène codant pour Blimp-1, PRDM1, en se fixant à sa place sur le promoteur (Reljic et al, 2000).
- 2) Vasanwala et coll ont montré que Bcl-6 pourrait s'associer à AP1 et proposé que par cette association, Bcl-6 pourrait bloquer l'activité de AP1 et réprimer par ce biais la transcription du gène PRDM1 (Vasanwala et al, 2002).

- 3) Tunyaplin et coll ont trouvé deux sites de liaison à Bcl-6 respectivement dans l'intron 3 et dans l'intron 5 et proposé la repression directe du gène PRDM1 par Bcl-6. Cette étude indiquait par ailleurs que le site de liaison à STAT-3 se trouvait dans une autre région (Tunyaplin et al, 2004).

## **B) Pax-5**

Les souris déficientes en Pax-5 présentent un blocage de la lymphopoïèse B au stade pro-B. La caractérisation des cellules pro-B issues de ces souris a révélé que ces progéniteurs pouvaient se différencier *in vitro* en un large panel de cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes, à l'exception du lignage B. A l'inverse, les cellules chez lesquelles l'expression de Pax-5 était restaurée se différenciaient uniquement en LB (Nutt et al, 1999). D'autre part, l'inactivation de Pax-5 au stade B mature entraîne une diminution du nombre de LB matures mais également des défauts phénotypiques et fonctionnels de ces derniers (Horcher et al, 2001). En conclusion, Pax-5 est requis pour l'engagement des progéniteurs lymphoïdes dans la voie de différenciation B et le maintien de son expression est nécessaire tout au long de la lymphopoïèse B pour garantir la fonction, l'identité et la survie des LB matures. En accord avec ces données, au sein du système hématopoïétique, la protéine BSAP (« B-cell lineage specific activator protein »), codée par le gène Pax-5, est exprimée uniquement dans le lignage B. Mais au sein de ce compartiment, son expression est très étendue : des progéniteurs lymphoïdes B les plus précoces jusqu'aux LB matures (Adams et al, 1992). Dans tous les cas, BSAP exerce sa fonction en activant la transcription de gènes B (CD19,  $Ig\alpha$ , BLNK et CIITA) (Kozmik et al, 1992 ; Horcher et al, 2001) et en réprimant de manière simultanée la transcription des gènes spécifiques des autres lignages (Delogu et al, 2006).

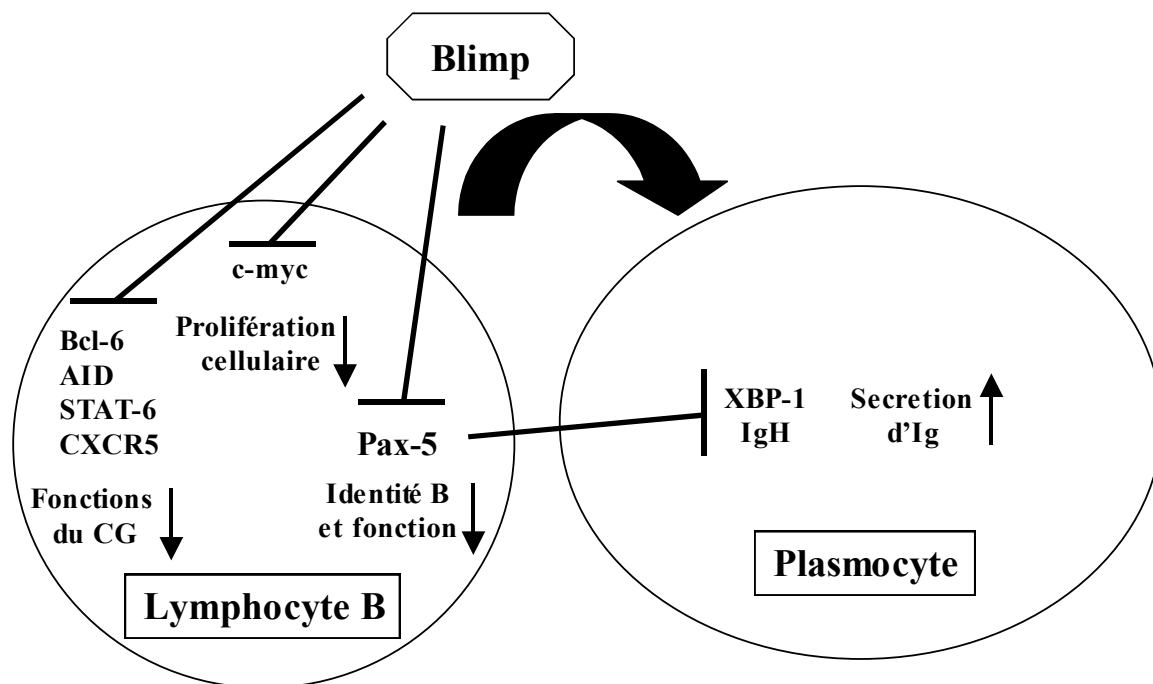
Pax-5 n'est pas exprimé par les PC. La perte de l'expression de ce gène au cours de la différenciation plasmocytaire entraîne l'activation de gènes réprimés au cours de la lymphopoïèse B qui contribuent à la cascade de transcription qui régule la différenciation plasmocytaire (Delogu et al, 2006). Par conséquent, à l'instar de Bcl-6, l'expression de Pax-5 dans les LB du CG est nécessaire pour inhiber la différenciation plasmocytaire.



## C) Blimp-1

Blimp-1 est un facteur de transcription, codé par le gène PRDM1, qui présente un domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc. En 1994, Blimp-1 a été identifié et son rôle dans la différenciation plasmocytaire a été mis en évidence pour la première fois. En effet, cette protéine, dont l'ARNm était induit rapidement au cours de la différenciation plasmocytaire, s'est avérée, au cours d'expériences de surexpression par transfection, nécessaire et suffisante pour induire des changements phénotypiques et fonctionnels caractéristiques des PC tels que l'expression du CD138 et la sécrétion d'Ig (Tuner et al, 1994). Puis plusieurs travaux l'ont présenté comme un facteur clé du développement des PC. On retiendra en particulier qu'un déficit sévère en PC issus d'une réponse immunitaire TI et TD primaire ou secondaire a été décrit chez les souris déficientes pour le gène PRDM1 dans le compartiment B (Shapiro-Shelef et al, 2003). En outre, il est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules plasmocytaires (Angelin-Duclos et al, 2000), et son niveau d'expression augmente au cours de la maturation des PC (Kallies et al, 2004).

Des études par micropuces à ADN ont mis en évidence que Blimp-1 induit une cascade de régulation génique et contrôle ainsi au moins trois programmes d'expression génique. En effet, l'expression de Blimp-1 par le biais d'interactions directes ou indirectes conduit à la régulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, les fonctions relatives aux LB matures (signalisation du BCR, fonctions du CG) et dans la sécrétion d'Ig (pour revue, Calame et al, 2003). Ce processus permet la maturation de cellules plasmocytaires au final non proliférantes qui sécrètent des Ig. De manière intéressante, parmi les gènes réprimés par Blimp-1, on trouve Bcl-6 et Pax-5. Ainsi l'expression de Blimp-1 assure également l'irréversibilité de la différenciation plasmocytaire (Shaffer et al, 2002). Les principales cibles de Blimp-1 et les fonctions qui leur sont associées sont présentées dans la figure 3.



**Figure 3 : Modèle de régulations géniques induites par l'expression de Blimp-1.** Blimp-1 par le biais d'interactions directes ou indirectes, réprime les gènes impliqués dans la prolifération, les fonctions du CG, les fonctions et phénotypes relatifs aux LB matures tandis qu'il active les gènes impliqués dans la sécrétion d'Ig (d'après Calame et al, 2003).

Blimp-1 a longtemps été présenté comme le facteur déterminant dans l'engagement des LB dans le processus de différenciation plasmocytaire. Les travaux récents de Kallies et coll montrent une modification de la fonction de Pax-5, entraînant la régulation de l'expression de gènes importants pour le processus de différenciation plasmocytaire, en amont de l'induction de Blimp-1. Ils proposent que cet événement initie le processus de différenciation plasmocytaire et entraîne la génération de cellules préplasmoblastiques. A ce stade, l'induction de Blimp-1 induirait la cascade de régulation génique décrite précédemment, incluant la répression complète de Pax-5, conduisant à la maturation des cellules plasmocytaires (Kallies et al, 2007). Nous verrons dans le E) que Sciammas et coll font le même constat mais proposent un rôle du facteur de transcription IRF-4 en amont de l'induction de Blimp-1 (Sciammas et al, 2006).

## **D) XBP-1**

Comme les PC synthétisent et sécrètent une grande quantité d'Ig, la réponse au stress du réticulum endoplasmique, appelée « unfolded protein response » joue un rôle important dans la fonction des PC.

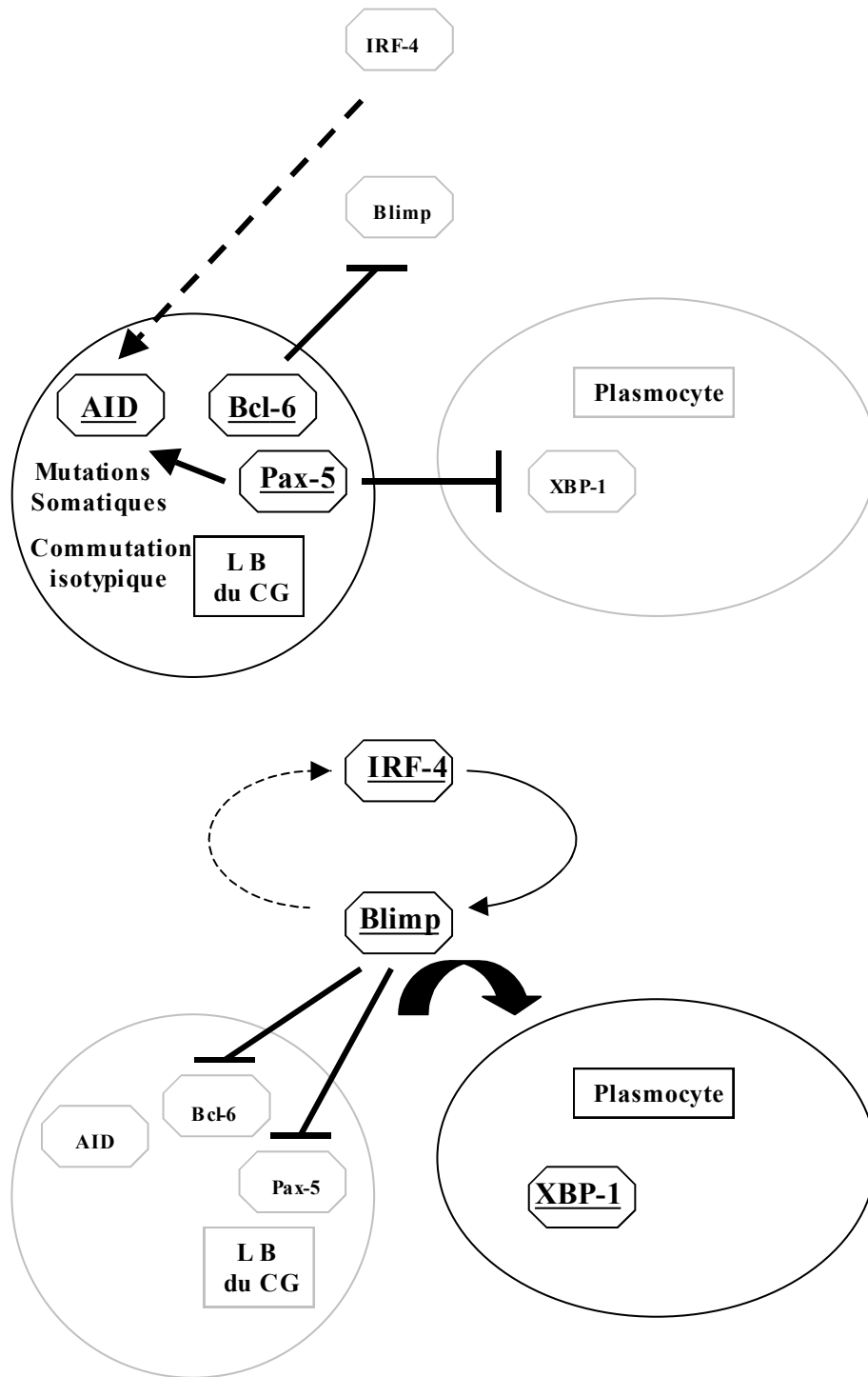
XBP-1 est exprimé de façon ubiquitaire mais l'expression de son ARNm augmente au cours de la différenciation plasmocytaire. De plus, un déficit sévère en PC issus d'une réponse immunitaire TI et TD primaire ou secondaire a été décrit chez les souris chimères déficientes pour le gène XBP-1 dans le compartiment lymphoïde (Reimold et al, 2001). Ces données indiquent que XBP-1 est lui aussi un acteur important de la différenciation plasmocytaire. Cependant, XBP-1 agit en aval de Blimp-1. En effet, Blimp-1 est exprimé normalement dans les LB XBP-1 <sup>-/-</sup> (Reimold et al, 2001).

XBP-1 est réprimé par Pax-5 (Reimold et al, 1996). D'après les données de Lin et coll, la répression de Pax-5 par Blimp-1 est nécessaire à l'induction de XBP-1 lors de la différenciation plasmocytaire (Lin et al, 2002). Ainsi, Blimp-1 participerait à l'induction de XBP-1 de manière indirecte en réprimant Pax-5. Cependant, des données contradictoires ont été obtenues par Kallies et coll. Ils mettent en évidence une induction de XBP-1 indépendante de l'expression de Blimp-1 (Kallies et al, 2007). Outre l'induction de l'ARNm de XBP-1, la différenciation plasmocytaire nécessite son épissage pour générer une forme courte XBP-1s qui code pour une protéine plus stable et plus active.

## **E) IRF-4**

IRF-4 est un membre de la famille des « interferon regulatory factor » (IRF). Contrairement aux autres membres de la famille des IRF, l'expression de IRF-4 n'est pas régulée par les interférons de type I et II (Matsuyama et al, 1995). Les souris déficientes pour IRF-4 présentent, au sein du compartiment B, une absence de CG et de PC (Mitrucker et al, 1997). En outre, IRF-4 est exprimé dans les PC et dans une sous-population de LB du GC qui expriment également Blimp-1 et syndecan-1 (Angelin-Duclos et al, 2000 ; Falini et al, 2000). Ainsi, IRF-4 semble au même titre que Blimp-1 et XBP-1 avoir un rôle important dans la différenciation plasmocytaire. Des travaux très récents éclaircissent la relation existant entre

Blimp-1 et IRF-4. Ils mettent en évidence l'action de IRF-4 en amont de Blimp-1. En outre, ces travaux montrent que IRF-4 contrôle également le processus de commutation isotypique via l'expression de l'enzyme AID. Le niveau d'expression de IRF-4 permet aux auteurs d'expliquer comment ce facteur peut coordonner les processus de commutation isotypique et de différenciation plasmocytaire (figure 4). L'activation du LB entraîne l'augmentation progressive de l'expression de IRF-4. Au sein des LB du CG, un niveau d'expression faible de IRF-4 induit l'expression de l'AID, à ce stade l'expression de Pax-5 et Bcl-6 réprime la différenciation plasmocytaire en réprimant Blimp-1. Un niveau d'expression plus élevé de IRF-4 induit l'expression de Blimp-1. Les auteurs proposent alors une amplification respective de ces deux facteurs par le biais d'une boucle de contrôle positif. Dans ce contexte, Blimp-1 peut alors réprimer Bcl-6 et Pax-5 et ainsi les gènes impliqués dans la fonction du CG dont l'Aicda codant pour l'AID (Sciammas et al, 2006). Toutefois, il faut noter que la relation entre ces deux facteurs de transcription reste sujette à controverse. En effet, deux études présentent des données soutenant une régulation indépendante de ces deux facteurs (Klein et al, 2006 ; Kallies et al, 2007).



**Figure 4 : Modèle de régulations géniques orchestrant la transition entre le stade LB du CG et le stade PC.** Le modèle intègre les régulations de 5 gènes codant pour des facteurs de transcription clés impliqués dans le processus de différenciation plasmocytaire et du gène codant pour l'enzyme AID. Les lignes en pointillés indiquent que la régulation peut-être indirecte (d'après Sciammas et al, 2006).

## **V) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation : rôle de l'environnement**

Le processus de différenciation plasmocytaire est étroitement lié au processus d'apoptose. En effet, *in vitro*, la différenciation des LB activés en PC est caractérisée par une apoptose massive. La quantité finale de PC générés va donc dépendre de la possibilité qu'auront les précurseurs à survivre. Cette notion de survie s'applique également aux PC eux-mêmes, elle entraîne la distinction d'une population de PC dits à courte durée de vie et d'une population de PC dits à longue durée de vie.

Quel que soit leur stade de différenciation, la survie des cellules est sous la dépendance de signaux fournis par des interactions avec d'autres types cellulaires dans des sites particuliers dans lesquels elles se sont localisées. Nous verrons dans les paragraphes suivants les types de cellules qui ont déjà été identifiés comme des partenaires nécessaires à la survie des PB et des PC puis nous envisagerons l'effet de certains facteurs solubles dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.

### **A) Coopération cellulaire**

#### ***1) Cellules dendritiques***

Comme nous l'avons vu précédemment les CD ont un rôle important dans le déclenchement d'une réponse humorale. Des données *in vitro* suggèrent même que ces cellules présentes dans les aires T des organes lymphoïdes secondaires, connues sous le nom de CDI, pourraient participer à la différenciation des LB activés en PC (Dubois et al, 1997). Cependant au cours de notre étude, une autre population de CD a attiré notre attention. Au cours d'une réponse immune, ces CD d'origine myéloïde sont trouvées associées aux PB au niveau des foyers d'expansion extrafolliculaires que sont la pulpe rouge de la rate et les cordons médullaires des ganglions. Cette association permet aux PB de survivre tandis qu'ils s'expandent (Garcia de Vinuesa et al, 1999b).

## **2) Cellules stromales**

La capacité des cellules stromales à prévenir l'apoptose des PC est particulièrement bien illustrée par les travaux de Merville et coll. Ils démontrent que les PC isolés d'amygdales survivent plus longtemps en présence de cellules stromales dérivées de la MO (Merville et al, 1996). Des résultats similaires sont obtenus par coculture de PC médullaires murins isolés avec des cellules stromales dérivées de la MO (Minges Wols et al, 2002). Ces données in vitro sont supportées par une étude in vivo chez la souris qui met en évidence l'association entre des PC CD138+/IgG+ et des cellules stromales au sein de la MO (Tokoyoda et al, 2004). Il faut toutefois noter que la localisation anatomique des cellules stromales ne semble pas avoir d'influence sur leur capacité à supporter la survie des PC (Merville et al, 1996 ; Skibinski et al, 1998).

## **3) Synoviocytes**

Dans certaines conditions pathologiques, les PC s'accumulent et survivent au niveau de sites particuliers qui sont caractérisés par un phénomène d'inflammation. En effet, des PC ont été détectés dans les reins des souris NZB/W (modèle murin de la maladie lupique) et au niveau de la synovie des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Kim et al, 1999 ; Cassese et al, 2001). Les synoviocytes sont des cellules présentes au niveau de la synovie, elles sont retrouvées associées aux PC dans la synovie des patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Les travaux réalisés sur le rôle de ces cellules dans la différenciation PC montrent qu'elles sont capables de supporter la différenciation de LB activés en PC (Déchanet et al, 1995). Il a de plus été mis en évidence que ces cellules sont capables de prévenir l'apoptose des PC isolés d'amygdales (Merville et al, 1996).

## **4) Lymphocytes T**

Une étude récente s'est intéressée à la survie des PC au sein des organes lymphoïdes secondaires. Les auteurs mettent en évidence la persistance des PC au sein d'amygdales humaines greffées à des souris. Dans ce modèle de xénogreffe, la déplétion des LT conduit à la disparition des PC. Le rôle des LT dans la survie des PC d'amygdales est ensuite confirmé dans un système de coculture in vitro de PC avec des LT tous deux isolés à partir d'amygdales. En outre, l'association entre PC et LT est mise en évidence au sein des amygdales greffées ou non et au sein de ganglions (Withers et al, 2007).

## **B) Facteurs solubles favorisant la survie**

### **1) SDF-1**

SDF-1 est une chimiokine produite par les cellules stromales, au niveau de la pulpe rouge de la rate, des cordons médullaires des ganglions et de la MO. Son rôle dans la genèse des PC à longue durée de vie localisés dans la MO a été mis en évidence dans un modèle de souris chimères irradiées et reconstituées par des cellules de foie fœtal de donneurs déficients pour le gène codant pour son récepteur CXCR4. Après immunisation, ces souris présentent une réduction d'un facteur trois des PC formés dans la MO. Cet effet est principalement dû à un défaut de localisation de ces cellules dans la MO. En accord avec cette conclusion, les travaux de Hauser et coll montrent que SDF-1 est un facteur chimioattractant pour les PC nouvellement formés qui expriment CXCR4 (Hauser et al, 2002). A l'inverse, plus tardivement lors d'une réponse immune, les PC ayant établi résidence dans la moelle osseuse ne sont pas attirés par ce facteur bien qu'ils aient gardé l'expression de CXCR4. Il est probable qu'à ce stade l'interaction de CXCR4 avec son ligand SDF-1 sera impliquée dans une fonction différente. Par ce biais SDF-1 pourrait alors favoriser l'adhésion des PC au stroma médullaire (Hargreaves et al, 2001) ou bien encore contribuer de manière directe à leur survie (Cassese et al, 2003).

### **2) Interleukine-6**

A l'origine, l'IL-6 a été identifiée comme un facteur capable d'induire la sécrétion d'Ig par des LB activés. Sur la base de ces observations, elle a dans un premier temps été présentée comme un facteur de différenciation plasmocytaire. Il est maintenant bien établi que le rôle de l'IL-6 dans la différenciation plasmocytaire tient à son activité sur les plasmoblastes. En ce sens, notre équipe a montré que l'expression du récepteur à l'IL-6 est fortement induite sur les préPB et PB. En accord avec l'expression de son récepteur, l'IL-6 est un facteur de survie et de prolifération des PB. Son action permet l'expansion du compartiment plasmoblastique qui se traduit de manière subséquente par une augmentation du nombre de PC générés (Jego et al, 1999 et 2001).

Le rôle de l'IL-6 dans la survie à long terme des PC est plus controversé. Le stroma médullaire est une source d'IL-6 et des études montrent que in vitro l'IL-6 agit comme un



facteur de survie pour des PC murins isolés de moelle osseuse (Minges Wols et al, 2002 ; Cassese et al, 2003). Cependant, *in vivo*, tandis que l'IL-6 est nécessaire à l'induction de la réponse humorale, elle n'apparaît pas essentielle à la survie à long terme des PC. En effet, la production d'Ac spécifique suite à une immunisation par le peptide OVA est retardée chez les souris déficientes en IL-6 en comparaison de leur contrepartie sauvage. Il faut attendre 4 semaines après l'immunisation pour observer des taux d'Ac sériques identiques au sein des 2 groupes de souris. Cependant, à long terme, ces taux restent stables et le nombre de PC spécifiques dans la moelle est complètement normal (Cassese et al, 2003).

### **3) *BAFF/APRIL***

BAFF (« B cell activating factor ») et APRIL (« a proliferation inducing ligand ») sont deux ligands de la famille du TNF, exprimés par les CD, les monocytes, les macrophages et les LT. Ces facteurs partagent trois récepteurs : BCMA (« B-cell maturation antigen »), TACI (« transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor ») et BAFF-R (« BAFF receptor »). BAFF-R et BCMA sont exprimés exclusivement à la surface de cellules du lignage B tandis que TACI est également présent à la surface d'une sous-population de LT activés. La possibilité pour ces deux facteurs d'interagir avec trois récepteurs, de surcroît avec des affinités différentes, complique l'étude de leurs effets. Il faut ajouter à ce schéma déjà complexe que l'utilisation de molécules adaptatrices différentes selon le récepteur suggère des voies de signalisation elles aussi différentes.

Les souris transgéniques pour le gène BAFF présentent une hyperplasie du compartiment lymphocytaire B périphérique qui s'accompagne d'une hypergammaglobulinémie avec dans certains cas la présence d'autoAc provoquant des désordres auto-immuns comparables à la maladie lupique (Mackay, 1999 ; Khare, 2000). A l'inverse, les souris déficientes pour ce gène présentent une réduction du compartiment lymphocytaire B périphérique qui s'accompagne d'une hypogammaglobulinémie. En outre, suite à une immunisation par un Ag TD ou TI, ces souris présentent un déficit en Ac spécifiques dirigés contre ces Ag, reflet d'une réponse humorale altérée (Schlemmer et al, 2001). Ces données suggèrent un rôle essentiel de BAFF au stade B mature mais également au cours de la différenciation plasmocytaire.

La compilation de diverses données de la littérature permet d'éclaircir le rôle de BAFF dans la différenciation plasmocytaire. In vivo, l'injection de BAFF soluble concomitante à une immunisation TD ou TI induit une augmentation du nombre de PC, augmentation associée à une apoptose réduite des LB activés (Do et al, 2000). D'autre part, l'injection d'une protéine recombinante chimérique TACI-Ig diminue le nombre de PC générés suite à une immunisation par un Ag TI, diminution associée à une apoptose accrue des PB (Balazs et al, 2002). Enfin, in vitro, BAFF est un facteur de survie des PB (Avery et al, 2003). En conclusion, BAFF, à l'instar de l'IL-6, permet la survie de cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, qui se traduit de manière subséquente sur le nombre de PC générés.

Une seule étude à ce jour permet d'impliquer BAFF et APRIL dans la survie à long terme des PC de la moelle osseuse. Dans cette étude, les auteurs montrent que la présence de BAFF ou d'APRIL recombinant permet de maintenir la survie de PC médullaires murins ex vivo. De plus, l'injection de TACI-Ig à des souris préalablement immunisées diminue de 65% le nombre de PC médullaires préalablement établis. En outre, cette étude met en exergue le rôle du récepteur BCMA dans cet effet pro-survie de BAFF et APRIL. En effet, 1) les PC expriment de faible quantité d'ARNm codant pour BAFF-R et TACI mais de forte quantité d'ARNm codant pour BCMA et 2) les souris déficientes pour le gène BCMA présentent un nombre réduit de PC médullaires à longue durée de vie en comparaison de leur contre partie sauvage (O'connor et al, 2004).

### **C) Complexes immuns**

D'après une étude récente, les complexes immuns seraient impliqués dans l'induction de l'apoptose des PC médullaires murins. Les auteurs mettent en évidence l'expression d'un récepteur au fragment Fc des Ig Fc $\gamma$ RIIb à la surface des PC médullaires murins. L'agrégation de ces récepteurs induit l'apoptose de ces cellules. Ces données suggèrent un modèle dans lequel les complexes immuns réguleraient de manière négative le nombre de PC persistants dans la MO. Ce processus favoriserait l'intégration d'une nouvelle spécificité antigénique dans le contingent de PC résidants de la MO (Xiang et al, 2007).

## **VI) Résultats**

Notre objectif a été de progresser dans la compréhension des mécanismes qui régissent l'apoptose et la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. L'étude de cette question se heurte à la difficulté d'isoler ces cellules à partir des tissus lymphoïdes car elles y sont en nombre infime. Pour pallier à cette difficulté, nous avons décidé d'utiliser un modèle de génération de PC in vitro. Je me suis par conséquent consacrée à l'obtention de PC in vitro selon deux modèles de stimulation des LB. Les résultats sont présentés dans le A), ils ont conditionné le choix du modèle utilisé pour l'étude. Les champs d'investigation relatifs à l'apoptose et à la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire sont vastes. Je me suis attelée pour ma part à :

- L'analyse par Western blot de l'expression d'un panel de protéines impliquées dans l'apoptose pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires associés à l'apoptose spontanée des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.
- L'étude de la sensibilité de ces cellules aux signaux de mort induits par l'activation des récepteurs de mort DR4, DR5 et CD95.
- L'étude du rôle des cellules dérivées des monocytes (ostéoclastes (OC), CD et macrophages) dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. En effet, comme nous le verrons, l'étude de la littérature apportait de nombreux arguments en faveur du rôle d'au moins deux de ces types cellulaires : OC et CD.

### **A) Obtention de plasmocytes in vitro**

L'étude des différents travaux s'appuyant sur des modèles de génération in vitro, met en évidence l'utilisation d'une variété de stimuli pour stimuler la différenciation des LB. Ces stimuli ont tous en commun d'être des activateurs polyclonaux. On trouve ainsi parmi ces stimuli, des Ac anti-Ig, le Staphylocoque de la souche Cowan 1 (SAC), un mitogène le Pokeweed, des ligands de molécules appartenant à la famille des récepteurs aux empreintes moléculaires de pathogènes, les « Toll-like receptor » (TLR), le ligand du CD40 (CD40L) ou des Ac anti-CD40. Certains de ces stimuli nécessitent une combinaison avec des cytokines

pour être efficaces, l'association interleukine-2 (IL-2) et interleukine-10 (IL-10) étant la plus couramment utilisée.

Quelle que soit la nature des facteurs utilisés, la prérogative à leur fonction est la mise en cycle des LB quiescents et leur prolifération. En effet, une prolifération des LB est nécessaire à la génération de PC. Jelinek et Lipsky l'ont mis en évidence, il y a plus de 20 ans, en inhibant complètement la capacité de LB à générer des cellules sécrétrices d'Ig en réponse au pokeweed par l'ajout d'hydroxyurée (Jelinek et Lipsky, 1983). Ensuite, un arrêt contrôlé du cycle est également nécessaire, comme le montre les travaux de l'équipe de Sélima Chen-Kiang et de l'équipe de Kathryn Calame sur, respectivement, le rôle de la protéine inhibitrice du cycle p18 (pour revue, Chen-Kiang, 2003) et de c-myc dans la différenciation plasmocytaire (Lin et al, 2000). Toutefois, une question reste sans réponse à savoir l'utilisation de ces différents stimuli a-t-elle une répercussion sur la nature des PC générés ?

Les données qui suivent sont issues d'un travail précédemment réalisé au laboratoire et de mes résultats expérimentaux, elles portent sur la génération de PC suivant deux modèles de stimulation des LB. La stimulation via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10 et la stimulation via le TLR9 en présence d'interleukine-15 (IL-15). Ces résultats ont conditionné le choix du modèle utilisé par la suite.

### ***1) Génération de plasmocytes à partir de lymphocytes B stimulés via le CD40***

Le modèle décrit par Arpin (Arpin et al, 1997) déjà utilisé au laboratoire, correspond à la stimulation des LB à mémoire via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10. Les étapes de la différenciation plasmocytaire dans ce modèle avaient été clairement identifiées, au laboratoire, par des jalons temporels et phénotypiques (Jego et al, 2001).

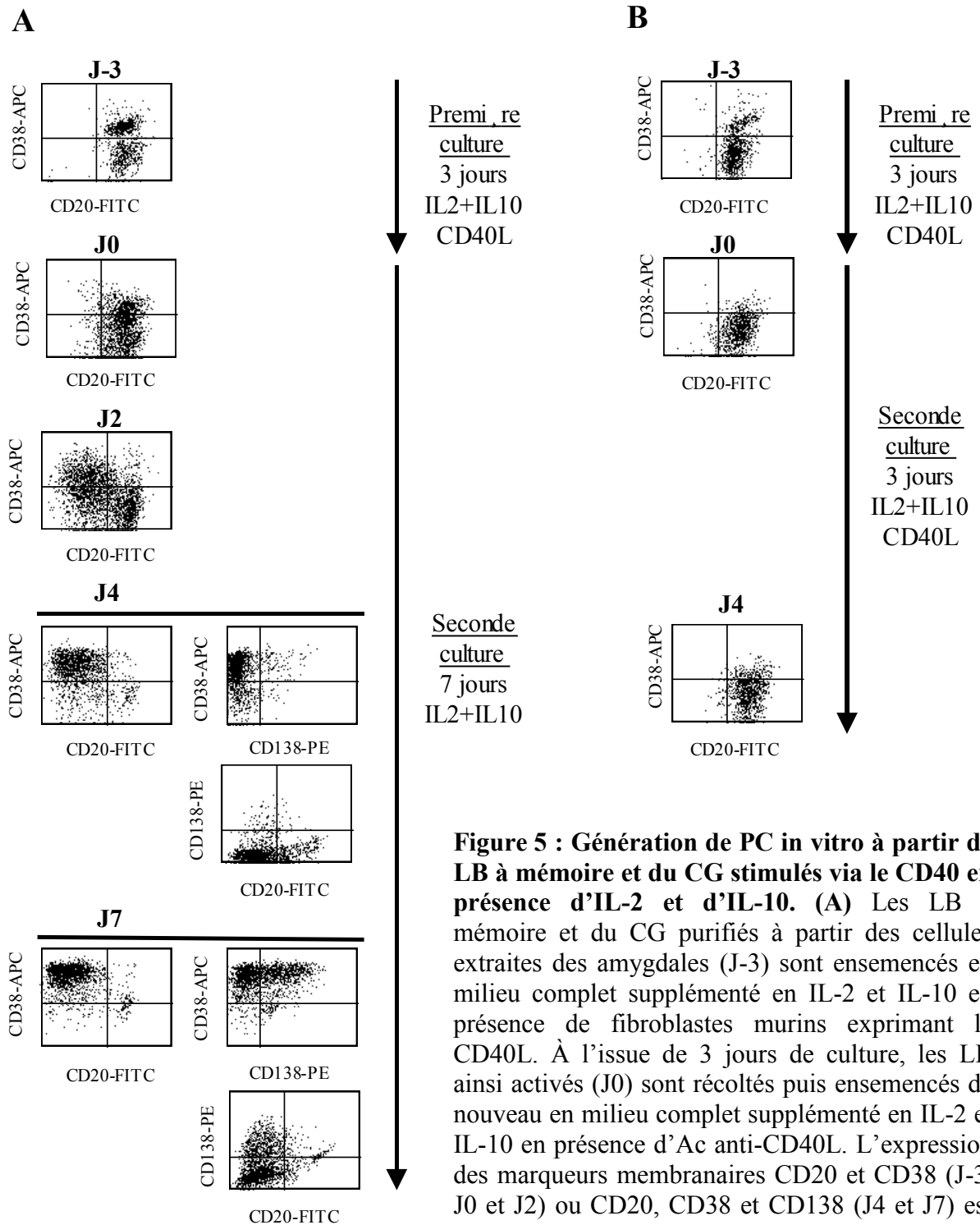
Il s'agit d'un système de culture en 2 étapes. Une coculture de 3 jours de LB à mémoire, purifiés à partir des amygdales, avec des fibroblastes murins transfectés exprimant le CD40L humain, en présence d'IL-2 (50U/ml) et d'IL-10 (100ng/ml), correspond à l'étape d'activation. Les LB sont ensuite cultivés 7 jours supplémentaires sans les fibroblastes afin de stopper la stimulation via le CD40. Au cours de ces 7 jours, la majeure partie des LB activés se différencie en PC. L'analyse des marqueurs membranaires CD20, CD38 et CD138, en cytométrie en flux, permet d'identifier les différentes populations présentes dans la culture.

Ainsi, après 2 jours, une fraction des LB activés est entrée dans le processus de différenciation. Ces cellules appelées préPB présentent un CD20 plus faible et un CD38 plus fort que les LB activés. Après 4 jours, les PB qui présentent un phénotype CD20-/CD38++ sont identifiables dans la culture. Enfin après 7 jours, l'expression du CD138 permet de distinguer les PB des PC. Il faut noter qu'après 7 jours, il reste toujours une fraction de LB activés résiduels non différenciés.

Toutes ces informations font de cette technique un modèle totalement adéquat pour l'identification et le positionnement des facteurs de survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.

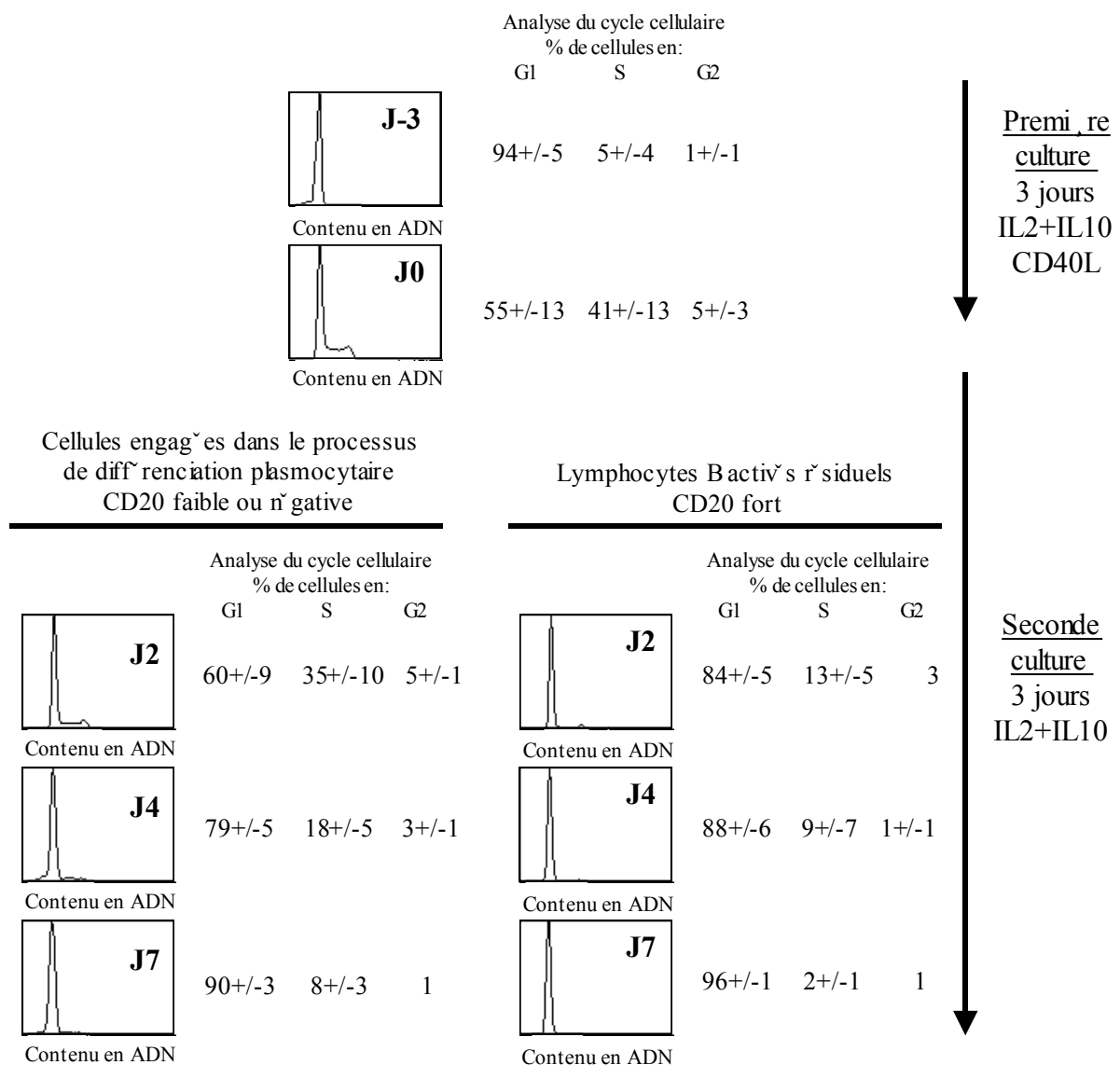
Les travaux de Arpin et coll avaient montré que parmi les LB des amygdales, les LB du CG pouvaient en utilisant ce même système se différencier en proportion importante en PC (Arpin et al, 1995), ce qui n'était en revanche pas le cas pour les LB naïfs (Arpin et al, 1997). Il est apparu judicieux d'augmenter le nombre de LB à stimuler en ajoutant aux LB à mémoire, les LB du CG. Pour purifier ces LB, j'ai utilisé le marqueur membranaire CD27. En effet, bien que spécifique des LB à mémoire du sang, ce marqueur est également exprimé à la surface des LB du CG dans les amygdales. Le mélange de ces 2 populations de LB ne change ni sur un plan temporel ni sur un plan phénotypique les étapes de différenciation des LB activés en PC (figure 5A).

Les travaux de Tangye et coll ont également attiré mon attention. Ces travaux mettaient en doute l'inhibition de la différenciation des lymphoblastes issus des LB à mémoire médiée par la persistance de la stimulation via le CD40. Contrairement aux études précédentes, les auteurs ne s'attachaient pas uniquement aux proportions respectives de cellules générées exprimant fortement le CD38 et de lymphoblastes non différenciés résiduels exprimant faiblement ce marqueur après 4 jours de la seconde culture, mais s'intéressaient également à la quantité de cellules générées. Ils mettaient ainsi en évidence que le nombre de cellules générées exprimant fortement le CD38 en présence de CD40L dans la deuxième culture était supérieur au nombre de ces mêmes cellules générées en son absence. L'effet visible sur les proportions respectives ne serait dû qu'à la mort dans la culture des cellules blastiques non différenciées en absence de CD40L (Tangye et al, 2003). Toutefois, en ce qui me concerne, la persistance de la stimulation via le CD40 ne m'a pas permis d'obtenir un nombre plus important de PB. Au contraire ce phénomène était délétère (figure 5B).



**Figure 5 : Génération de PC in vitro à partir de LB à mémoire et du CG stimulés via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10. (A)** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales (J-3) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence de fibroblastes murins exprimant le CD40L. À l'issue de 3 jours de culture, les LB ainsi activés (J0) sont récoltés puis ensemencés de nouveau en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence d'Ac anti-CD40L. L'expression des marqueurs membranaires CD20 et CD38 (J-3, J0 et J2) ou CD20, CD38 et CD138 (J4 et J7) est analysée en cytométrie en flux. J-3 : LB à mémoire CD20<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> et du CG CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, J0 : LB activés CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+/-</sup>, J2 : préPB CD20<sup>+/-</sup> CD38<sup>+</sup>, J4 : PB CD20<sup>-</sup> CD38<sup>++</sup> CD138<sup>-</sup>, J7 : PC CD20<sup>-</sup> CD38<sup>+++</sup> CD138<sup>++</sup>. **(B)** Les fibroblastes murins exprimant le CD40L sont présents dans la seconde culture. L'expression des marqueurs membranaires CD20 et CD38 (J-3, J0 et J4) est analysée en cytométrie en flux. Dans ces conditions, aucune cellule présentant un phénotype de PB CD20<sup>-</sup> CD38<sup>++</sup> n'est identifiable à J4.

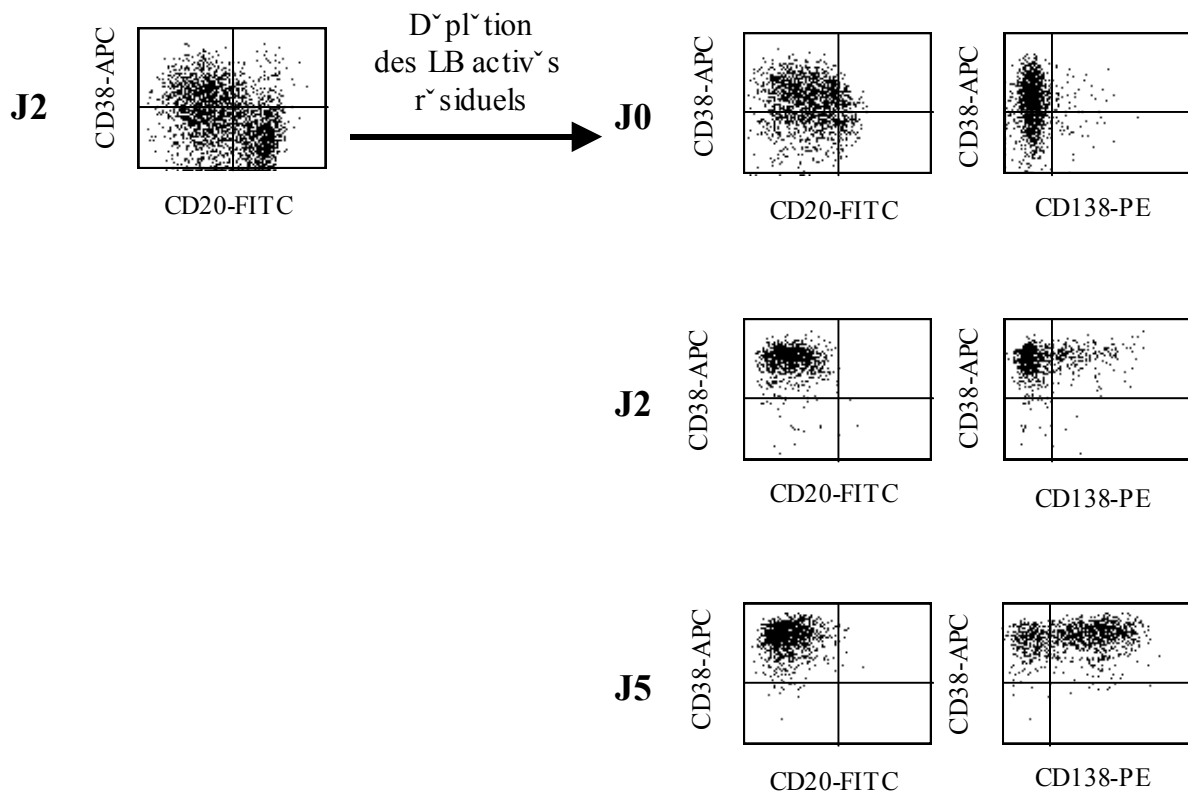
Comme nous l'avons évoqué, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance du contrôle du cycle cellulaire dans le processus de différenciation plasmocytaire. J'ai pour ma part analysé la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à différents temps au cours de la génération. Au cours de la deuxième culture, j'ai distingué pour cette analyse les cellules exprimant fortement le CD20 qui correspondent aux LB activés résiduels, des cellules exprimant peu ou pas le CD20 qui correspondent aux cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire (figure 6). Le rôle de la première culture comme étape d'activation est parfaitement illustré par l'apparition de cellules en cycle. Suite à l'arrêt de la stimulation via le CD40, la proportion de cellules dans les phases S et G2 du cycle cellulaire parmi les LB activés résiduels diminue rapidement, indiquant l'importance de cette stimulation dans le maintien de la prolifération de ces cellules. Les cellules engagées dans le processus de différenciation quant à elles se trouvent dans un premier temps en proportion importante dans les phases S et G2 du cycle cellulaire, puis au cours du temps elles s'accumulent progressivement en phase G1.



**Figure 6 : Cycle cellulaire au cours de la génération de PC in vitro à partir de LB à mémoire et du CG stimulés via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10.** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales (J-3) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence de fibroblastes murins exprimant le CD40L. À l'issue de 3 jours de culture, les LB ainsi activés (J0) sont récoltés puis ensemencés de nouveau en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence d'Ac anti-CD40L. Le contenu en ADN des cellules préalablement marquées à l'iodure de propidium (à J-3, J0, J2, J4 et J7) est analysé en cytométrie en flux. Au temps J2, J4 et J7, le marquage à l'iodure de propidium a été associé à un marquage avec un Ac anti-CD20. Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminé par analyse du cycle cellulaire en MODFIT.



Pour étudier l'influence de différents signaux sur la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, il est apparu important de s'affranchir des effets de ces signaux sur les LB activés résiduels. La déplétion des LB activés résiduels peut se faire dès le deuxième jour de la seconde culture tandis que les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire présentent un phénotype de cellules préplasmoblastiques. Le marqueur membranaire CD20 est utilisé pour cette déplétion. En effet, à ce stade les LB activés expriment fortement le CD20 tandis que les préPB l'expriment faiblement. Les préPB remis en culture se différencient en PB puis en PC. Sur un plan cinétique, après 2 jours de culture les cellules présentent toutes un phénotype de PB (CD20- CD38++) et après 5 jours les PC sont identifiables dans la culture car ils expriment le CD138 (figure 7).

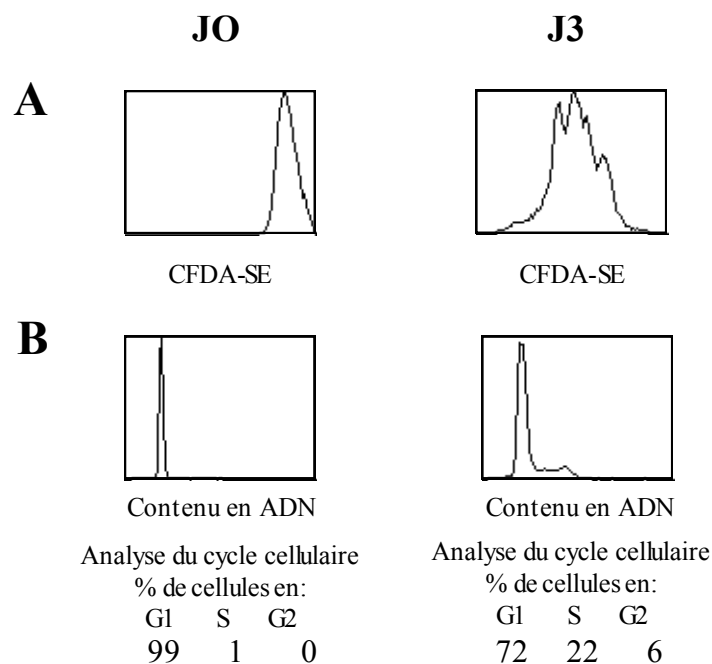


**Figure 7 : Isolement et différenciation des préplasmoblastes.** Après 2 jours de la deuxième culture (J2), les préPB sont isolés. Le marqueur CD20 est utilisé pour dépler les LB activés résiduels (tri immunomagnétique, système MACS, Myltenyi). Les préPB purifiés (J0) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10. L'expression des marqueurs membranaires CD20, CD38 et CD138 (J0, J2 et J5) est analysée en cytométrie en flux. J0 : préPB CD20+/- CD38+, J2 : PB CD20- CD38++ CD138-, J5 : PC CD20- CD38+++ CD138++.

## 2) Génération de plasmocytes en réponse aux CpG-ODN

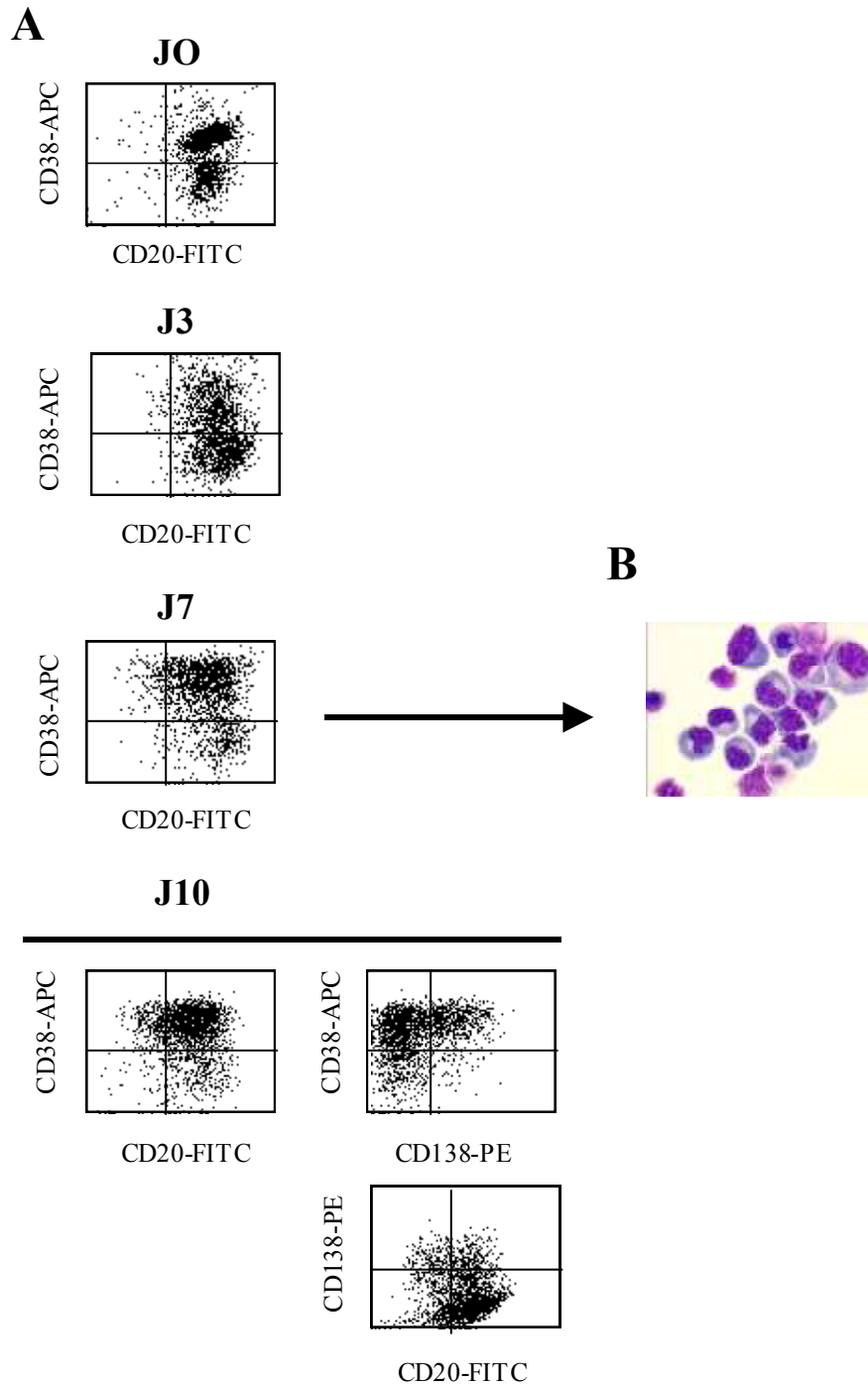
Les ADN bactériens stimulent l'activation et la différenciation des LB in vitro. Le signal d'activation polyclonal est délivré par leur interaction avec une molécule de la famille des TLR, TLR9 (Hemmi et al, 2000). Mon intérêt s'est porté sur la possibilité de générer des PC en stimulant des LB via TLR9. Cette technique apparaissait en effet plus facile à mettre en œuvre, il suffisait de cultiver les LB en présence de CpG-ODN, oligodéoxynucléotides de synthèse qui miment les ADN bactériens. Pour stimuler de manière optimale tous les LB à mémoire (à savoir d'isotype IgM ou commutés), l'addition d'IL-15 était nécessaire (Bernasconi et al, 2002).

Après trois jours de culture en présence de CpG-ODN (2µg/ml) et d'IL-15 (100ng/ml), les cellules présentes dans la culture ont déjà subi plusieurs divisions qui corrèlent avec l'apparition de cellules en cycle, 22% des cellules sont alors en phase S (figure 8).



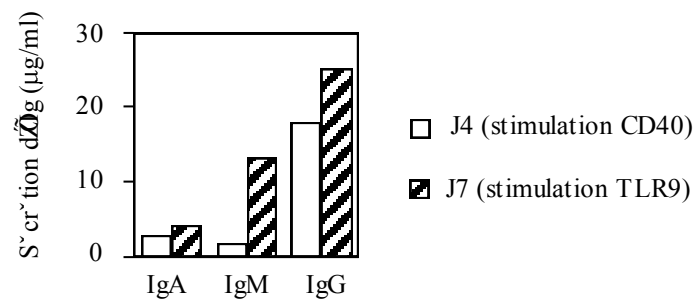
**Figure 8: Prolifération des LB à mémoire et du CG en réponse aux CpG-ODN. (A)** Les LB sont marqués au CFDA-SE puis ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-15 en présence de CpG-ODN. Les cellules sont fixées en 1% formaldéhyde juste après le marquage (J0) et après 3 jours de culture (J3). L'analyse est réalisée en cytométrie en flux. A chaque division cellulaire, l'intensité de fluorescence du CFDA-SE est divisée par 2. Les différentes intensités nous permettent de déterminer le nombre de division que les cellules ont subi. **(B)** Le contenu en ADN des cellules préalablement marquées à l'iodure de propidium (à J0 et J3) est analysé en cytométrie en flux.

À ce stade, les cellules présentent un phénotype de LB activés. Après 7 jours, une population qui exprime fortement le CD38 se distingue mais cette population garde un niveau d'expression du CD20 élevé. Une analyse histologique montre que ces cellules présentent les caractéristiques morphologiques de PC. Après 10 jours, au sein de cette population, une minorité seulement de cellules exprime le CD138 (figure 9).



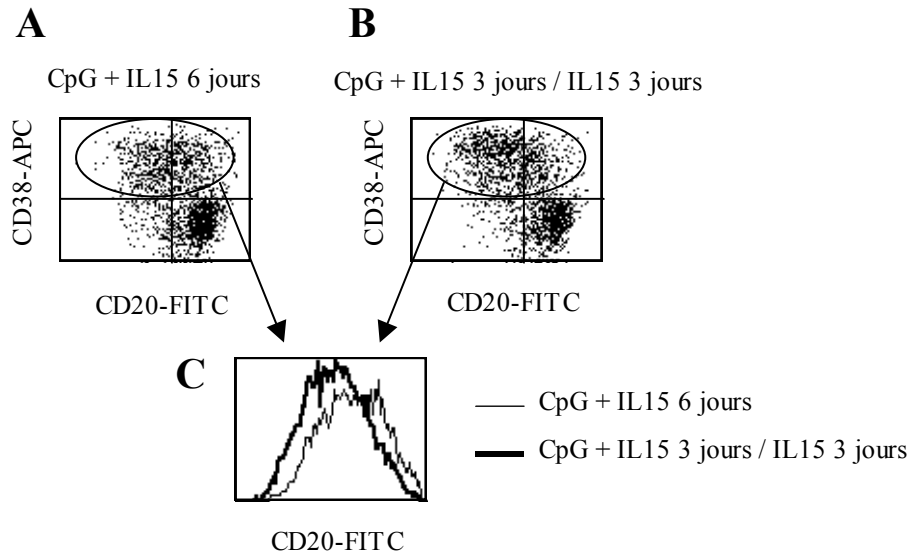
**Figure 9: Génération de PC in vitro à partir de LB à mémoire et du CG stimulés via le TLR9 en présence d'IL-15.** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales (J0) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-15 en présence de CpG-ODN. **(A)** L'expression des marqueurs membranaires CD20 et CD38 (J0, J3 et J7) ou CD20, CD38 et CD138 (J10) est analysée en cytométrie en flux. J0 : LB à mémoire CD20<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> et du CG CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>, J3 : LB activés CD20<sup>+</sup> CD38<sup>+/-</sup>, J7 et J10 : cellules présentant un phénotype de PC des amygdales CD20<sup>+</sup> CD38<sup>++</sup> CD138<sup>+/-</sup>. **(B)** La morphologie des cellules colorées au Giemsa est analysée en microscopie optique.

Le dosage des Ig dans le surnageant de culture par la technique ELISA montre que ces PC assurent leur fonction de sécrétion d'Ig avec toutefois une particularité par rapport aux PC générés suite à la stimulation des LB via le CD40 qu'est l'importance de l'isotype IgM. En effet, la quantité d'IgM accumulée est 7 fois plus importante après 7 jours de culture des LB à mémoire et du CG dans le modèle de stimulation via le TLR9 que dans le modèle de stimulation via le CD40 (figure 10).



**Figure 10: Impact de l'activation des LB via le TLR9 sur la sécrétion d'Ig.** La quantité d'IgA, M et G accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA après 7 jours de culture des LB à mémoire et du CG (J4 dans le modèle de stimulation des LB via le CD40, J7 dans le modèle de stimulation via le TLR9).

Pour comprendre si la présence de CpG-ODN dans la culture au moment de la différenciation des LB activés en PC était responsable de ce phénotype particulier, j'ai lavé les cellules après 3 jours de culture et les ai laissées se différencier uniquement en présence d'IL-15. Effectivement dans ces conditions les PC générés présentent un niveau d'expression du CD20 plus faible (figure 11).

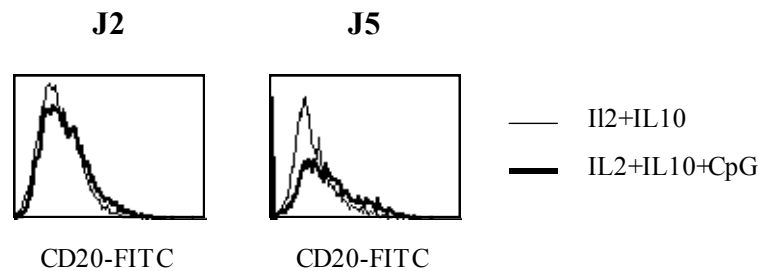


**Figure 11: Impact du retrait des CpG-ODN à l'issue des 3 premiers jours de culture. (A)** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales sont cultivés 6 jours en milieu complet supplémenté en IL-15 en présence de CpG-ODN. L'expression des marqueurs membranaires CD20 et CD38 est analysée en cytométrie en flux. **(B)** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales sont cultivés 3 jours en milieu complet supplémenté en IL-15 en présence de CpG-ODN puis 3 jours supplémentaires en milieu complet supplémenté en IL-15. L'expression des marqueurs membranaires CD20 et CD38 est analysée en cytométrie en flux. **(C)** Le niveau d'expression du CD20 sur les cellules qui expriment le CD38 est représenté sous forme d'histogramme.

Nous avons envisagé deux hypothèses pour expliquer l'expression du CD20 à la surface des PC en présence de CpG-ODN. 1) Les CpG-ODN induisent l'expression du CD20 à la surface des PC. Cette induction de l'expression du CD20 en réponse aux CpG-ODN a d'ailleurs été rapportée pour les lymphômes B (Warren et al, 2002 ; Jahrsdorfer et al, 2005). 2) Les CpG-ODN maintiennent en survie ou en prolifération une population de PC ayant pour particularité d'exprimer le CD20.

Pour répondre à la première question, j'ai cultivé des préPB purifiés, issus des LB activés via le CD40, en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de CpG-ODN. L'expression du CD20 à la surface des PB et PC générés dans ces conditions a été analysée en cytométrie en flux après 2 et 5 jours de culture. Les résultats indiquent que le niveau d'expression du CD20 n'est pas modifié lorsque l'on cultive les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire en présence de CpG-ODN (figure 12). Ces données tendent à infirmer l'hypothèse selon laquelle l'expression du CD20 serait induite à la

surface des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire via la stimulation du TLR9.



**Figure 12: Impact de la présence de CpG-ODN sur l'expression du CD20 à la surface des PB et PC différenciés à partir des LB activés via le CD40.** Les préPB ont été ensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de CpG-ODN. L'expression du marqueur membranaire CD20 est analysée en cytométrie en flux après 2 et 5 jours de culture.

Je n'ai pas réalisé d'expériences pour répondre à la deuxième question. Toutefois, il a été mis en évidence au laboratoire que les CpG-ODN favorisent la survie et la prolifération des cellules de MM.

### ***3) Les cellules de Myélome Multiple expriment des TLR dont les ligands favorisent leur survie et leur prolifération***

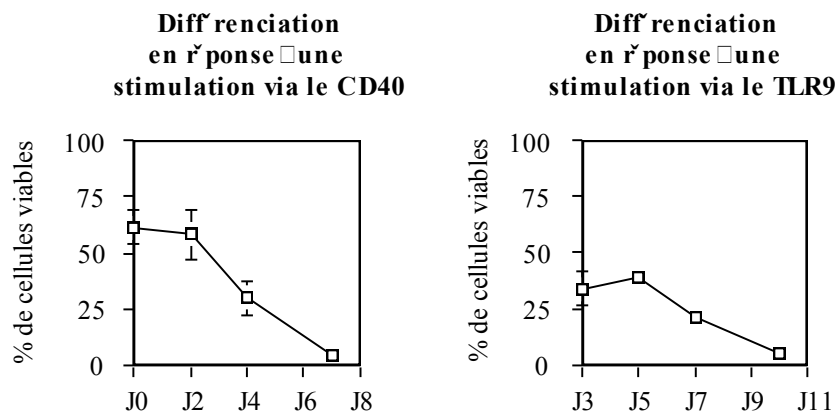
Ces données sont issues d'une étude qui regroupe l'analyse de l'expression des ARNm codant pour les TLR dans 16 lignées de MM et les effets de la stimulation de TLR fréquemment exprimés : TLR7 et TLR9 (Annexe 1). Ces travaux mettent en évidence que les lignées de MM expriment des TLR. L'expression de ces récepteurs est hétérogène au sein des lignées de MM. Toutefois, chaque lignée exprime au moins un type de TLR. Parmi les TLR, TLR7 et TLR9 sont exprimés fréquemment sur les lignées de MM (11/16, 68% des lignées pour TLR7 ; 10/16, 62% des lignées pour TLR9). Les fréquences d'expression de TLR7 et TLR9 sont également de cet ordre dans les cellules primaires de MM (9/12, 75% pour TLR7 et 7/12, 58% pour TLR9). L'utilisation de ligands synthétiques de TLR7, la loxoribine, et TLR9, les CpG-ODN a permis de mettre en évidence que la stimulation de ces récepteurs confère une protection aux cellules de MM contre l'apoptose induite par la dexaméthasone. En réponse aux CpG-ODN, il a également été observé une induction de la prolifération des cellules de MM. Le mécanisme sous-jacent à ces effets, pour une partie des lignées, s'est

avéré être la sécrétion autocrine d'IL-6. En effet, pour certaines lignées, ces effets étaient totalement abrogés si les cellules de MM étaient cultivées en présence d'Ac bloquants anti-IL6 et anti-IL6R. De plus, le dosage de l'IL-6 dans les surnageants de culture par ELISA indique que ces lignées produisent de l'IL-6 en présence des ligands de TLR7 et TLR9.

Le caractère particulier de ces PC, de par leur phénotype et la quantité importante d'IgM sécrétée, soulève des interrogations. De plus, l'expression du CD20 sur les PB et PC rendait impossible dans ce modèle la déplétion des LB activés en utilisant ce marqueur. Par conséquent, pour mes travaux sur la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, j'ai choisi d'utiliser la technique de génération de PC qui correspond à la stimulation des LB via le CD40.

## B) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire in vitro

Un point commun à la génération de PC suivant les 2 modèles décrits précédemment est l'apoptose massive qui accompagne le processus de différenciation plasmocytaire (figure 13).



**Figure 13: Viabilité des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire in vitro.** Le pourcentage de cellules viables a été évalué à différents temps de la culture dans les 2 modèles de génération de PC in vitro précédemment décrits. A gauche, modèle de génération de PC en stimulant les LB via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10, à droite, modèle de génération de PC en stimulant les LB via le TLR9 en présence d'IL-15.

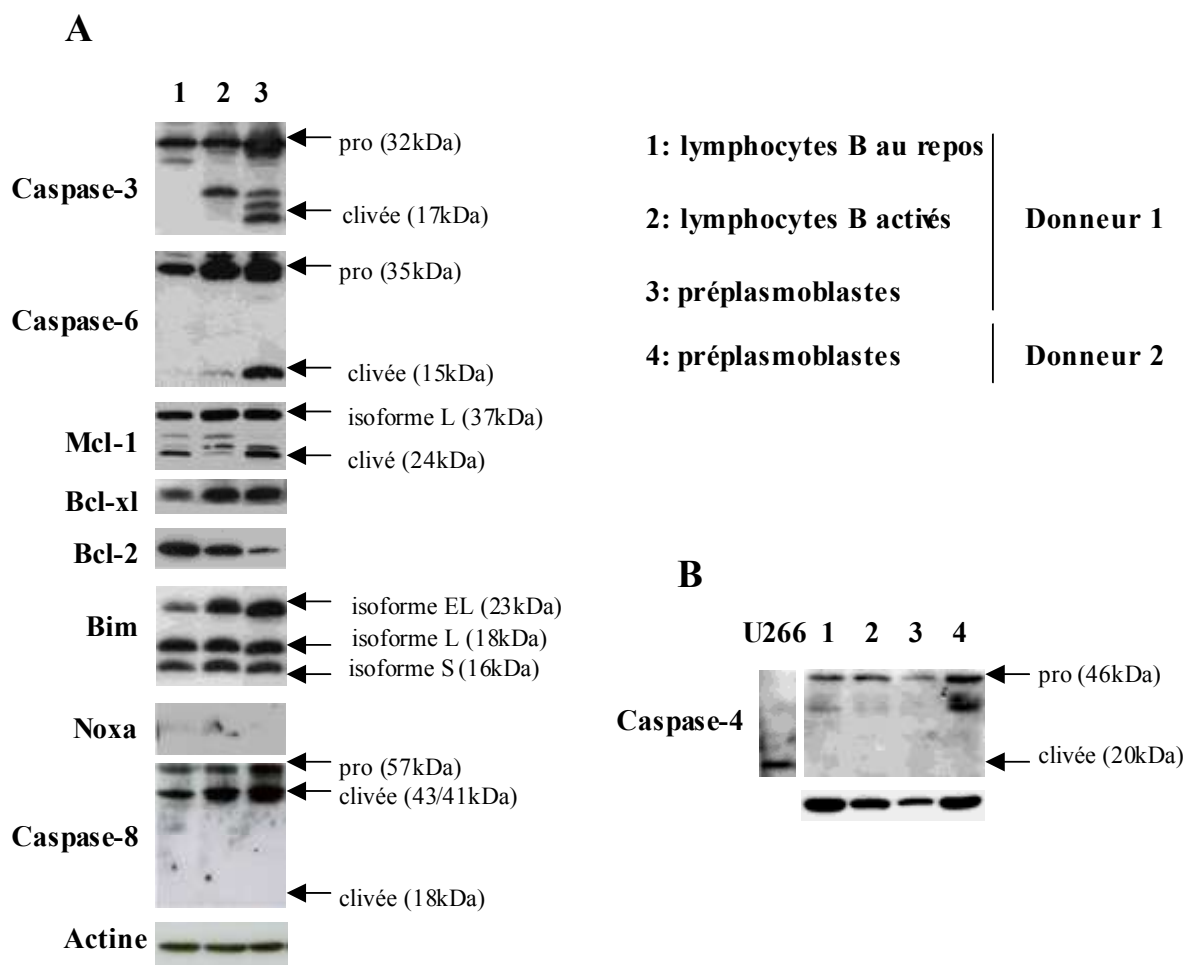


## ***1) Mécanismes moléculaires associés à l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.***

J'ai analysé par Western blot l'expression de différentes protéines impliquées dans l'apoptose dans les LB au repos, les LB activés via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10 et les préPB issus de ces LB activés. Le panel de protéines étudiées inclus :

- Les caspases initiatrices -8 et -4 qui présentaient chacune un rôle potentiel dans l'initiation de l'apoptose spontanée des PC. La caspase-4 qui initie la voie d'apoptose déclenchée par un stress du réticulum endoplasmique (Pelletier et al, 2006). La caspase-8 qui initie la voie d'apoptose « extrinsèque » (Ursini et al, 2002).
- Les caspases effectrices (caspases-3 et -6) qui sont activées dans tous les processus apoptotiques dépendants des caspases.
- Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1.
- Les protéines pro-apoptotiques Bim et Noxa.

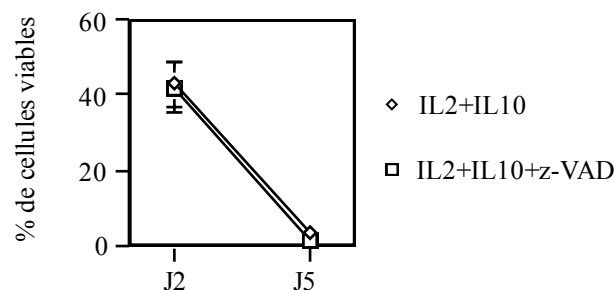
Les résultats montrent que les préPB sont des cellules engagées dans un processus apoptotique avec une activation des caspases effectrices (caspase-3 et -6) associée au clivage de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et une augmentation de l'isoforme EL de Bim (figure 14). En revanche, les fragments clivés de la caspase-8 et de la caspase-4 ne sont pas détectés. En outre, l'apoptose n'est pas associée à l'induction de la protéine pro-apoptotique Noxa.



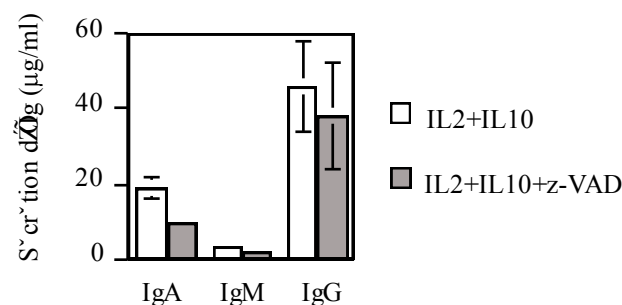
**Figure 14: Etude des molécules de l'apoptose en fonction du stade de différenciation.** (A) L'expression des protéines suivantes : caspase-3, caspase-6, Mcl-1, Bcl-x1, Bcl-2, Bim, Noxa, Caspase-8 dans différentes populations purifiées au cours de la génération in vitro (lymphocytes B au repos, lymphocytes B activés et préplasmoblastes) a été analysée en Western blot. La détection des protéines a été réalisée en utilisant les Ac spécifiques suivants : anti-caspase-3 clone E-8 (Santa Cruz Biotechnology), anti-caspase-6 (Cell Signaling), anti-Mcl-1 clone S19 (Santa Cruz Biotechnology), anti-Bcl-x1 (Chemicon international), anti-Bcl-2 clone 124 (Dako), anti-Bim (Chemicon international), anti-Noxa (Alexis), anti-caspase-8 clone 1C12 (Cell Signaling). (B) L'expression de la caspase-4 dans les différentes populations purifiées au cours de la génération in vitro (lymphocytes B au repos, lymphocytes B activés et préplasmoblastes) a été analysée en Western blot. L'analyse de l'expression de la caspase-4 dans la lignée de myelome U266 a servi de contrôle pour la détection du fragment clivé. L'Ac spécifique utilisé pour la détection de la caspase-4 est l'anti-caspase-4 p20 clone N-15 (Santa Cruz Biotechnology).

J'ai tenté de déterminer dans quelle mesure l'activation des caspases contribuait à la mort des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Autrement dit, j'ai voulu savoir si l'inhibition de leur activité pouvait prévenir la mort des cellules. J'ai cultivé les préPB purifiés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de l'inhibiteur pan-caspases z-VAD-fmk (50 $\mu$ M). Le pourcentage de cellules vivantes a été estimé après 2 et 5 jours de culture. J'ai également dosé en ELISA, la quantité d'IgA, G et M accumulée dans le surnageant après 5 jours. De manière inattendue, le pourcentage de cellules vivantes était identique avec ou sans z-VAD-fmk (figure 15A). En ce qui concerne la quantité d'Ig accumulée, elle apparaissait même diminuée quel que soit l'isotype. Plus précisément, la quantité d'IgG accumulée était diminuée d'un facteur 1,2 $\pm$ 0,2, la quantité d'IgA d'un facteur 1,9 $\pm$ 0,3, la quantité d'IgM d'un facteur 1,4 $\pm$ 0,1 (figure 15B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des caspases par le z-VAD-fmk n'est pas suffisante pour empêcher l'apoptose spontanée des préPB et de leurs descendants.

**A**



**B**



**Figure 15: Effet du z-VAD sur les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.** Les préPB ont été ensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de z-VAD-fmk. **(A)** Le pourcentage de cellules viables a été évalué après 2 et 5 jours de culture. **(B)** Après 5 jours de culture, la quantité d'IgA, M et G accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA.

## ***2) Expression et activité des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas***

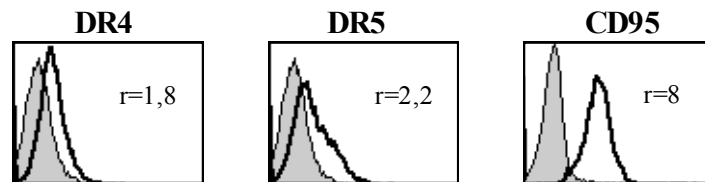
Des travaux ont été menés dans l'équipe en partenariat avec le laboratoire Human Genome Sciences Inc (Rockville, USA) sur l'apoptose induite dans les cellules de MM par des Ac agonistes humains des récepteurs de mort DR4 et DR5 (ETR1 et ETR2) (Annexe 2). Nous avons montré que parmi 22 lignées de MM, une majorité (15/22) était induite en apoptose par ETR1, une minorité (10/22) était induite en apoptose par ETR2 et seulement 4 présentaient une résistance aux deux Ac. De plus, en ce qui concerne ETR2 seules deux lignées présentaient un pourcentage de cellules induites en apoptose supérieur à 20% après 48 heures de culture en présence de l'Ac. L'analyse de l'expression des récepteurs DR4 et DR5 en cytométrie en flux a montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la sensibilité des lignées et le niveau d'expression des récepteurs. Nous n'avons pas tenté d'élucider le mécanisme de résistance mais nous avons identifié les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apoptose induite par ETR1 et ETR2. L'activation des caspase-8 initiatrice de la voie d'apoptose « extrinsèque », -9 initiatrice de la voie « intrinsèque », et -3, caspase effectrice commune aux deux voies a été analysée en Western blot. Les résultats indiquent que ces trois caspases sont impliquées dans l'apoptose induite par ETR1 et ETR2. Ainsi, nous avons montré que les voies « extrinsèque » et « intrinsèque » d'apoptose sont déclenchées par l'activation des récepteurs DR4 et DR5 dans les cellules de MM. Nous avons plus précisément démontré que la caspase-8 est impliquée dans l'initiation du programme apoptotique médié par les récepteurs de mort DR4 et DR5. En effet, l'analyse de la cinétique d'activation de ces caspases montre que la caspase-8 est activée en amont des deux autres caspases. De plus, l'apoptose induite par les Ac était totalement abrogée si les cellules de MM étaient cultivées en présence d'un inhibiteur de la caspase-8 (z-IETD). Outre le rôle des caspases, nous avons montré que dans tous les cas l'apoptose était associée au clivage précoce de la protéine antiapoptotique Mcl-1.

Nous disposons également de données sur l'apoptose induite dans les cellules de MM par CH11 un Ac agoniste du récepteur de mort CD95/Fas. Les résultats, non publiés, montrent que la majorité des lignées sont sensibles à Fas (15 lignées sur 27). Les lignées ont été cultivées en milieu complet en présence de CH11 (1µg/ml). Le pourcentage de cellules vivantes a été estimé après 48 heures de culture. Nous avons considéré qu'une lignée était

sensible lorsque plus de 20% des cellules étaient induites en apoptose en présence de l'Ac CH11 par rapport au contrôle.

Dans ce contexte, au-delà de l'apoptose spontanée des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, il m'a semblé intéressant de déterminer la sensibilité de ces cellules aux signaux de mort induits par l'activation des récepteurs de mort DR4, DR5 et CD95. J'ai analysé l'expression à la surface des préPB de ces récepteurs en cytométrie en flux et étudié en parallèle l'effet des Ac ETR1, ETR2 et CH11 sur la survie des préPB et de leurs descendants. J'ai cultivé les préPB purifiés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence des Ac ETR1 (6µg/ml), ETR2 (6µg/ml) et CH11 (2µg/ml). Le pourcentage de cellules vivantes a été estimé après 2 et 5 jours de culture. J'ai également dosé en ELISA, la quantité d'IgA, G et M accumulée dans le surnageant après 5 jours.

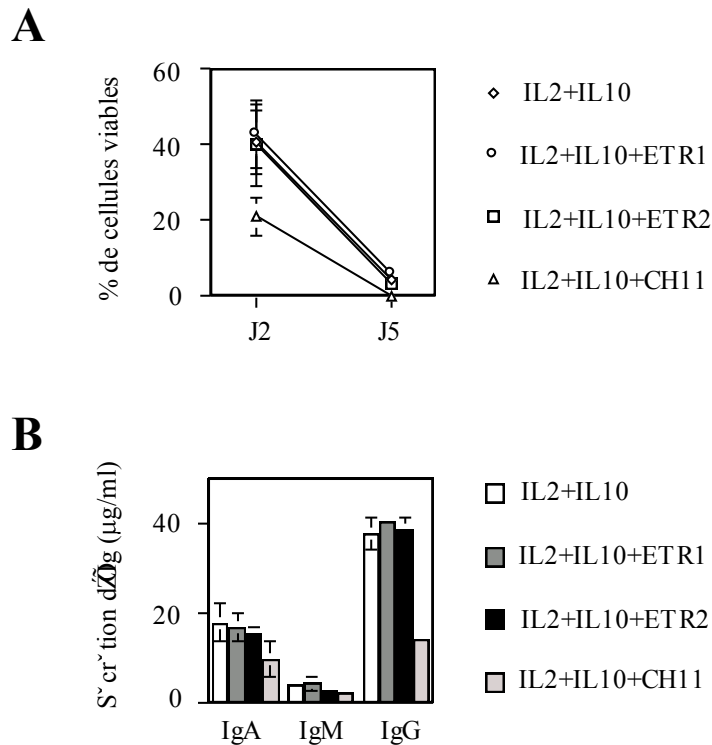
Les préPB expriment les trois récepteurs. Toutefois, le niveau d'expression de DR4 ou DR5 est plus faible que celui du CD95 (figure 16).



**Figure 16: Expression des récepteurs de mort DR4, DR5 et CD95 sur les préplasmoblastes.** L'expression des molécules membranaires DR4, DR5 et CD95 a été analysée en cytométrie en flux.

L'activation du CD95 par l'Ac agoniste CH11 induit l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire (J2 : 40%+/-8 de cellules vivantes en contrôle contre 21%+/-5 en présence de CH11 ; J5 : 4%+/-1 contre 0%). En revanche, l'activation de DR4 par ETR1 ou de DR5 par ETR2 n'a pas d'effet (figure 17A). L'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire en présence de CH11 est corrélée avec une diminution, par rapport au contrôle, de la quantité d'Ig sécrétée quel que

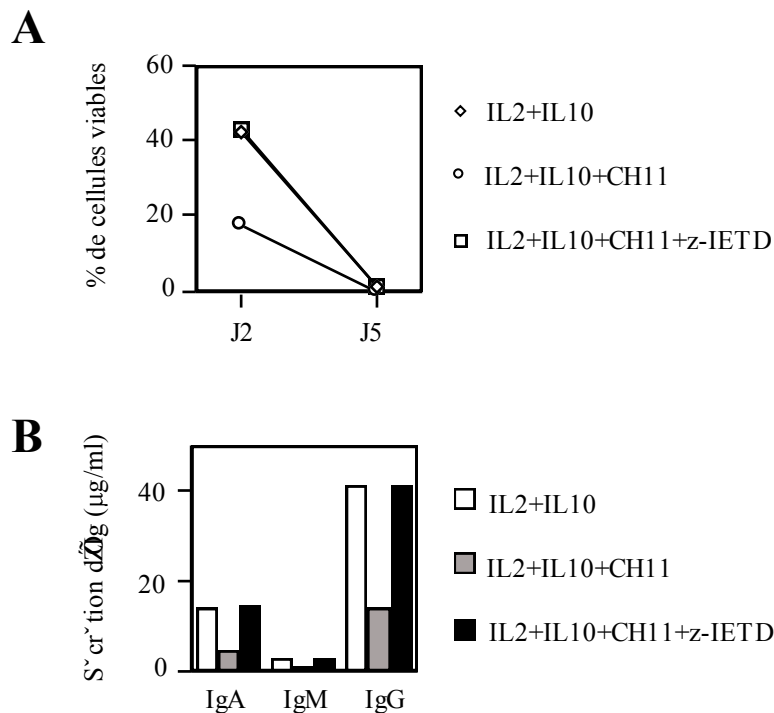
soit l'isotype. Plus précisément, la quantité d'IgG accumulée est diminuée d'un facteur 2,6 $\pm$ 0,3, la quantité d'IgA d'un facteur 1,8 $\pm$ 0,4 et la quantité d'IgM d'un facteur 1,7 $\pm$ 0,3 (figure 17B).



**Figure 17: Effet des Ac ETR1, ETR2 et CH11 sur les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.** Les préPB ont été ensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de ETR1, ETR2 et CH11. **(A)** Le pourcentage de cellules viables a été évalué après 2 et 5 jours de culture. **(B)** Après 5 jours de culture, la quantité d'IgA, M et G accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA.

En conclusion, bien que les préPB expriment les trois récepteurs, les cellules sont uniquement sensibles aux signaux de mort induits par l'activation du CD95.

La caspase-8 est impliquée dans l'initiation du programme apoptotique médié par le récepteur de mort CD95. En effet, l'inhibiteur de la caspase-8 (z-IETD) abroge totalement la mort induite par CH11 (figure 18).



**Figure 18: L'inhibiteur de la caspase-8 z-IETD prévient l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire induite par CH11.** Les préPB ont été ensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence ou non de CH11 et z-IETD. **(A)** Le pourcentage de cellules viables a été évalué après 2 et 5 jours de culture. **(B)** Après 5 jours de culture, la quantité d'IgA, M et G accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA.

### ***3) Rôle des cellules dérivées des monocytes dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.***

Comme nous l'avons vu, la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation, et ensuite celle des PC matures, est sous la dépendance de signaux fournis par des interactions avec d'autres types cellulaires, dans des sites particuliers dans lesquels elles se sont localisées. L'étude de la physiologie des cellules de myélome présentait les OC comme des candidats potentiels pour prodiguer aux préPB et à leurs descendants des interactions favorables à leur survie. En effet, des travaux récents pointent leur rôle essentiel de support des plasmocytes tumoraux que sont les cellules de MM. Ces études ont mis en

évidence que les OC permettent de maintenir in vitro une culture à long terme de ces cellules. La survie des cellules de MM dans ces cultures est dépendante d'interactions cellulaires avec les OC (Abe et al, 2004 ; Yaccoby et al, 2004). Deux observations supplémentaires rendaient l'idée particulièrement intéressante. 1) Les OC font partie de l'environnement médullaire, ils assurent avec les ostéoblastes le remodelage osseux. Ils sont également présents au niveau de la synovie des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Toyozaki-Maeda et al, 2001). 2) les OC sécrètent de forte quantité de BAFF et d'APRIL (Moreaux et al, 2005).

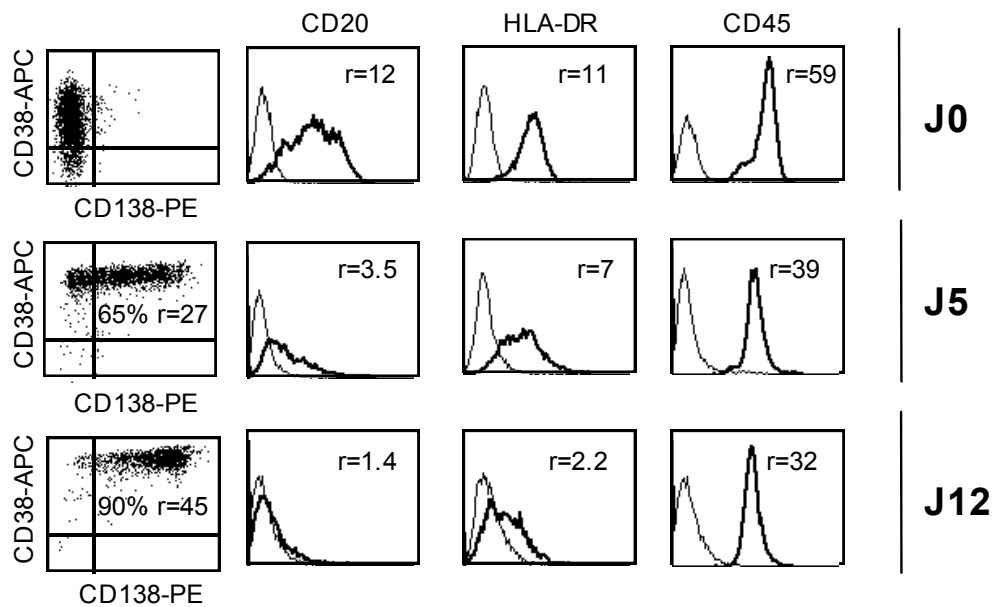
Les OC peuvent être dérivés in vitro à partir des monocytes du sang. Il en est de même pour les CD et les macrophages. Nous avons donc cherché à évaluer la capacité de ces trois types cellulaires, dérivés in vitro à partir des monocytes du sang, à supporter la survie des préPB et de leurs descendants in vitro.

Nous avons montré (Article 1) que chacun de ces types cellulaires présentait une capacité à prévenir l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Cependant, seules les cocultures avec les OC nous ont toujours permis d'obtenir des PC vivants après 12 jours de culture. En effet, en ce qui concerne l'effet des macrophages, bien qu'ils aient montré un effet bénéfique sur la survie des cellules semblable à celui des OC dans la moitié des expériences, ils ont également montré un effet inhibiteur dans l'autre moitié. Les CD quant à elles présentaient une capacité à prévenir l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire sur une courte durée. En ce sens, les cocultures avec les CD ne nous ont pas permis d'obtenir des PC vivants après 12 jours de culture. Cette capacité à maintenir la survie des cellules, limitée dans le temps, nous a conduit à penser que leur fenêtre d'action devait être restreinte au stade PB. L'ensemble de ces données suggèrent que les OC fournissent aux PC et à leurs précurseurs des signaux de survie de manière plus efficace que les macrophages tandis que les CD semblent fournir de tels signaux uniquement aux PB. En outre, il faut noter que l'étude de la cinétique de génération de PC dans ces cocultures indique que ces trois types cellulaires ne modifient, ni sur un plan temporel, ni sur un plan phénotypique, les étapes de différenciation des préPB en PC. Ainsi, leur effet sur la quantité finale de PC générés est uniquement lié à leur capacité à prévenir l'apoptose des PB, des PC ou des deux.

Après 12 jours de culture au contact des OC, les cellules persistantes exprimaient toutes le CD138. Nous avons montré qu'en accord avec l'expression du CD138, les cellules



persistantes exprimaient également fortement le CD38, n'exprimaient pas ou peu le CD20 et le HLA-DR et présentaient un niveau d'expression réduit du CD45 par rapport aux préPB (figure 19). Ce phénotype est similaire à celui des PC médullaires, mais pas à celui des PC des amygdales ni à celui des PC du sang. Ces données montrent que les OC ont permis aux cellules engagées dans le processus de différenciation de survivre et par conséquent de se différencier en PC qui ressemble au prototype du PC mature qu'est le PC médullaire.



**Figure 19 : Différenciation des préplasmoblastes au contact des ostéoclastes.** Après 2 jours de la deuxième culture (J2), les préPB sont isolés. Le marqueur CD20 est utilisé pour dépler les LB activés résiduels (tri immunomagnétique, système MACS, Myltenyi). Les préPB purifiés (J0) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-6 en présence d'OC. L'expression des marqueurs membranaires CD20, CD38, CD138, HLA-DR et CD45 (J0, J2 et J5) est analysée en cytométrie en flux.

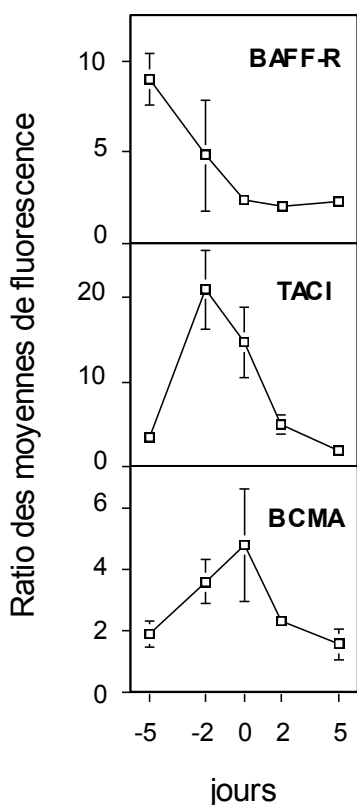
#### ***4) Mécanismes impliqués dans la survie médiée par les ostéoclastes des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.***

##### **a) BAFF/APRIL**

Comme nous l'avons évoqué, les OC sécrètent de forte quantité de BAFF et d'APRIL (Moreaux et al, 2005). Ces facteurs sont les ligands de BCMA dont l'expression est nécessaire à la survie des PC médullaires murins (O'connor et al, 2004). De plus, APRIL interagit avec le CD138 (Ingold et al, 2005). Enfin, une étude récente a mis en évidence que les CD augmentent la clonogénicité des cellules de MM par le biais d'interactions de ces deux facteurs avec leurs récepteurs (Kukreja et al, 2006). Nous nous sommes donc intéressés aux rôles de BAFF et APRIL dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire médiée par les OC.

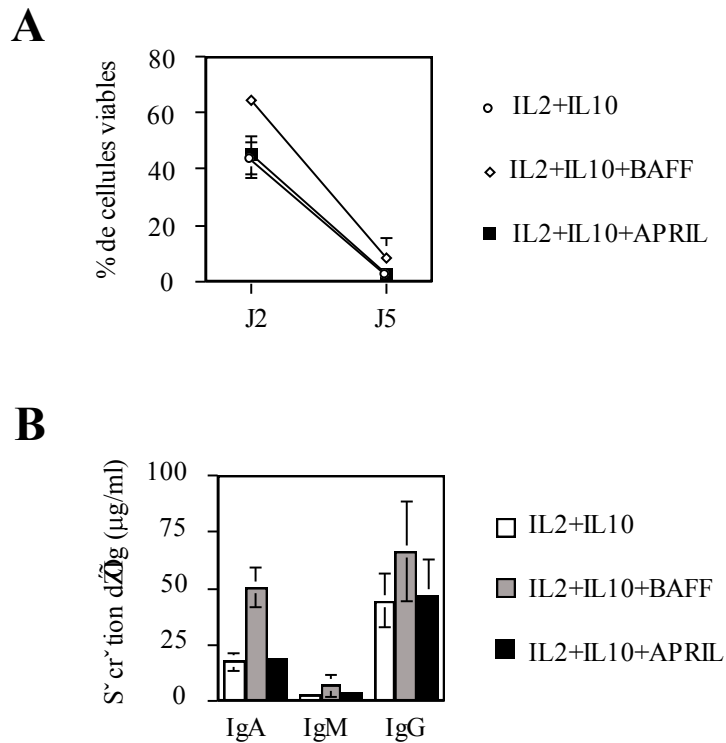
Cette étude a fait suite aux travaux sur le rôle de BAFF et APRIL dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire que j'avais réalisé dans un premier temps. Ces travaux regroupaient l'étude de l'expression des récepteurs de BAFF et APRIL au cours de la génération de PC in vitro et les effets de ces deux facteurs sur la survie des préPB et de leurs descendants.

J'ai montré que les LB à mémoire au repos expriment fortement BAFF-R tandis qu'ils expriment peu TACI et BCMA. L'activation des LB via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10 induit l'expression de TACI et BCMA tandis que l'expression de BAFF-R est diminuée. Un pic d'expression de TACI et BCMA est observé sur les LB activés et les préPB respectivement, le niveau d'expression baisse ensuite sur les PB et les PC générés (figure 20).



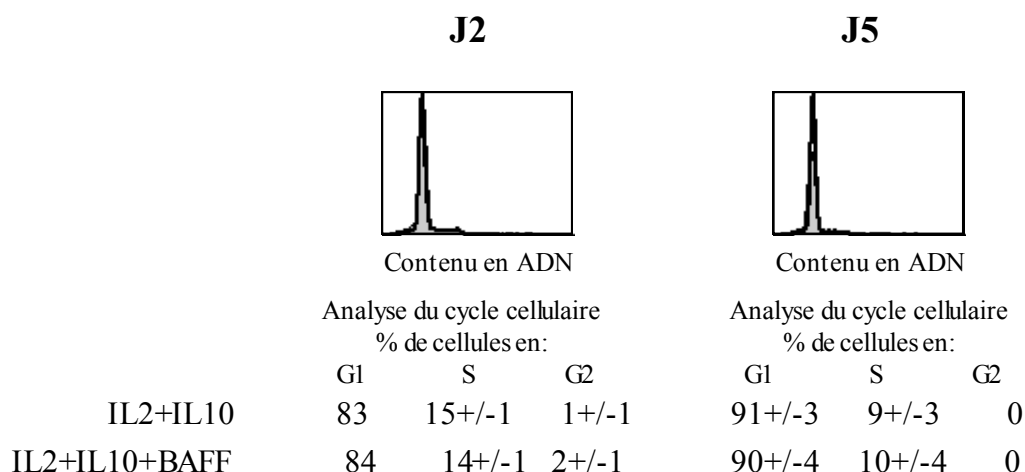
**Figure 20 : Cinétique d'expression des récepteurs aux facteurs de croissance BAFF et APRIL au cours de la différenciation plasmocytaire in vitro.** Les LB à mémoire et du CG purifiés à partir des cellules extraites des amygdales (J-5) sont ensemencés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence de fibroblastes murins exprimant le CD40L. À l'issue de 3 jours de culture, les LB ainsi activés (J-2) sont récoltés puis ensemencés de nouveau en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 en présence d'Ac anti-CD40L. L'expression des récepteurs BAFF-R, TACI et BCMA à la surface des LB à mémoire (J-5), des LB activés (J-2), des préPB (J0), des PB (J2) et des PC (J5) est analysée en cytométrie en flux. Le niveau d'expression est défini par le ratio des moyennes de fluorescence (fluorescence spécifique/fluorescence contrôle).

Pour étudier l'effet de BAFF et APRIL sur la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, j'ai cultivé des préPB purifiés en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 associé ou non à BAFF ou à APRIL (200ng/ml). Le pourcentage de cellules vivantes a été estimé après 2 et 5 jours de culture. J'ai également dosé en ELISA, la quantité d'IgA, G et M accumulée dans le surnageant après 5 jours. En accord avec l'expression de TACI et de BCMA ainsi qu'avec les travaux d'Avery et coll (Avery et al, 2003), après 2 et 5 jours de culture le pourcentage de cellules vivantes est plus important en présence de BAFF (J2 : 43%+/-6 de cellules vivantes dans le contrôle contre 64%+/-2 en présence de BAFF ; J5 : 2%+/-2 contre 6%+/-2). En revanche, je n'ai pas observé d'augmentation du pourcentage de cellules vivantes en présence d'APRIL (figure 21A). Le pourcentage de cellules vivantes plus important en présence de BAFF est corrélé à une augmentation de la production d'Ig. Toutefois, il faut noter que comme dans l'étude d'Avery et coll, l'augmentation n'est pas identique selon l'isotype avec une prédominance de l'effet sur les IgA. La quantité d'IgA accumulée est augmentée d'un facteur 3+/-1 en présence de BAFF tandis que la quantité d'IgM accumulée est augmentée d'un facteur 2,2+/-0,3 et la quantité d'IgG d'un facteur 1,5+/-0,3 (figure 21B).



**Figure 21: Effet pro-survie de BAFF sur les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.** Les préPB ont été ensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-2 et IL-10 associé ou non à BAFF ou à APRIL. **(A)** Le pourcentage de cellules viables a été évalué après 2 et 5 jours de culture. **(B)** Après 5 jours de culture, la quantité d'IgA, M et G accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA.

Avery et coll avaient montré que le signal délivré par BAFF conduisait à la survie mais pas à la prolifération des cellules. Cette conclusion était basée sur deux observations. 1) les cellules qui exprimaient fortement le CD38 ne subissaient pas plus de division en présence de BAFF. 2) le pourcentage de cellules qui exprimaient fortement le CD38 au sein desquelles la caspase 3 était clivée diminuait en présence de BAFF (Avery et al, 2003). J'ai pour ma part analysé la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en absence et en présence de BAFF. Aucune différence n'a été observée (10%+/-4 des cellules en phase S dans le contrôle contre 9%+/- 3 en présence de BAFF) (figure 22). Ainsi, par une autre technique, je soutiens l'hypothèse selon laquelle BAFF permet la survie de cellules engagées dans le processus de différenciation PC mais n'a pas d'effet sur leur prolifération.



**Figure 22: Proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en présence ou en absence de BAFF.** Le contenu en ADN des cellules préalablement marquées à l'iodure de propidium (à J2 et J5) est analysé en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminé par analyse du cycle cellulaire en MODFIT.

L'ensemble de ces données montre que BAFF fournit un signal de survie aux cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire qui se traduit par une augmentation des Ig sécrétées et en particulier des IgA.

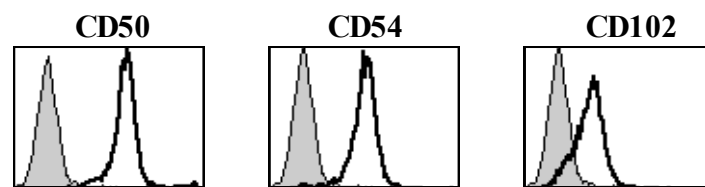
Pour étudier l'impact de BAFF et APRIL dans les signaux de survie fournis par les OC, j'ai utilisé la molécule chimérique BCMA-Fc afin de neutraliser ces deux facteurs dans les cocultures. J'ai montré que l'addition de BCMA-Fc n'avait pas d'effet significatif sur la survie médiée par les OC des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Ces données suggèrent que BAFF et APRIL ne font pas partie des signaux de survie fournis par les OC.

### **b) Contact cellulaire**

Nous avons mis en évidence que les facteurs solubles produits par les OC n'étaient pas responsables de la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation. Cette conclusion s'appuie sur deux observations. 1) l'effet des OC sur la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire était totalement abrogé si les préPB étaient séparés des OC par un transwell. 2) le surnageant de culture des OC n'était pas

en mesure de reproduire leur effet. Nous avons également démontré que l'interaction entre OC et cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire n'induit pas la sécrétion de facteurs de survie des préPB et de leurs descendants. En effet, le surnageant de coculture d'OC et de préPB n'était pas non plus en mesure de mimer l'effet des OC. L'ensemble de ces données indique qu'un contact cellulaire direct avec les OC est nécessaire à la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.

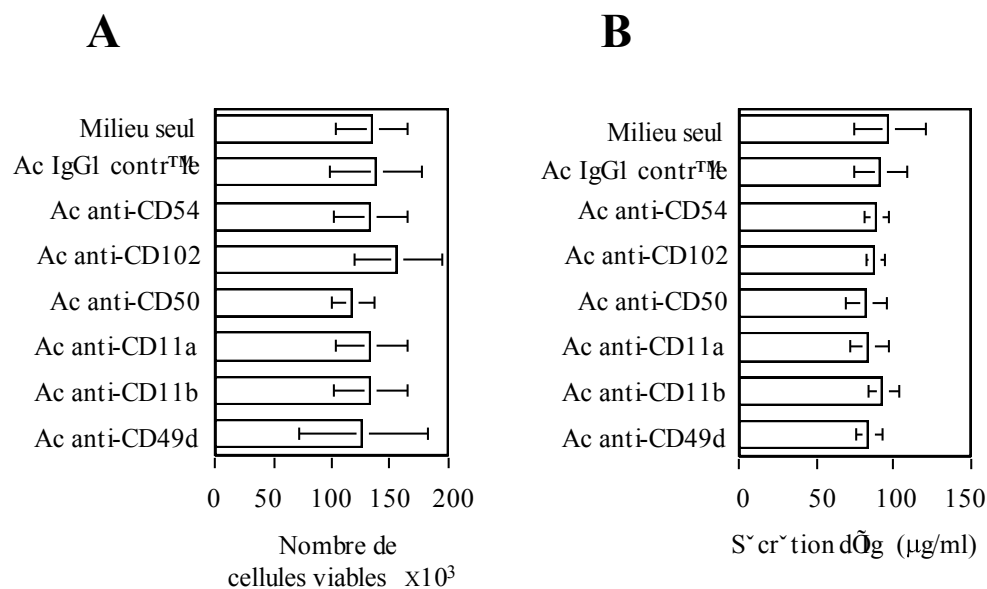
J'ai cherché à identifier les molécules impliquées dans ces interactions. J'ai utilisé un panel d'Ac bloquants afin de neutraliser des candidats potentiels. Des travaux avaient pointé l'importance de l'interaction CD49d/fibronectine dans la survie des PC médiée par les cellules stromales (Roldan et al, 1992), j'ai donc inclus dans mon panel un Ac bloquant anti-CD49d. J'ai également souhaité neutraliser les interactions impliquant les molécules d'adhésion de type ICAM exprimées par les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire (figure 23) et leurs ligands CD11a et CD11b dont l'expression a été rapportée sur les OC (Rivollier et al, 2004). Ainsi, j'ai utilisé des Ac bloquants anti-CD50 (ICAM-3), anti-CD54 (ICAM-1), anti-CD102 (ICAM-2), anti-CD11a et anti-CD11b.



**Figure 23: Expression des molécules d'adhésion de type ICAM sur les préplasmoblastes.** L'expression des molécules membranaires CD50, CD54 et CD102 a été analysée en cytométrie en flux.

Les cocultures ont été réalisées en présence des différents Ac bloquants (10µg/ml). Le nombre de cellules vivantes engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire a été estimé après 5 jours de culture. J'ai également dosé en ELISA, la quantité d'IgG accumulée dans le surnageant après 5 jours. Les résultats montrent que l'addition de ces Ac bloquants n'inhibe pas l'effet pro-survie induit par les OC (figure 24). En conclusion, les interactions

moléculaires impliquant CD49d, CD50, CD54, CD102, CD11a et CD11b ne semblent pas faire partie des signaux de survie fournis par les OC.



**Figure 24: Impact du blocage de différentes molécules membranaires impliquées dans des interactions cellulaires.** Les préPB ont étéensemencés à la densité de  $4 \times 10^5$  cellules/ml en plaque 24 puits en milieu complet supplémenté en IL-6 en présence d'OC. **(A)** Le nombre de cellules viables a été évalué après 5 jours de culture. **(B)** Après 5 jours de culture, la quantité d'IgG accumulée est dosée dans les surnageants en ELISA.

# **ARTICLE 1**



## Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro

<sup>1,2</sup> Alexandrine Geffroy-Luseau, <sup>1,2</sup> Gaëtan Jégo, <sup>1,2,3</sup> Régis Bataille, <sup>3</sup> Loïc Campion, <sup>1,2</sup> Catherine Pellat-Deceunynck

<sup>1</sup>INSERM, U601, Nantes, France; <sup>2</sup>Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Nantes, France; <sup>3</sup>Centre de Lutte Contre Le Cancer Nantes Atlantique, Saint-Herblain, France

Running title: Osteoclasts support plasma cell survival

Key words: plasma cells, survival, osteoclasts, dendritic, macrophages

Supported by the Ligue Nationale Contre Le Cancer (équipe labélisée 2005)

CPD is supported by the CNRS

Corresponding author:

Catherine Pellat-Deceunynck, PhD.

INSERM, U601, Department of Cancer Research, Biology Institute,  
9 Quai Moncoussu, Nantes, F-44000 France

Ph: +33 2 40 08 47 68, Fax: +33 2 40 08 47 78

e-mail: cpellat@nantes.inserm.fr

### Abbreviations

PB plasmablast, prePB pre-plasmablast, OC osteoclast, DC dendritic cell, MO macrophage, MFIR mean fluorescence intensity ratio

### Acknowledgments

AGL performed research, analyzed and interpreted data and drafted the manuscript, GJ performed research, RB designed research, LC performed statistical analysis, and CPD designed research, analyzed and interpreted data and drafted the manuscript

## Abstract

The aim of this in vitro study was to evaluate if osteoclasts, macrophages and dendritic cells, all of monocyte origin, can support the survival of normal human plasma cells. Plasma cells differentiate from plasmablasts arising from activated B cells, essentially memory B cells. To study the survival of both plasmablasts ( $CD20^{neg}CD38^{high}CD138^{neg}$ ) and plasma cells ( $CD20^{neg}CD38^{bright}CD138^{bright}$ ), we generated pre plasmablasts ( $CD20^{low}CD38^{pos}CD138^{neg}$ ) from CD40-activated B cells ( $CD20^{high}CD38^{neg}CD138^{neg}$ ) and cultured them on macrophages, dendritic cells or osteoclasts. By quantitative and qualitative study, we showed that dendritic cells support the survival of plasmablasts, but not that of plasma cells. On the other hand, osteoclasts support the survival of both plasmablasts and plasma cells during at least two weeks. Plasma cells surviving on osteoclasts display phenotypic features of bone marrow plasma cells, i.e.  $CD138^{bright}CD38^{bright}HLA-DR^{low}CD45^{dim}$ . The ability for osteoclasts to support the survival of plasma cells was fully dependent on cell-cell contact and was not mediated by BAFF/APRIL. The data proves that osteoclasts are highly capable of supporting the survival of plasma cells in vitro and suggests that these cells could be involved in the putative bone marrow niche of plasma cells.

## Introduction

Plasma cells (PCs) are terminally differentiated B cells (1-4). Plasma cells differentiate from plasmablasts that arise from activated B cells, essentially memory B cells (5). Memory B cells are activated in secondary immune organs and differentiate into plasmablasts, that migrate to inflamed tissues, lamina propria and bone marrow, where they finally differentiate into PCs. Long-lived PCs that are the source of protective antibodies for extended periods of time are mainly located within the bone marrow. Their number is stable, i.e. around 0.2% of mononuclear cells, revealing a tight regulation of their survival. There is growing evidence that in vivo PC survival depends on the ability of PCs to find a suitable niche and to remain in it (1-2). Stromal cells and synoviocytes, all of mesenchymal origin, have been reported to support the survival of plasmablasts (PBs) and/or PCs independently or partly through an IL6 secretion (6-10). The ability of stromal cells to support PC survival does not depend on the location/origin of stromal cells, e.g. stromal cells from bone marrow, spleen or liver were quite equally able to support PC survival (8,10). On the other hand, dendritic cells and T cells, both types of hematopoietic origin, have been reported to support the growth of murine lymph node PBs and the survival of human tonsil PCs (11-12). These facts combined led to the hypothesis that stromal cells could not be the only cell type involved in the PC bone marrow niche (1).

Multiple myeloma cells, i.e. malignant switched PCs, are mainly located within the bone marrow. Interaction of MM cells with bone marrow environment, i.e. stromal and osteoclast cells, is essential for myeloma growth and survival (13). In vitro studies have further proved that osteoclasts (OCs) support the long-term survival of myeloma cells through cell-cell contact (14-15). OCs that are of monocyte origin are located within the bone marrow where they control bone homeostasis hand in hand with osteoblasts (16). However, in rheumatoid arthritis, OCs are found within the inflamed synovial effusions, where they destroy the joints (17). Arthritic synovial effusions also contain an abnormally high number of immune cells, including differentiated PCs (18). Myeloid dendritic cells (DCs), as OCs of monocyte origin have also been reported to support myeloma-cell growth in vitro (19). Since myeloma cells keep some bone marrow PC features, in particular that their survival depends on the bone marrow environment, OCs are very likely to support PC survival. The aim of this in vitro study was to evaluate if monocyte-derived cells, namely DCs, macrophages (MOs) and OCs, are able to support PB and/or PC survival.

## **Materials and Methods**

### **Antibodies and Reagents**

Anti-CD20-FITC, anti-CD1a-APC, anti-CD38-APC and APC-IgG1 control were from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-CD45-FITC, anti-CD14-PE, anti-CD138-PE, anti-HLA-DR-PE, FITC-IgG1 control and PE-IgG1 control were from Beckman Coulter (Roissy, France). Blocking anti-CD40L mAb, rat anti-BCMA mAb, rat anti-TACI mAb and PE conjugated polyclonal antibody to rat IgG were from Alexis (Coger, Paris, France). Anti-BAFFR-PE mAb was from eBioscience (Clinisciences, Montrouge, France). The leucocyte acid phosphatase kit for tartrate-resistant-acid phosphatase (TRAP) mitomycin-C and dexamethasone was from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). The recombinant human IL-2, IL-10, RANKL, M-CSF, GM-CSF, IL-4, IgG1-Fc and BCMA-Fc were obtained from R&D (Minneapolis, MN). The recombinant IL-6 was from Novartis Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). The neutralizing mAbs directed against CD11a were from Diaclone (Besançon, France), CD11b from Serotec (France) and CD49d, CD50, CD54 and CD102 from R&D.

### **Generation of macrophages (MOs), dendritic cells (DCs) and osteoclasts (OCs)**

MOs, DCs and OCs were derived from peripheral blood of normal donors, obtained in agreement with current French laws and provided by the Etablissement Français du Sang. PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation and cryopreserved. Thawed cells were seeded in 24-well plates ( $2.5 \times 10^6$ /1ml) in 10% FCS  $\alpha$ -MEM. For DCs and MOs, adherent PBMCs were cultured 5 days, with 10 ng/ml IL4 and 100 ng/ml GM-CSF or with 100 ng/ml M-CSF respectively. For OC generation, PBMCs were cultured 10 days with 50 ng/ml RANKL, 25 ng/ml M-CSF and 10n dexamethasone (14). For the experiments directly comparing OC, DC and MO effect on PB and PC survival, OCs, DCs and MOs were derived from the same cryopreserved PBMCs (obtained from different donors ).

### **Generation of pre-plasmablasts**

B cells were isolated from tonsils obtained from children and adults undergoing routine tonsillectomy. Following isolation by Ficoll-Hypaque centrifugation and adherence, lymphocytes were cryopreserved. After thawing, T cells were removed by sheep rosetting (20) and CD27+ B cells were sorted (MACS, Miltenyi Biotec, Germany).

Pre-plasmablasts (prePBs) were generated in vitro from purified CD27<sup>+</sup> B cells, as initially described by Arpin and al and slightly modified (21). Briefly, CD27<sup>+</sup> B cells were activated 3 days over a mitomycin-C treated (45 min, 75 µg/ml) CD40L expressing fibroblasts (kind gift of Dr. T. Defrance, Lyon, France) in presence of 50 U/ml IL2 and 100 ng/ml IL10. The cells were thereafter recultured for 2 days without fibroblasts, in presence of IL-2, IL-10 and blocking anti-CD40L mAb (2 µg/ml). PrePBs were purified by CD20 immunomagnetic depletion of remaining CD20 high B cells (Miltenyi Biotech).

#### **Identification and count of plasmablasts and plasma cells**

PBs and PCs were identified by CD20, CD38 and CD138 expression with a FACSCalibur (Becton Dickinson), as previously described (20,22). A known number of CaliBRITE beads (BD Biosciences) was added into each well before harvesting and the number of living PBs and PCs was calculated as a function of the bead ratio to live cells (23).

#### **Coculture assay, conditioned media and Ig secretion**

Purified PBs ( $0.4 \times 10^6$ /well in 1 ml) were cultured in 10% FCS  $\alpha$ -MEM supplemented with 10 ng/ml IL-6, alone or cocultured with MOs, DCs or OCs in their respective media. Conditioned media of OCs and OC/PC cocultures were respectively obtained by culturing OCs two days with RANKL and MSCF with or without PCs (in presence of IL-6). To investigate contact dependency, PBs were cultured in 3 µm pore size transwell inserts (Nunc) in OC containing wells. IgG concentrations were determined by ELISA (20).

#### **Statistical analysis**

Group comparisons were performed by Wilcoxon Rank-Sum test or Student t-test and paired comparisons were performed by Wilcoxon Signed-Rank test or Paired Student t-test.

## Results

### **Generation of macrophages, dendritic cells, osteoclasts and pre-plasmablasts**

Macrophages (MOs), dendritic cells (DCs) and osteoclasts (OCs) were all derived from monocytes as described within the material and method. Monocytes cultured with either M-CSF or GM-CSF and IL4 displayed morphological and phenotypic characteristics of MOs (CD1a<sup>neg</sup>CD14<sup>pos</sup>) or DCs (CD1a<sup>pos</sup>CD14<sup>neg</sup>), respectively (Figure 1A). OCs were derived from monocytes cultured 10 days with RANKL, M-CSF and dexamethasone, as described (14). Indeed, most cells showed the characteristics of OCs; they were large multinucleated cells and positive for TRAP staining (Figure 1A). Pre-plasmablasts (PrePBs) were generated from tonsil CD27<sup>+</sup> B cells, as previously described (19,20,22). To obtain a pure population of pre-plasmablasts (CD20<sup>low</sup>CD38<sup>pos</sup>), remaining undifferentiated B cells (CD20<sup>high</sup>CD38<sup>neg</sup>) were removed by CD20 depletion (Figure 1B).

### **Osteoclasts were more efficient than dendritic cells and macrophages to support the survival of PCs**

We then investigated whether all the monocyte-derived cells were able to support the survival of PBs and/or PCs. As shown in Figure 2A, the survival of PBs and the appearance of PCs were monitored through enumeration of CD38<sup>high</sup>CD138<sup>neg</sup> and CD38<sup>bright</sup>CD138<sup>bright</sup> cells respectively (20,22), and their functionality was confirmed by IgG accumulation. Since it has been shown that PB or PC escape to apoptosis is partly mediated by IL6, we added 10 ng/ml IL6 to all cultures (6,7,9,20,22). However, as previously described, IL-6 was poorly efficient to support the survival of PBs and their subsequent differentiation into PCs (20): after 5 days, the median of living cells was 11% of input (range 4-17%) and after 12 days it fell to 0 (median survival: 0%, range 0-2), see Table 1 and Figure 2A. The median of IgG accumulation was 63 mg/ml (range 26-84). Cocultures of prePBs with MOs, DCs or OCs were performed in presence of IL-6 and analyzed after 5 to 12 days after prePB input. To prevent the cytokines required for MOs, DCs or OCs from playing any role, prePB differentiation was monitored in each culture condition. M-CSF or GM-CSF and IL-4 or M-CSF and RANKL addition to IL6 did not modify the survival of PBs and PCs cultured alone (data not shown).

As shown in Table 1 and Figure 2A, coculture of prePBs with MOs (in presence of M-CSF) had antinomic effects, showing either inhibition (3 experiments out of 7) or increase (4 experiments out of 7) of PB and PC survival and, similarly, inhibition or increase of IgG accumulation, i.e.

117  $\mu$ g/ml (20-151),  $p=0.176$ . Therefore, MOs did not significantly modify PB and PC survival at day 5 or 12, i.e. 11% (1-18)  $p=0.7353$  and 0.2% (0-4)  $p=0.2702$ , respectively.

In contrast, coculture of prePBs with DCs (in the presence of GM-CSF and IL-4) significantly enhanced the number of both PBs and PCs at day 5, in 5 experiments out of 7 (median survival: 17%, range 4-55,  $p=0.018$ ), see Table 1 and Figure 2A. Interestingly, DCs significantly enhanced cell survival over a short period of time, since at day 12 no surviving cells were recovered, i.e. 0% (0-0.1)  $p=0.0861$ . In accordance with enhanced cell survival at day 5, IgG production was significantly higher in cocultures with DCs, i.e. 80  $\mu$ g/ml (range 40-109), than for prePBs alone,  $p=0.028$ . DCs thus supported the survival of ongoing differentiating cells during a short period.

In contrast to both MOs and DCs, OCs were strongly able to enhance the number of surviving PCs and PBs at day 5 (median survival: 20%, range 12-53,  $p=0.0077$ ) and to sustain cell survival for at least 12 days in all experiments (median survival: 4%, range 0.4-10%,  $p=0.018$ ), Table 1 and Figure 2A. As expected, IgG production was significantly higher in cocultures with OCs 115  $\mu$ g/ml (range 75-182), than for PBs alone ( $p=0.018$ ) and than in cocultures with either DCs ( $p=0.018$ ) or MOs ( $p=0.0425$ ).

Phenotypic analysis of surviving cells at day 5 (Figure 2A) showed that the cocultures enhanced the survival of both PBs (CD138<sup>neg</sup>) and PCs (CD138<sup>bright</sup>). The cocultures did not modify the differentiation process, but rather supported the survival of PBs, PCs or both. Altogether, these data show that among monocyte-derived cells, OCs were more potent than MOs to support the survival of differentiated PCs whereas DCs mediated survival of PBs only.

### **OC generated PCs displayed bone marrow PC phenotype**

After 12 days, OCs supported the survival of cells that all brightly expressed CD138 like bone marrow PCs. As shown in Figure 2B, in good agreement with high syndecan expression, CD38, CD20 and HLA-DR expression confirmed PC differentiation. Indeed, CD38 was high, CD20 was fully negative, HLA-DR expression was very low and CD45 was reduced (Figure 2B). This phenotype was similar to that of bone marrow PCs, but not to that of tonsil PCs, nor of peripheral blood PCs (24-25). Bone marrow PCs are considered to be the prototype of differentiated PCs in vivo. Our data shows that OCs allowed PBs to survive and mature into PCs that look like bone marrow PCs. Moreover, our data also showed that OCs, as opposed to DCs, supported PC survival.

### **BAFF/APRIL were not involved in OC-mediated PC survival**

Interestingly, osteoclasts have been reported to produce high amounts of both APRIL and BAFF (26). Both cytokines bind to BCMA, the expression of which is reported to be essential for long-term PC survival in mice (27) and APRIL is known to interact with CD138 (28). In humans, BAFF was reported to increase survival of PBs (23). Therefore, we investigated BAFF-R, TACI and BCMA kinetic expression during PC generation from resting B cells up to PC (Figure 3A). BAFF-R was expressed on resting B cells (MFIR=9±1.4) and thereafter decreased (MFIR=2.3±0 on PCs). In contrast, TACI and BCMA expression peaked respectively on activated B cells (MFIR=21±4.7) and on prePBs (MFIR=4.8±1.8) and thereafter decreased: the MFIR of TACI and BCMA on PCs were 2±1 and 1.6±0.4, respectively. These data showed a residual expression of all three receptors that could account for BAFF/APRIL involvement of the survival of PCs on OCs. To further explore this hypothesis, BCMA-Fc was added to PB/OC cocultures in order to neutralize both BAFF and APRIL. BCMA-Fc was added at day 2 or 5 and survival of PBs and PCs was analyzed at day 5 or 12, respectively. As shown in Figure 3B, the addition of BCMA-Fc only slightly reduced the number of surviving cells at day 12 (30%), but this inhibition did not reach statistical significance (p=0.10). Similarly, the production of IgG was not modified, i.e. p=0.46 and p=0.65  $\mu$ g/ml at day 5 and 12, respectively (Figure 3C). This data strongly suggests that APRIL and BAFF are not implied in the survival of PB/PC on OCs.

### **Direct interactions were required between PBs and OCs**

To investigate whether the survival of PBs in the presence of OCs depends on cell-cell interaction and/or on soluble factors, prePBs were cocultured either with OCs in a transwell system or in an OC conditioned medium (CM). As shown in figure 4A, the culture of PBs without OC contact fully abrogated OC mediated survival, i.e. 116%±25% of inhibition, suggesting that direct interactions are required (p<0.05, n=4). In good agreement with this finding, CM of OCs was not more potent than control medium, i.e. 101%±34% p>0.05 (Figure 4B). In order to further exclude that survival is supported by soluble factors released after contact between OCs and PBs, we further performed CM of OC/PB coculture. Here again, the CM was not more potent than control medium, i.e. 80%±15% p>0.05 (Figure 4B). Altogether, these experiments demonstrated that only cellular interactions with OCs allow PBs to survive and differentiate.



## Discussion

The aim of this in vitro study was to evaluate if osteoclasts, macrophages and dendritic cells, all of monocyte origin, can support the survival of normal human plasma cells. Plasma cells differentiate from plasmablasts arising from activated B cells, essentially memory B cells (1-5). Differentiation of B cells into PCs is linked to proliferation (20,29-31). Proliferation is induced either by antigen binding or by triggering CD40 or TLR. We used the classical CD40/IL2+IL10 system to induce the proliferation and differentiation of tonsil CD27+ B cells. To study the survival of both plasmablasts ( $CD20^{neg}CD38^{high}CD138^{neg}$ ) and plasma cells ( $CD20^{neg}CD38^{bright}CD138^{bright}$ ), we generated pre plasmablasts ( $CD20^{low}CD38^{pos}CD138^{neg}$ ) from CD40-activated B cells ( $CD20^{high}CD38^{neg}CD138^{neg}$ ) and cultured them on macrophages, dendritic cells or osteoclasts. Macrophages were not significantly able to support the survival of PBs and PCs. The effect of macrophages was not easily interpretable since half experiments indicated a negative effect and half a positive one. Although it would be interesting to elucidate this antinomic effect of macrophages, we did not explore it further here. Macrophages are well known to be "friend or foe", i.e. either pro-inflammatory or in contrast anti-inflammatory mediators, this antinomic effect depending on their activation status (32). Macrophages as well as PCs highly infiltrate inflammatory organs. So, they could contribute in vivo to the regulation of the survival of PCs in situ (33).

In mice, CD11c DCs have been reported to either supporting the survival of PBs or in contrast to be dispensable for PC differentiation in T-independent type 2 immune responses (11,34). In humans, the role of DCs (of monocyte origin) to support the survival of PBs had never been investigated. We show that DCs supported the survival of ongoing differentiating cells but during a short period only. Indeed, DCs were unable to support the survival of PCs. DC-mediated cell survival was restricted to the PB stage.

OCs were strongly able to enhance the number of surviving PCs and PBs after 5 days and to sustain cell survival for at least 12 days. At this time, all PCs were  $CD138^{bright}CD38^{bright}CD20^{neg}$   $HLA-DR^{low}$  and  $CD45^{dim}$ . This phenotype was clearly similar to that of bone marrow PCs, but not to that of tonsil PCs, nor of peripheral blood PCs (24-25). OCs allowed PBs to survive and mature into PCs that look like bone marrow PCs and sustain the survival of differentiated PCs.

We previously pointed out the essential role of IL-6 in the PC differentiation process: IL-6 prevented death of PBs and enhanced their proliferation with IL-2 (20,22). Exogenous IL-6 was added in order to maintain some survival of prePBs. Anyway, IL-6 was not responsible for the

survival provided by any monocyte-derived cell (data not shown). OCs produce both APRIL and BAFF (26). BAFF binds to BAFF-R, BCMA and TACI. APRIL binds to BCMA, TACI and to CD138 (28). We showed that BAFF-R was expressed on resting B cells while TACI and BCMA expression peaked respectively on activated B cells and on prePBs. PCs displayed a residual expression of all three receptors. However, we showed that addition of BCMA-Fc did not modify significantly the survival of PBs and PCs on OCs. Ellyard et al also reported that bone marrow PCs did not express BAFF/APRIL receptors (35). The lack of effect of OC CM on PC survival, the weak expression of all BAFF/APRIL receptors on PCs and the lack of significant inhibition of PC survival by BCMA-Fc converged to suggest that BAFF/APRIL were not involved in OC-mediated PC survival.

Since BCMA has been reported to be essential for *in vivo* PC survival in mice (27), our data could suggest that BAFF/APRIL might be implied in PC retention within the bone marrow, rather than in survival. Indeed, the treatment of patients with Multiple Myeloma with TACI-Ig induced a high reduction of polyclonal PCs and the escape of non-malignant PCs from the bone marrow (36). Furthermore, mobilization of resident bone marrow PCs was also observed in physiological conditions, *i.e.* during secondary immune response to tetanus toxin in humans, showing that PCs are actively maintained within the bone marrow (37-38).

Our experiments have demonstrated that only cellular interactions with OCs allow PBs to survive and differentiate. Similarly, it was reported that OCs support the survival of myeloma cells through cell-cell contact (14-15). On the other hand, PC survival mediated by synoviocytes or stromal cells also depends on cell-cell contact (6,9). However, the molecules involved in the survival of PCs mediated through cell-cell contact have not been identified. Only CD49d/fibronectin interactions were reported to be essential for stromal mediated survival of PCs (6). On the other hand, we observed that CD54 expression was increased on PCs surviving on OCs and that OCs expressed CD11b (data not shown), one of the counter receptors for CD54 (39). Increased expression of CD54 was reported on bone marrow PCs as compared to PBs (4). However, neutralizing Abs directed against CD11a, CD11b, CD49d, CD50, CD54 and CD102 were unable to prevent PC survival on OCs, even in presence of BCMA-Fc (data not shown). On the other hand, CD44-acid hyaluronic acid interactions have been reported to increase the survival of murine PCs (40). However, the survival of murine or human PCs was not affected by anti-CD44 mAbs (9). In humans, CD44 was also not involved in the survival of PCs on stromal cells and the one of myeloma cells on OCs (6,10,15). We did not find too any effect of both hyaluronic acid and anti-CD44 mAb on the survival of human PCs (data not shown). Since our data did not cover

involvement of these molecules, other approaches, such as PCR or DNA arrays, are further required to identify the interactions involved in *OC/PB* survival.

Partner cells for *PCs* appear to be multiple, i.e. stromal cells, synoviocytes, *DCs*, *T cells* and *OCs*. *PCs* are located in different organs, i.e. bone marrow, lymphoid organs, inflamed tissues and lamina propria. It is tempting to speculate that *PC* partner will be different depending on the *PC* location. In all cases, direct cell-cell interactions are strictly required. The multiplicity of the type of *PC* partner could suggest either a specificity of partners depending on the nature of *PCs* or on the contrary a shared mechanism involving the same molecules. This question remains pending and will require further investigations.

In summary, our data prove that *OCs* strongly support the survival of both *PBs* and *PCs* through direct cell-cell contact and further suggest that *OCs* might be involved in the bone marrow niches for *PCs*.

## References

- 1 Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:265-70.
- 2 Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:741-50
- 3 Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:230-42.
- 4 De Vos J, Hose D, Reme T, Tarte K, Moreaux J, Mahtouk K, Jourdan M, Goldschmidt H, Rossi JF, Cremer FW, Klein B. Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev*. 2006;210:86-104.
- 5 Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J Exp Med*. 1997;186:931-40
- 6 Roldan E, Garcia-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med*. 1992;175:1739-47.
- 7 Kawano MM, Mihara K, Huang N, Tsujimoto T, Kuramoto A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood*. 1995;85:487-94.
- 8 Merville P, Dechanet J, Desmouliere A, Durand I, de Bouteiller O, Garrone P, Banchereau J, Liu YJ. Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts *J Exp Med*. 1996;183:227-36.
- 9 Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*. 2002;169:4213-21.
- 10 Skibinski G, Skibinska A, Stewart GD, James K. Enhancement of terminal B lymphocyte differentiation in vitro by fibroblast-like stromal cells from human spleen. *Eur J Immunol*. 1998;28:3940-8.
- 11 Garcia De Vinuesa C, Gulbranson-Judge A, Khan M, O'Leary P, Cascalho M, Wabl M, Klaus GG, Owen MJ, MacLennan IC. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol*. 1999;29:3712-21.
- 12 Withers DR, Fiorini C, Fischer RT, Ettinger R, Lipsky PE, Grammer AC. T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood*. 2007 Feb 13; [Epub ahead of print]
- 13 Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004;104:607-18.

- 14 Yaccoby S, Wezeman MJ, Henderson A, Cottler-Fox M, Yi Q, Barlogie B, Epstein J. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res.* 2004 ;64:2016-23.
- 15 Abe M, Hiura K, Wilde J, Shioyasono A, Moriyama K, Hashimoto T, Kido S, Oshima T, Shibata H, Ozaki S, Inoue D, Matsumoto T. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood.* 2004;104:2484-91.
- 16 Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood.* 2006;108:3992-6.
- 17 Toyosaki-Maeda T, Takano H, Tomita T, Tsuruta Y, Maeda-Tanimura M, Shimaoka Y, Takahashi T, Itoh T, Suzuki R, Ochi T. Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res.* 2001;3:306-10.
- 18 Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P. The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest.* 1995;95:456-63.
- 19 Kukreja A, Hutchinson A, Dhodapkar K, Mazumder A, Vesole D, Angitapalli R, Jagannath S, Dhodapkar MV. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203:1859-65.
- 20 Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood.* 2001;97:1817-22.
- 21 Arpin C, Dechanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Briere F, Banchereau J, Liu YJ. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science.* 1995;268:720-2
- 22 Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood.* 1999;94:701-12.
- 23 Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003;112:286-97.
- 24 Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood.* 2002;99:2154-61.
- 25 Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood.* 2005;105:4845-8.
- 26 Moreaux J, Cremer FW, Reme T, Raab M, Mahtouk K, Kaukel P, Pantesco V, De Vos J, Jourdan E, Jauch A, Legouffe E, Moos M, Fiol G, Goldschmidt H, Rossi JF, Hose D, Klein B. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood.* 2005;106:1021-30.

- 27 O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004;199:91-8.
- 28 Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner QG, Cachero TG, Qiang F, Gorelik L, Kalled SL, Acha-Orbea H, Rennert PD, Tschopp J, Schneider P. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med*. 2005;201:1375-83.
- 29 Jelinek DF, Lipsky PE. The role of B cell proliferation in the generation of immunoglobulin-secreting cells in man. *J Immunol*. 1983;130:2597-604.
- 30 Tangye SG, Avery DT, Hodgkin PD. A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol*. 2003;170:261-9
- 31 Chen-Kiang S. Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev*. 2003;194:39-47.
- 32 Lacy-Hulbert A, Moore KJ. Designer macrophages: oxidative metabolism fuels inflammation repair. *Cell Metab*. 2006;4:7-8.
- 33 Cassese G, Lindenau S, de Boer B, Arce S, Hauser A, Riemekasten G, Berek C, Hiepe F, Krenn V, Radbruch A, Manz RA. Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:2726-32.
- 34 Hebel K, Griewank K, Inamine A, Chang HD, Muller-Hilke B, Fillatreau S, Manz RA, Radbruch A, Jung S. Plasma cell differentiation in T-independent type 2 immune responses is independent of CD11c(high) dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:2912-9.
- 35 Ellyard JI, Avery DT, Mackay CR, Tangye SG. Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol*. 2005;35:699-708.
- 36 Rossi JF, Moreaux J, Rose M, Picard M, Ythier A, Rossier C, Sievers E, Klein B. A phase I/II study of antacicept (TACI-Ig) to neutralize APRIL and BlyS in patients with refractory or relapsed multiple myeloma or active previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia *Blood* (ASH annual meeting abstracts) 2006, 108:3578
- 37 Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dorner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005;105:1614-21
- 38 Gonzalez-Garcia I, Ocana E, Jimenez-Gomez G, Campos-Caro A, Brieva JA. Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *J Immunol*. 2006;176:4042-50.
- 39 Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood*. 2004;104:4029-37.

40 Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, Muehlinghaus G, Szyska M, Radbruch A, Manz RA. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol.* 2003;171:1684-90.

## Legends to figures

### Figure 1. In vitro generation of human MOs, DCs, OCs, and prePBs.

A. Characterization of macrophages, dendritic cells and osteoclasts. Morphology of cells was examined by May Grünwald Giemsa (MGG) staining on cytopun cells. Expression of CD14 and CD1a was determined in double staining by flow cytometry. Osteoclasts were stained for TRAP.

B. Purification of in vitro generated prePBs. PrePBs were generated in vitro in a two-step culture as described in the material and method. Two days after removal of CD40L-fibroblasts, most activated B cells (CD20<sup>high</sup> CD38<sup>neg</sup>) have engaged their differentiation into prePBs i.e., CD20<sup>low</sup> CD38<sup>high</sup> (left panel). Undifferentiated B cells (CD20<sup>high</sup> CD38<sup>neg</sup>) were depleted from prePBs with CD20 immunomagnetic beads (right panel).

### Figure 2. OCs, but not DCs or MOs, supported PC survival.

A. Enumeration of surviving PBs and PCs 5 or 12 days after input of prePBs. PrePBs were seeded alone or with MOs, DCs or OCs as indicated. Enumeration of CD38<sup>high</sup> cells was performed by an addition of a known number of CalIBRITE beads (BD Biosciences) added in each well before harvesting. The number of CD38<sup>high</sup> cells was calculated as a function of the ratio of beads (R2) to live cells (R1). PBs (CD38<sup>high</sup> CD138<sup>neg</sup>) and PCs (CD38<sup>high</sup> CD138<sup>high</sup>) were identified in double staining with anti-CD38-APC and anti-CD138-PE mAbs.

B. Evolution of the phenotype of prePBs during differentiation and survival on OCs. The phenotype of PBs and PCs surviving on OCs was analyzed at days 5 and 12 in comparison to the one of prePBs (D0).

### Figure 3. BCMA-Fc did not prevent OC-mediated PC survival.

A. Kinetics of BAFF-R, TACI and BCMA expression. BAFF-R, TACI and BCMA expression was analyzed by flow cytometry during the PC generation process, i.e. on resting CD27<sup>+</sup> B cells (Day - 5), activated B cells (Day -2), prePBs (Day 0), PBs (Day 2) and PCs (Day 5). Cells were either directly (BAFF-R) or indirectly stained (TACI, BCMA). The level of expression was defined as the mean fluorescence intensity ratio (specific fluorescence/control fluorescence).

B,C. Survival and Ig secretion of PBs and PCs in the presence of BCMA-Fc. PrePBs were cultured 5 (B) or 12 (C) days with OCs in the presence of 10 $\mu$ g/ml control IgG1-Fc or 10 $\mu$ g/ml BCMA-Fc. BCMA-Fc or IgG1-Fc was added at day 2 (B) or 5 (C). The total number of surviving CD38<sup>high</sup> cells was enumerated as described in the legend of figure 2. IgG secretion was determined by ELISA at day 5 (B) or 12 (C).

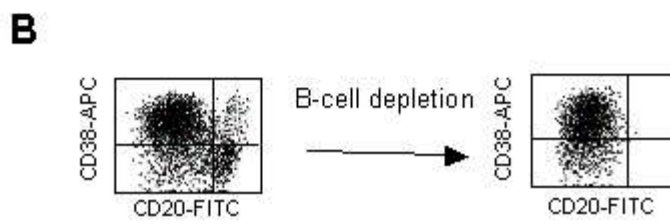
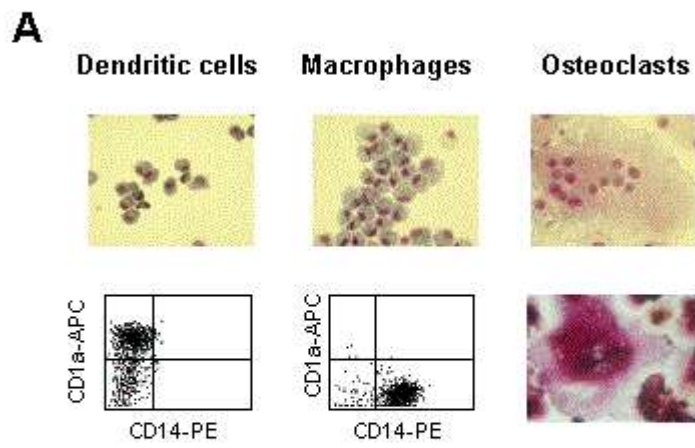


**Figure 4. OC-mediated PC survival required cell-cell contact.**

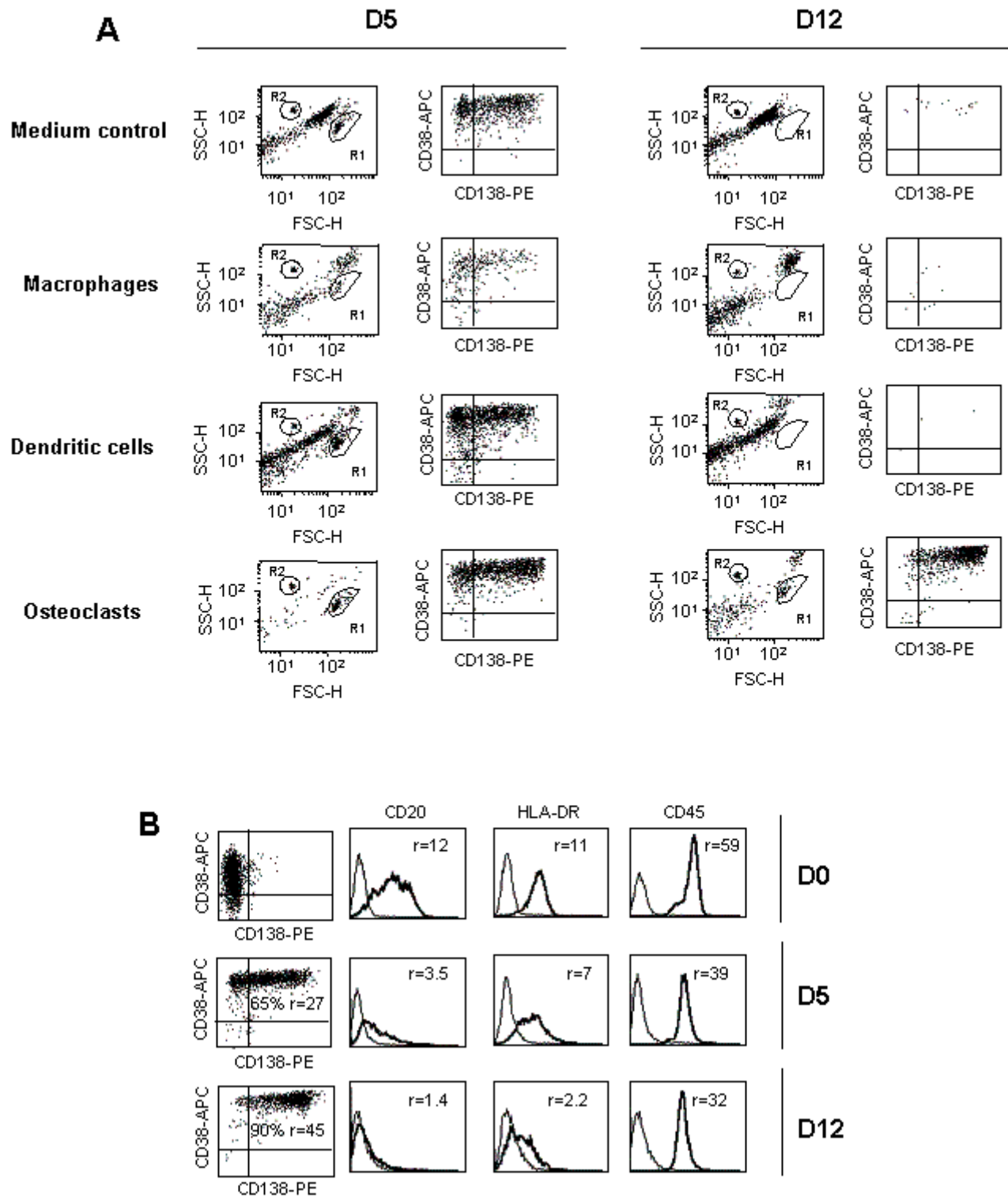
A. Survival of PCs on OCs in transwell system. PrePBs were cultured 5 days either directly with OCs or separated from OCs in transwell. Four independent experiments were performed.

B. Survival of PCs in the presence of conditioned medium of OCs or OCs plus PCs. PrePBs were cultured for 5 days alone or with conditioned media (CM) of two independent cultures of OCs (OC CM1, CM2) or of two independent cocultures of prePBs with OCs (OC+PC CM1, CM2). The figure represents two independent experiments.

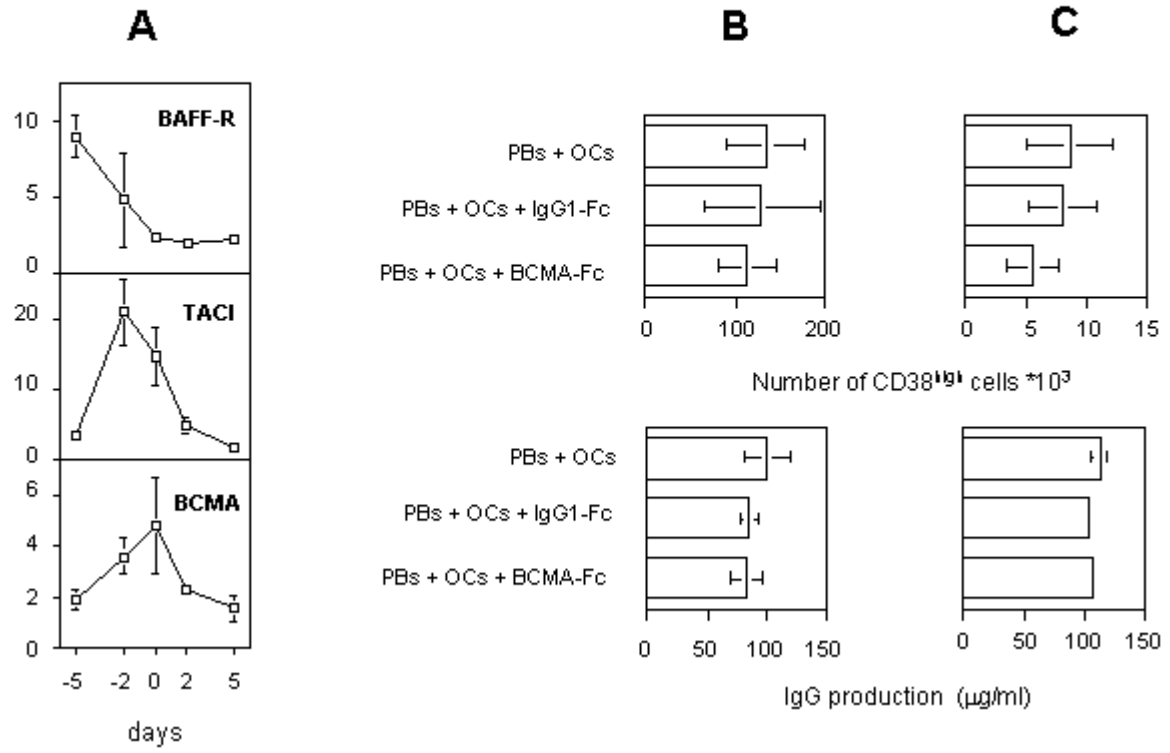
**Figure 1**



**Figure 2**

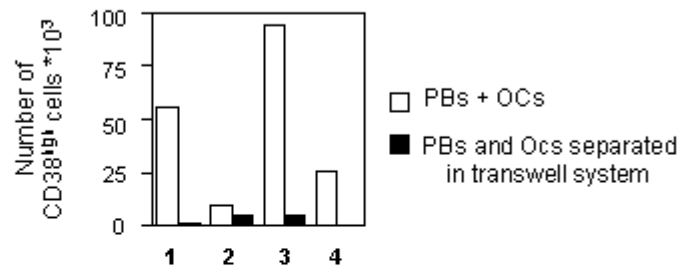


**Figure 3**

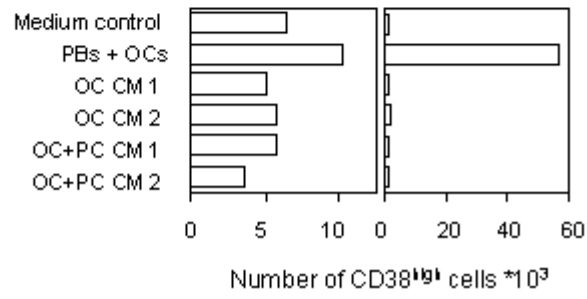


**Figure 4**

**A**



**B**



**Table 1**

CD38 <sup>high</sup> cells, % of prePB input								
	Day 5				Day 12			
	medium	MOs	DCs	OCs	medium	MOs	DCs	OCs
median	11	11	17	20	0	0.2	0	4
range	4-17	1-18	4-55	12-53	0-2	0-4	0-0.1	0.4-10
p		0.7353	0.018	0.0077		0.2702	0.0861	0.018

Survival of PBs and PCs was monitored respectively at day 5 and 12 as described in the material and method and within the legend of Figure 2. The median (and range) number of CD38<sup>high</sup> cells was expressed as the percentage of prePB input. Paired comparisons to control were performed by Wilcoxon Signed-Rank test (n=7).

## VII) Discussion-Conclusion

### **A) Impact de la nature des signaux sur la nature des plasmocytes générés : illustration par la génération de plasmocytes en réponse aux CpG-ODN.**

Comme nous l'avons vu, l'étude de la biologie des PC normaux humains se heurte à leur faible représentation dans les tissus lymphoïdes. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont recours à des techniques de génération de PC in vitro à partir de LB. Pour différencier des LB in vitro, une variété de stimuli peut être recensée à ce jour, leur point commun étant leur capacité à stimuler la prolifération des LB indépendamment de leur spécificité antigénique. En contradiction avec les concepts qui lient la nature des signaux reçus au cours de la différenciation plasmocytaire à la nature des PC générés (notamment en ce qui concerne leur durée de vie) (Radbruch et al, 2006), les stimuli sont utilisés indifféremment pour répondre à diverses questions sur la biologie des PC.

Je me suis intéressée à deux techniques de génération in vitro. Le modèle décrit par Arpin et coll et déjà utilisé au laboratoire qui correspond à la stimulation de LB via le CD40 en présence d'IL-2 et d'IL-10 (Arpin et al, 1995 et 1997), et le modèle décrit par Bernasconi et coll qui correspond à la stimulation des LB via le TLR9 en présence d'IL-15 (Bernasconi et al, 2002). L'utilisation de ces deux modèles présentait l'intérêt d'activer les LB par des signaux de nature différente, le premier mimant la coopération avec un LT activé, l'autre la détection d'ADN bactérien.

Le premier modèle avait déjà fait l'objet d'une étude approfondie qui avait permis d'identifier sur un plan phénotypique et temporel les étapes de la différenciation plasmocytaire. Ainsi, selon un ordre de maturité croissant, nous distinguons les préPB (CD20+/-CD38+CD138-), les PB (CD20-CD38++CD138-) et les PC (CD20-CD38+++CD138+) (Jego et al, 2001). J'ai réalisé l'étude sur un plan phénotypique et temporel de la différenciation plasmocytaire dans le deuxième modèle. J'ai montré que les PC et leurs précurseurs générés de cette manière présentaient une expression du marqueur membranaire CD20. Toutefois, le retrait des CpG-ODN après trois jours de culture conduisait

à la génération de PC et de leurs précurseurs qui présentaient une expression moindre de ce marqueur. Ce résultat suggérait que ce phénotype particulier n'était pas lié à la nature du signal au moment de l'activation des LB mais à la persistance de ce signal au fil de la différenciation. Deux hypothèses peuvent être avancées quant à l'expression du CD20 en présence de CpG-ODN. La stimulation de TLR9 entraîne l'expression du CD20 à la surface des PC ou alors une population de PC ayant pour particularité d'exprimer le CD20 est maintenue en survie ou en prolifération grâce à cette stimulation. Nos résultats indiquent qu'il est impossible d'induire l'expression du CD20 en stimulant via le TLR9 les préPB issus des LB activés via le CD40. Toutefois, il reste envisageable que les préPB issus de la différenciation des LB activés via TLR9 aient acquis une capacité différente à répondre aux CpG-ODN. Il n'est donc pas raisonnable de conclure de manière définitive. Je n'ai pas exploré de manière directe la seconde hypothèse, mais une approche menée au laboratoire sur les cellules de MM montre que les CpG-ODN favorisent leur survie et leur prolifération (Annexe 1). Il est possible que cette caractéristique ne soit pas le résultat de la transformation tumorale de la cellule mais soit partagée par les PC normaux.

Il faut noter que cette caractéristique phénotypique n'est pas atypique puisque les PC d'amygdales expriment le CD20. Il serait intéressant de déterminer s'il existe un lien *in vivo* entre ce phénotype et la stimulation de ces cellules par des ligands de TLR9, ADN bactériens ou ligands endogènes.

En outre, j'ai montré que les PC générés en réponse aux CpG-ODN sécrètent une quantité importante d'IgM par rapport aux PC générés suite à la stimulation des LB via le CD40. Ce résultat peut s'expliquer par une mobilisation importante des LB à mémoire d'isotype IgM pour proliférer et se différencier en réponse aux CpG-ODN. Cette interprétation est soutenue par les travaux de Bernasconi et coll. En effet, ils ont montré que les CpG-ODN favorisent préférentiellement la prolifération des LB à mémoire d'isotype IgM. À l'inverse, la présence de LT alloréactifs, qui peut être apparentée au système de stimulation des LB via le CD40 que nous avons utilisé, favorise préférentiellement la prolifération des LB à mémoire commutés (Bernasconi et al, 2002).

Bien que ces données soulèvent un certain nombre de questions qui restent sans réponse, elles illustrent tout de même parfaitement l'importance de la nature des signaux reçus au cours de la différenciation plasmocytaire sur la nature des PC générés.



## **B) Prolifération cellulaire et différenciation plasmocytaire**

L'analyse de la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire au fil des étapes de la différenciation plasmocytaire illustre parfaitement l'importance du contrôle de la prolifération cellulaire dans le processus de différenciation plasmocytaire. La première étape qui correspond à l'activation des LB est caractérisée par l'apparition de cellules en cycle. Ce résultat corrèle avec la nécessité d'une prolifération des LB pour générer des PC (Jelinek et Lipsky, 1983). Une fois les cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, la prolifération va s'éteindre progressivement au fil des stades de différenciation. Ainsi, tandis que les premiers stades présentent une proportion importante de cellules dans les phases S et G2 du cycle cellulaire, les stades suivants sont caractérisés par une accumulation progressive des cellules en phase G1. Ce phénomène est le reflet de la mise en place des régulations géniques qui orchestrent la différenciation plasmocytaire conduisant à la formation de cellules non proliférantes. En effet, l'expression de Blimp-1 par le biais d'interactions directes ou indirectes conduit à la régulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire : extinction de c-myc (Lin et al, 2000), induction des protéines inhibitrices du cycle p21 et p18 (Shaffer et al, 2002).

Contrairement à la prolifération des LB activés, la prolifération des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire est indépendante de la stimulation via le CD40. En effet, l'arrêt de cette stimulation n'affecte pas la prolifération des cellules qui présentent une diminution de l'expression du CD20 tandis qu'il entraîne la diminution drastique et rapide de la proportion de cellules dans les phases S et G2 parmi les LB activés résiduels. Cette distinction relative à la dépendance d'un signal prodigué par la liaison du CD40 à son ligand en terme de prolifération mais également de survie avait été parfaitement mise en évidence dans les travaux de Tangye et coll. L'interprétation de leur données supportait l'hypothèse selon laquelle la génération en proportion importante de PC consécutive à l'arrêt de la stimulation via le CD40 résultait d'une combinaison de 3 mécanismes : 1) arrêt de la prolifération et mort des LB activés. 2) prolifération soutenue des PB. 3) différenciation des LB activés (Tangye et al, 2003). Cette hypothèse était en contradiction avec celle soutenue par Arpin et coll selon laquelle l'engagement des cellules dans le processus de différenciation plasmocytaire serait déclenché par l'arrêt de la stimulation via le CD40 (Arpin et al, 1995 et 1997). Les résultats dont je dispose pour ma part ne me permettent pas de trancher en faveur de l'une ou de l'autre de ces hypothèses. En effet,

les données relatives à l'étude de la proportion des cellules dans les différentes phases du cycle au cours de la génération de PC in vitro tendent à confirmer l'hypothèse de Tangye et coll mais de manière contradictoire la persistance de la stimulation via le CD40 était un phénomène délétère à la génération de PC. L'élucidation de cette question réside certainement dans la compréhension des mécanismes moléculaires relatifs au processus de différenciation plasmocytaire associés au signal CD40. Les données disponibles à ce sujet sont également contradictoires. L'étude de Randall et coll indique que le signal CD40 est associé à la diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour Blimp-1 (Randall et al, 1998). De manière contradictoire, les données de Allman et coll montrent que le signal CD40 est associé à la diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour Bcl-6 (Allman et al, 1996).

### **C) Apoptose et différenciation plasmocytaire**

L'analyse par Western Blot de l'expression de différentes protéines impliquées dans l'apoptose dans les préPB montre que ces cellules sont engagées dans le processus apoptotique avec une activation des caspases effectrices (caspase-3 et -6) associée au clivage de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, une forte diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et une augmentation de l'isoforme EL de Bim. Ce résultat corrèle avec la mort massive des cellules engagées dans le processus de différenciation in vitro quelle que soit la technique de génération utilisée. En outre, in vitro, ce phénomène d'apoptose massive est également caractéristique des plasmoblastes et plasmocytes issus des plasmocytoses réactionnelles ou bien encore des plasmocytes médullaires isolés (Merville et al, 1996 ; Jego et al, 1999). In vivo, le processus apoptotique va conditionner la quantité finale de PC générés et distinguer la population de PC dits à courte durée de vie de la population de PC dits à longue durée de vie. Ainsi, in vivo, l'apoptose est un processus essentiel pour maintenir l'homéostasie du compartiment plasmocytaire.

L'élucidation des mécanismes moléculaires de l'apoptose des PC et de leur précurseurs représente un intérêt pour la compréhension de la physiologie des plasmocytes normaux mais aussi dans le cadre de l'étude de la physiologie du MM qui se caractérise par la survie aberrante d'un clone plasmocytaire. Cependant très peu d'études ont été réalisées sur ce sujet et les résultats qui en découlent sont contradictoires. Les travaux d'Ursini et coll montrent que la mort plasmocytaire fait intervenir une boucle autocrine ou paracrine de production du ligand de mort TRAIL (Ursini et al, 2002). L'étude de Pelletier et coll quant à

elle postule pour une apoptose déclenchée en réponse à des stress importants du réticulum endoplasmique liés à la synthèse massive d'Ig (Pelletier et al, 2006). Mes données suggèrent qu'aucun de ces mécanismes n'est associé à l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. En effet, en contradiction avec une mort induite par TRAIL, des fragments clivés qui correspondent à la forme active de la caspase-8 ne sont pas détectés en Western blot dans les préPB. De plus, les préPB sont résistants à l'activation des récepteurs de mort à TRAIL, DR4 et DR5. Enfin, l'inhibiteur à large spectre des caspases n'a pas d'effet sur la mort spontanée. Mes données s'opposent également à un mécanisme de mort induit en réponse à des stress importants du réticulum endoplasmique puisqu'elles indiquent l'absence de clivage de la caspase-4, élément clé de l'initiation de ce processus apoptotique. Il est vrai que les préPB sont un stade précoce de la différenciation plasmocytaire, il est donc envisageable qu'à ce stade les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort des cellules soient différents de ceux impliqués dans la mort des PC. L'apoptose induite par l'activation du récepteur de mort CD95 en est une illustration parfaite. Les données de Médina et coll à ce sujet montrent que les PC des amygdales, mais pas les PC de la MO, sont induits en apoptose suite à l'activation du CD95 (Médina et al, 1997). Etant donné les correspondances établies entre le niveau de maturité et la localisation anatomique des cellules plasmocytaires, ces données postulent pour une perte de sensibilité des PC matures à l'activation de ce récepteur. Il est par conséquent tentant de penser, en associant mes données et celles d'Ursini et coll, à un phénomène opposé en ce qui concerne la sensibilité des cellules à l'activation des récepteurs de mort DR4 et DR5, à savoir un gain de sensibilité des PC matures. Une relation avec le niveau de maturité peut également être envisagée en ce qui concerne l'apoptose déclenchée en réponse à des stress importants du réticulum endoplasmique puisque les préPB sécrètent des quantités moins importantes d'Ig que les PC. Comme je l'ai évoqué précédemment, l'inhibiteur à large spectre des caspases n'a pas d'effet sur la mort spontanée. Cette observation tend à soutenir une hypothèse selon laquelle l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire serait indépendante des caspases. Cependant, une question subsiste pour conclure en ce sens de manière définitive : le z-VAD peut-il bloquer des caspases déjà fortement activées ou ne peut-il exercer son activité que si il est ajouté avant le déclenchement de la cascade d'activation des caspases ?

## **D) Survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire : rôle des cellules dérivées des monocytes.**

Quel que soit le mécanisme d'apoptose, de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* s'accordent sur le fait que la survie des cellules résulte de la répression active de leur programme apoptotique sous l'influence de signaux fournis par des interactions avec d'autres types cellulaires dans des sites particuliers dans lesquels elles se sont localisées. Nos travaux soutiennent cette idée, de plus, ils présentent pour la première fois dans un modèle humain, le rôle des cellules dérivées des monocytes dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.

Nous avons montré que chacun des types cellulaires dérivés des monocytes, les macrophages, les CD et les OC, présentait une capacité à prévenir l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Toutefois, les OC paraissent capables de fournir aux PC et à ses précurseurs des signaux de survie de manière plus efficace que les macrophages tandis que les CD semblent fournir de tels signaux uniquement aux PB.

Comme nous l'avons vu, l'efficacité moindre des macrophages par rapport aux OC est le reflet d'effets opposés sur la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire, à savoir un effet bénéfique dans une moitié des expériences et un effet inhibiteur dans l'autre moitié. Nous ne disposons pas de données pouvant expliquer ces effets opposés. Il serait intéressant d'établir s'il existe une corrélation entre l'état d'activation des macrophages et leurs effets sur la survie des PC. En effet, les macrophages peuvent présenter deux états d'activation distincts, favorisant ou atténuant le phénomène d'inflammation (Lacy-Hulbert et Moore, 2006). Dans le cadre de cette réflexion, il apparaît également important d'entreprendre une étude pour comparer le rôle des CD immatures (utilisées dans cette étude) et le rôle des CD matures. Il en est de même pour les OC, l'idée étant de comparer l'effet des OC actifs pour la résorption à celui des OC au repos, ou encore à celui des précurseurs ostéoclastiques mononucléés.

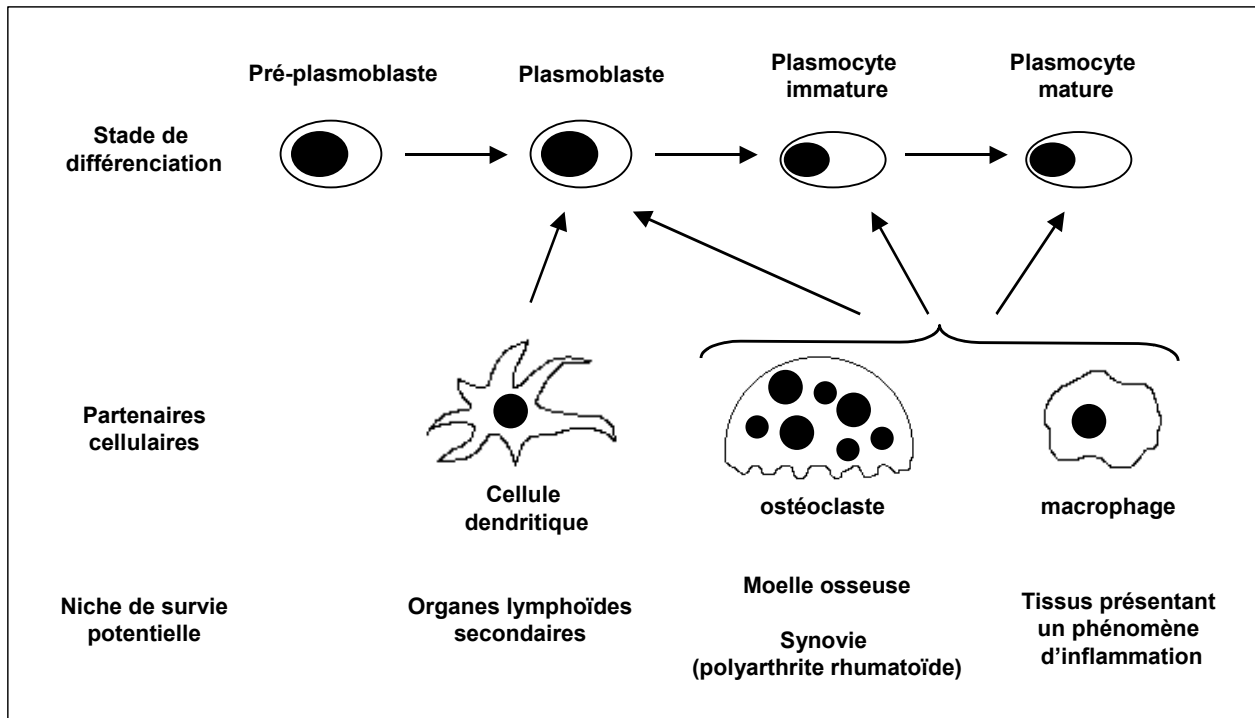
En ce qui concerne les CD, nos résultats s'accordent avec les données dans le modèle murin de Garcia de Vinuesa et coll. Leurs travaux mettent en évidence la nécessité au cours de

la réponse immunitaire d'une association des PB avec des CD d'origine myéloïde pour survivre tandis qu'ils s'expandent au niveau des foyers d'expansion extrafolliculaires : la pulpe rouge de la rate et les cordons médullaires des ganglions (Garcia de vinuesa et al, 1999b). Il paraît intéressant de noter qu'encore une fois, une interaction importante dans la physiologie des PC normaux se retrouve dans la physiologie du MM puisque Kukreja et coll ont rapporté récemment que l'interaction avec les CD dérivées in vitro des monocytes augmentent la clonogénicité des cellules de MM (Kukreja et al, 2006).

L'intérêt que nous avons porté aux OC au début de l'étude s'est avéré concluant. Ces cellules se sont montrées aptes à prévenir l'apoptose des cellules engagées dans le processus de différenciation. Elles permettent leur maturation jusqu'à un stade évoquant sur un plan phénotypique le prototype du PC mature qu'est le PC médullaire. Dans ce contexte, contrairement aux CD qui participeraient à l'expansion du compartiment plasmoblastique au sein des organes lymphoïdes secondaires, les OC pourraient participer au maintien de la survie des PC dans la MO. Ainsi, les CD contrôlèrent la quantité de PC générés au cours de la réponse immunitaire et les OC contribueraient au maintien de la mémoire sérologique.

Ces considérations m'amènent à définir la notion de « niche de survie ». Cette notion regroupe les cellules qui en assurent l'architecture et sont en interaction avec les PC ou leurs précurseurs, ainsi que des facteurs solubles de 2 sortes, des chimiokines qui les attirent et les retiennent et des facteurs de survie. Il est tentant de convenir que les CD pourraient participer à une niche de survie des PB au sein des organes lymphoïdes secondaires tandis que les OC pourraient participer à la niche de survie des PC dits à longue durée de vie dans la MO. Ce raisonnement tient aussi pour les macrophages si nous confirmons leur rôle dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. En effet, les macrophages infiltrent les tissus qui sont caractérisés par un phénomène d'inflammation. Dans ce contexte, les macrophages pourraient participer à une niche de survie des PC dans ces tissus. Il est également possible d'envisager leur participation à l'extinction des PC à l'arrêt de l'inflammation.

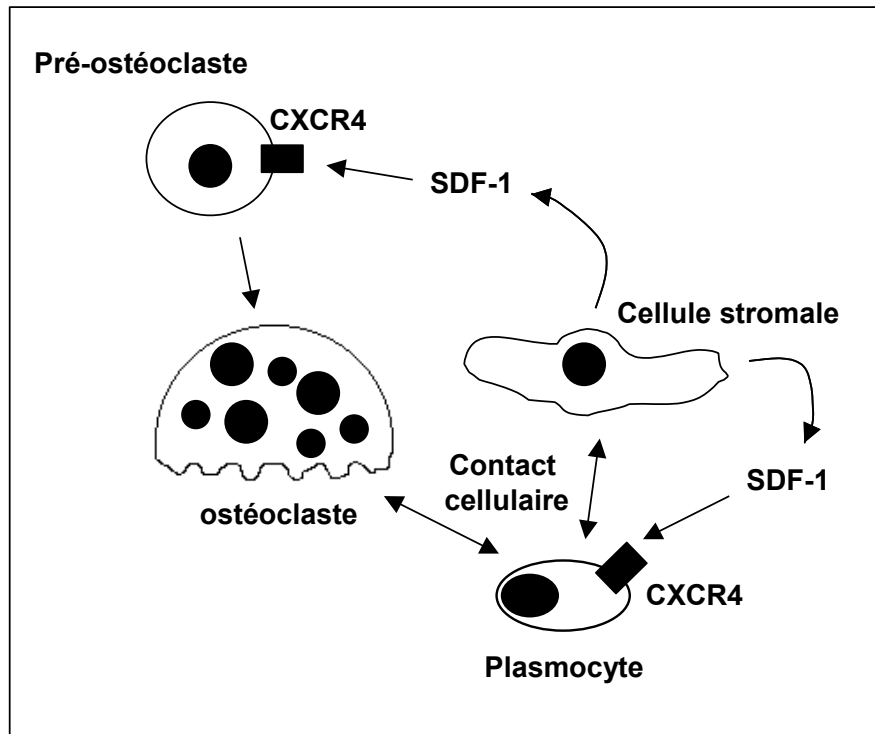
Une représentation schématique de la place de ces trois partenaires cellulaires au fil des étapes de la différenciation plasmocytaire est illustrée figure 25.



**Figure 25 : Rôle des cellules dérivées des monocytes dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire.**

Il est vrai qu'en ce qui concerne la composante cellulaire de la niche de survie des PC dits à longue durée de vie, seules les cellules stromales avaient été identifiées jusqu'alors. De nombreux travaux *in vitro* avaient montré un effet pro-survie de ces cellules sur les PC et leurs précurseurs (Kawano et al, 1995 ; Merville et al, 1996 ; Skibinski et al, 1998 ; Minges Wols et al, 2002). La sécrétion de SDF-1 par ces cellules apportait un argument supplémentaire puisque ces cellules apparaissaient responsables de l'attraction des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire au sein de la MO. De plus, une étude *in vivo* chez la souris avait apporté la preuve de l'association entre des PC CD138+/IgG+ et des cellules stromales au sein de la MO (Tokoyoda et al, 2004). Toutefois, l'étude de la physiologie des cellules de myélome soulevait des interrogations quant au rôle potentiel des OC dans cette niche (Abe et al, 2004 ; Yaccoby et al, 2004). Nous pouvons au regard de nos résultats soutenir cette hypothèse. Cette hypothèse est d'autant plus attractive lorsque l'on s'intéresse aux travaux de Wright et coll ainsi qu'à ceux de Zannettino et coll qui postulent pour un effet chimioattractant de SDF-1 sur les précurseurs ostéoclastiques et également un effet stimulant de ce facteur sur leur différenciation en OC (Wright et al, 2005 ; Zannettino et al, 2005). Ces données permettent en effet de suggérer un modèle de niche de

survie plasmocytaire dans lequel il serait possible d'intégrer à la fois les cellules stromales et les OC (figure 26).



**Figure 26 : Modèle de niche de survie plasmocytaire au sein de la moelle osseuse.** Les cellules stromales sécrètent SDF-1. SDF-1 est un facteur chimioattractant pour les PC nouvellement formés et les pré-OC qui expriment CXCR4. SDF-1 favorise également la différenciation des pré-OC en OC. Les interactions cellulaires avec les cellules stromales et les OC favorisent la survie des PC.

Nous avons cherché à identifier les interactions moléculaires essentielles à la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire médiée par les OC. Nous avons dans un premier temps porté notre intérêt sur les interactions des facteurs de survie BAFF et APRIL avec leurs récepteurs. Cet intérêt s'appuyait sur plusieurs observations. 1) l'étude des souris déficientes pour le gène BCMA démontre le rôle essentiel de ce récepteur dans la survie des PC médullaires murins (O'connor et al, 2004), 2) les OC sécrètent de forte quantité de BAFF et d'APRIL (Moreaux et al, 2005), 3) APRIL interagit avec le CD138 (Ingold et al, 2005), 4) les CD augmentent la clonogénicité des cellules de MM par le biais d'interactions de ces deux facteurs avec leurs récepteurs (Kukreja et al, 2006). Nous avons déjà à notre disposition des données qui provenaient de mes travaux sur le

rôle de BAFF et APRIL dans la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Ces données et celles d'Avery et coll (Avery et al, 2003) s'accordent sur le fait que BAFF fournit un signal de survie aux cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire qui se traduit par une augmentation des Ig sécrétées et en particulier des IgA. En revanche, de manière inattendue, et en contradiction avec les travaux de Avery et coll, APRIL n'a montré aucun effet. Il n'est pas exclu que ce résultat soit imputable à un problème sur le lot d'APRIL recombinant puisque nous ne disposons pas de contrôle positif pour s'assurer de son efficacité. Il est également raisonnable de penser que l'absence d'expression du CD138 dans les premiers stades de la différenciation plasmocytaire puisse être délétère à l'action d'APRIL. En effet, il faut admettre que les expériences que j'ai menées ne peuvent révéler l'effet bénéfique d'un facteur sur la survie des PC que si ce facteur a préalablement exercé un effet positif sur la survie et/ou la prolifération de ces précurseurs. Cette étape est primordiale pour obtenir un nombre de PC générés suffisant. Pour étudier l'impact de BAFF et APRIL dans les signaux de survie fournis par les OC, j'ai utilisé la molécule chimérique BCMA-Fc afin de neutraliser ces deux facteurs dans les cocultures. J'ai montré que l'addition de BCMA-Fc n'avait pas d'effet significatif sur la survie médiée par les OC des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Ces données suggèrent que BAFF et APRIL ne font pas partie des signaux de survie fournis par les OC. Il est intéressant de noter dans ce contexte que les travaux de l'équipe de Stuart Tangye mettaient en évidence l'absence d'expression des récepteurs pour BAFF et APRIL à la surface PC humains isolés à partir de la rate ou de la moelle osseuse et avaient exclu un effet pro-survie de BAFF sur ces cellules (Avery et al, 2003 ; Ellyard et al, 2005). Dans notre étude, l'analyse de l'expression du récepteur BCMA en cytométrie en flux révèle un niveau d'expression plus faible sur les PC que sur les PB qui corrèle avec les données de l'équipe de Stuart Tangye. Ces résultats sont en contradiction avec les données d'analyse des niveaux d'expression de l'ARNm codant pour ce récepteur (De Vos et al, 2006). Il est possible que ces résultats contradictoires résultent d'une localisation de la protéine autre qu'au niveau de la membrane plasmique des PC. En effet, une étude a montré que dans la lignée U266, la protéine BCMA est localisée au niveau de l'appareil de golgi (Gras et al, 1995). Ce type de localisation n'est pas atypique pour les récepteurs de la famille TNF. Il a été montré que TNFR1 était localisé au niveau de l'appareil de golgi dans les cellules endothéliales (Bradley et al, 1995 ; Jones et al, 1999). Toutefois, puisqu'il a été démontré que l'expression de BCMA est nécessaire à la survie des PC médullaires murins (O'connor et al, 2004), il est possible que l'interaction de BCMA avec son ligand BAFF ou



APRIL soit impliquée dans leur survie en favorisant leur rétention dans la MO. Les « niches de survie » des plasmocytes médullaires ont une capacité limitée. Cette notion est particulièrement illustrée par la constance du nombre de PC (0,5% des cellules mononucléées) localisés dans la moelle osseuse chez des individus adultes, en dépit des différentes vagues d'infections rencontrées (Sze et al, 2000). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, des études suggèrent que l'intégration d'une nouvelle spécificité antigénique dans le contingent de PC médullaires pourrait se faire au détriment des PC déjà établis, par compétition pour les niches (Odendahl et al, 2005 ; Gonzalez-Garcia et al, 2006). La mobilisation des PC résidants dans ce contexte montre que le maintien des PC dans la MO est un processus actif. Ces considérations nous amènent à proposer que BAFF et APRIL pourraient être impliqués dans la survie des PC en favorisant leur rétention dans la MO. Deux observations soutiennent notre hypothèse. 1) Le traitement des patients atteints de MM avec la molécule chimérique TACI-Ig induit la mobilisation de PC normaux résidants de la MO, 2) BAFF favorise l'adhésion des cellules de MM aux cellules stromales (Tai et al, 2006). Cette idée de rôle d'un facteur soluble dans la rétention des PC dans leur niche a d'ailleurs déjà été suggérée pour SDF-1 (Hargreaves et al, 2001 ; Ellyard et al, 2005).

Nous avons finalement mis en évidence que la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire était dépendante d'une ou de plusieurs interactions cellulaires directes avec les OC. Nous avons exclu le rôle d'un certain nombre de candidats potentiels dans ces interactions. En effet, nous avons montré que les interactions moléculaires impliquant CD49d, CD50, CD54, CD102, CD11a et CD11b ne semblent pas faire partie des signaux de survie fournis par les OC.

Il apparaît évident que l'une des principales perspectives qui découle de ces travaux est l'identification des molécules impliquées dans ces interactions. Notre intérêt se porte maintenant sur d'autres molécules. Des travaux avaient pointé l'importance de l'interaction CD44/ostéopontine dans la survie des cellules de myélome médiée par les OC (Abe et al, 2004), il serait donc intéressant d'expertiser l'importance de cette interaction dans notre modèle. Notre intérêt se porte également sur le rôle potentiel d'une interaction impliquant la protéine Gas6 dont l'ARNm est exprimé par les PC (De vos et al, 2006) et son ligand Tyro3 exprimé par les OC.

Cette perspective sera étendue à l'identification des interactions moléculaires responsables de la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire médiée par les CD et les macrophages.

## **E) Signaux de survie et prolifération des plasmoblastes et des plasmocytes et anomalies du Myélome Multiple**

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la survie et la prolifération des PB et PC normaux, il est logique de s'intéresser à la physiologie de leurs équivalents tumoraux, les cellules de MM.

De nombreux facteurs de l'environnement médullaire sont impliqués dans la survie et la prolifération des cellules de MM. Ces divers facteurs activent de nombreuses voies de signalisation entraînant la régulation de protéines impliquées dans la modulation des processus apoptotiques et du cycle cellulaire. Une représentation schématique de ces interactions entre cellules de MM et l'environnement médullaire est illustrée par la figure 27.

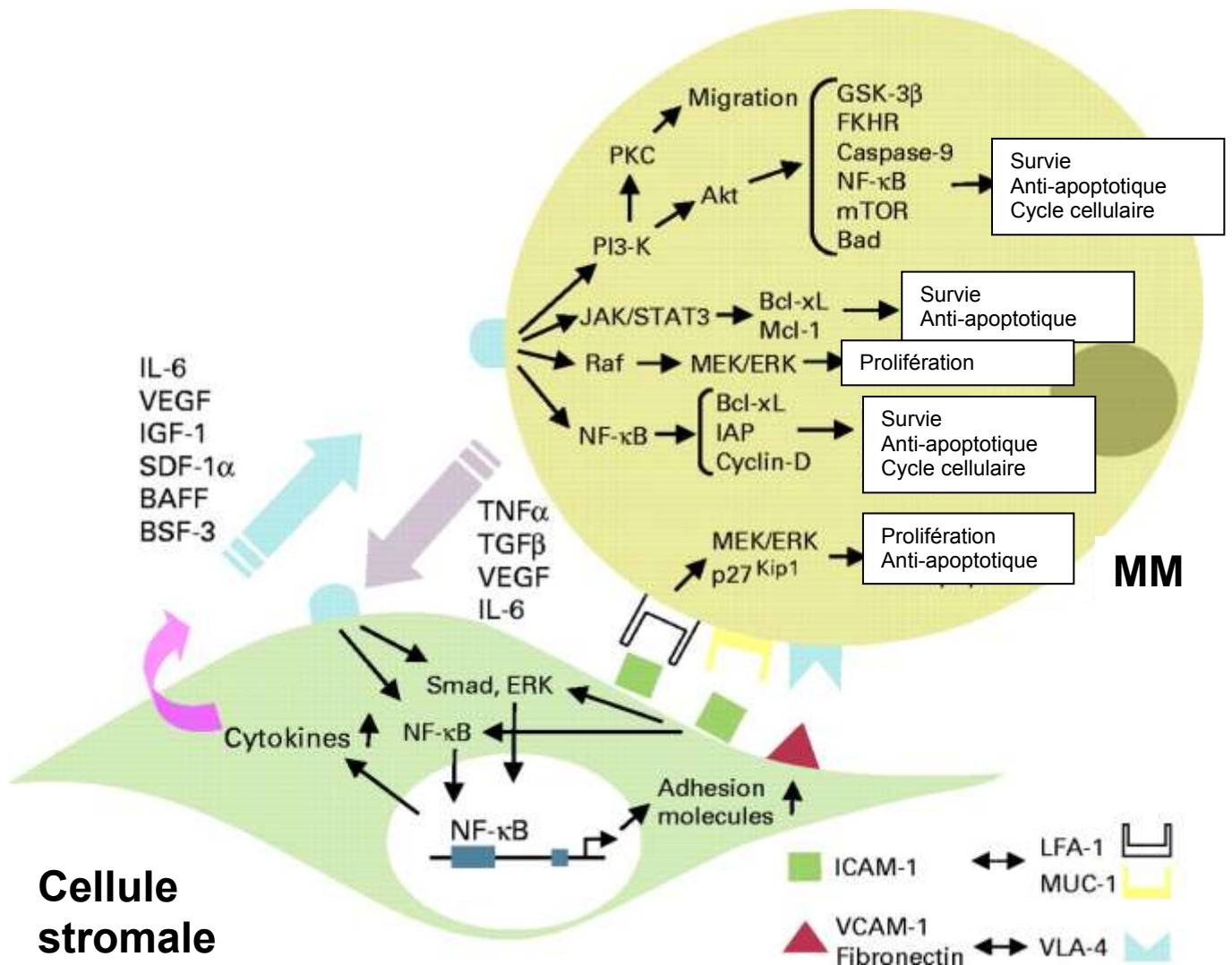
L'importance de ces facteurs et de ces voies de signalisation dans le développement d'une tumeur plasmocytaire les place comme des signaux potentiels de survie et de prolifération fournis par l'environnement médullaire aux cellules normales.

Je vais dans ce dernier paragraphe discuter l'intérêt qui doit être porté à ces facteurs et ces voies à la vue de mes résultats expérimentaux.

L'IL-6 reste bien évidemment un facteur de survie et de prolifération des PB mais son rôle dans la survie des PC n'est pas avéré dans le système de culture in vitro. A l'instar de l'IL-6, BAFF apparaît comme un facteur de survie des PB mais pas des PC dans notre système. Un rôle pour l'IGF-1 semble peu probable pour 2 raisons : 1) le récepteur à l'IGF-1 n'est pas détectable en cytométrie en flux sur les PB et PC normaux, 2) l'expression du CD45 sur les cellules normales devrait être néfaste à une signalisation via ce récepteur (Descamps et al, 2004 et 2006). Cependant pour répondre définitivement en faveur ou non d'un effet de ce facteur, il serait intéressant de déterminer si les voies de signalisation sont activées après une stimulation de ces cellules par l'IGF-1.

Mes résultats expérimentaux ne permettent pas d'émettre un avis sur les autres facteurs. Toutefois, il semble cohérent à la vue de mes données que l'activation de la voie NF $\kappa$ B est une caractéristique indispensable à la survie des PB et des PC normaux. En effet, l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface des PB et PC normaux est augmentée suite

au contact avec les OC. Comme nous l'avons vu, cette molécule d'adhésion n'est pas impliquée dans les signaux de survie fournis par les OC aux cellules plasmocytaires normales. En revanche, l'augmentation de son expression peut-être le reflet de l'activation de la voie NFκB. L'hypothèse d'une activation indispensable de cette voie est d'autant plus attractive lorsque l'on s'intéresse aux travaux de Annunziata et coll ainsi qu'à ceux de Keats et coll qui présentent des anomalies de cette voie dans les cellules de MM et indiquent que les PC médullaires normaux sont caractérisés par une activation importante de cette voie probablement dépendante de l'environnement (Annunziata et al, 2007 ; Keats et al, 2007).



**Figure 27 : Interactions entre cellules de MM et cellules stromales médullaires (d'après Hideshima et coll, 2005)**

**CARACTERISATION DE  
LYMPHOCYTES T ALLOGENIQUES  
SPECIFIQUES DES CELLULES DE  
MYELOME MULTIPLE**

## I) Immunothérapie : généralités

Le principe de l'immunothérapie est d'utiliser le système immunitaire pour éradiquer les cellules tumorales. Ce concept est né de la mise en évidence de réponses immunitaires anti-tumorales dans des modèles animaux puis chez l'homme.

L'existence de réponses anti-tumorales est le résultat de l'expression par les cellules tumorales d'Ag appelés Ag de rejet de tumeur. On peut distinguer différents types d'Ag de rejet de tumeur :

- 1) Les produits de gènes mutés, de gènes de fusion ou bien encore d'expression aberrante (intron, décalage du cadre de lecture). Ces modifications surviennent souvent au cours du processus d'oncogénèse. Ce type d'Ag est strictement spécifique de la tumeur voire de l'individu.
- 2) Les Ag cancer germline : cette catégorie comprend les protéines codées par des gènes qui sont exprimés dans les tissus embryonnaires mais silencieux dans tous les tissus adultes à l'exception possible des cellules germinales et trophoblastiques. Ces cellules n'expriment pas de molécule du CMH et ne peuvent donc pas présenter des peptides provenant de ces molécules.
- 3) Les Ag de différenciation : ils sont codés par des gènes qui ne sont exprimés que dans des types cellulaires particuliers. Les meilleurs exemples sont les Ag de différenciation exprimés dans les mélanocytes et les cellules tumorales équivalentes de mélanome, un certain nombre de ces Ag sont des protéines impliquées dans les voies de production de la mélanine.
- 4) Les Ag surexprimés : les cellules tumorales surexpriment ces Ag par rapport à leur équivalent normal.
- 5) Les molécules qui montrent des anomalies post-traductionnelles. La mucine peu glycosylée, MUC-1 en est un exemple.
- 6) Les Ag viraux. Les virus jouent un rôle important dans le développement de certains cancers, comme le papillomavirus dans le cancer du col utérin, les virus de l'hépatite dans l'hépatocarcinome ou encore le virus Epstein Barr dans certains types de lymphômes. Ces tumeurs expriment ce type d'Ag.

Il existe 3 stratégies de traitement par immunothérapie :

- 1) L'immunothérapie passive : Les patients sont traités par injection d'Ac (sérothérapie) qui reconnaissent de manière spécifique la tumeur. Plusieurs possibilités d'action des Ac sont envisagées pour aboutir à l'élimination de la tumeur. La fixation des Ac peut inhiber de manière directe la croissance tumorale, activer la voie du complément ou bien encore déclencher un phénomène d'ADCC (« Antigen dependent cellular cytotoxicity »).
- 2) L'immunothérapie active : L'objectif de cette stratégie est de stimuler la réaction immunitaire in vivo. Elle peut-être non sélective en utilisant une cytokine comme l'IL2 qui stimule tous les LT. Elle devient sélective si l'on stimule uniquement les lymphocytes impliqués dans la reconnaissance des cellules tumorales, c'est le principe de la vaccination.
- 3) L'immunothérapie adoptive : Elle consiste à apporter au patient des cellules immunologiquement compétentes activées ou sélectionnées ex vivo. C'est le cas des LT stimulés in vitro puis injectés aux patients.

## II) Intérêt d'un traitement par immunothérapie du Myélome Multiple

Le Myélome Multiple (MM) est une tumeur plasmocytaire localisée dans la MO, caractérisée par une sécrétion d'Ig monoclonale (Bataille et Harrousseau, 1997). Les principales manifestations de la maladie résultent de l'accumulation des plasmocytes malins dans la MO, entraînant :

- Un dysfonctionnement de la MO, essentiellement reflété par l'anémie. Une leucopénie et une thrombopénie peuvent également être observées, mais beaucoup plus rarement.
- Des lésions de l'os environnant.
- Une immuno-dépression, avec une susceptibilité accrue aux infections.

Le MM est la deuxième hémopathie mortelle dans le monde occidental après les lymphômes et devant les leucémies aiguës. En France, l'incidence du MM est de 5 nouveaux cas pour 100000 habitants et par an, représentant environ 1% de l'ensemble des cancers. Ainsi, environ 3500 nouveaux cas sont diagnostiqués en France chaque année. L'âge moyen de diagnostic est 69 ans. Cette maladie est rare, avant l'âge de 40 ans (moins de 2% des cas) et après 80 ans.

Le meilleur traitement pour les patients de moins de 65 ans (ce qui représente environ la moitié des malades) est une (voire 2) chimiothérapie intensive associée à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Attal et al, 1996). Une augmentation significative des doses de l'agent alkylant, le melphalan, a permis une augmentation du nombre et de la durée des rémissions (Moreau et al, 2002). Cependant, une nouvelle escalade des doses n'est pas envisageable compte tenu de la toxicité du melphalan. Les progrès thérapeutiques ne pourront donc venir que de nouveaux médicaments ou de nouveaux traitements. L'immunothérapie pourrait être un traitement complémentaire dans le Myélome car (1) les cellules de MM sont sensibles in vivo à la lyse des LT (Tricot et al, 1996 ; Orsini et al, 2003), (2) les cellules de MM expriment des gènes spécifiques de tumeur (Pellat-Deceunynck, 2003) et (3) des LT cytotoxiques envers les cellules de MM peuvent être isolés chez les patients (Pellat-Deceunynck, 1999 ; Wen et al, 2002 ; Hayashi et al, 2003).

### **III) Résultats**

Au laboratoire, afin d'envisager une immunothérapie du MM, une démarche d'identification d'Ag de tumeur exprimés par les cellules de MM et partagés par le plus de patients avait été entamée.

Trois approches classiques permettent l'identification d'Ag de tumeur :

- 1) Isoler des LT spécifiques des cellules tumorales, ici myélomateuses, afin d'identifier les Ag présentés. Cette technique est la seule qui permet d'identifier tous les types d'Ag de tumeur (Robbins et Kawakami, 1996 ; Boon et al, 1997 ; Renkvist et al, 2001).
- 2) Le criblage d'une banque procaryote d'expression tumorale par le sérum du patient (méthode SEREX). Cette technique permet l'identification d'Ag cibles ayant suscité l'apparition d'une réponse humorale chez les malades.
- 3) La recherche de l'expression dans les cellules tumorales d'Ag de tumeur déjà connus.

La première et la dernière approche avaient été développées. Les données qui suivent sont issues d'un travail commencé au laboratoire avant mon arrivée et de mes résultats expérimentaux, elles portent sur l'isolation et la caractérisation de LT allogéniques spécifiques du MM dans le cadre de cette démarche d'identification d'Ag spécifique du MM.

#### **A) Travaux préliminaires : isolement de lymphocytes T cytotoxiques envers les cellules de Myélome Multiple**

##### ***1) Isolement et caractérisation de lymphocytes T cytotoxiques autologues***

Un protocole initialement décrit pour sélectionner de rares LT dirigés contre des peptides du virus EBV (Smith et al, 1995) a été adapté pour permettre l'isolement de clones T cytotoxiques envers des cellules de MM autologues (Pellat-Deceunynck, 1999). Le projet a été initié à partir d'un patient particulier présentant un plasmocytome solitaire. Le patient avait une tumeur localisée successivement à différents sites extramédullaires, dont la peau, avant une atteinte pleurale. Une lignée (SBN) a été établie à partir de cet épanchement pleural



et le patient a été mis en rémission complète et durable (traitement par chimiothérapie). Ainsi 2 ans après l'obtention de la lignée, il a été possible d'obtenir les cellules mononucléées périphériques de ce même patient guéri de son MM. Deux clones ont été isolés et caractérisés, CT5 et CT6.

## ***2) Isolement de lymphocytes T cytotoxiques allogéniques***

Dans le MM, les cellules myélomateuses sont difficiles d'accès (localisation médullaire) et il reste exceptionnel de pouvoir les immortaliser, les rares cas (moins de 1% des cas) sont des rechutes extramédullaires le plus souvent sanguines et terminales, ce qui exclut d'obtenir des cellules mononucléées périphériques en nombre suffisant. Dans ce contexte, il a été exploré la possibilité d'isoler des LT allogéniques spécifiques de cellules myélomateuses. En effet, l'existence de ce type de LT était suggérée par des travaux sur l'étude des bases moléculaires de l'alloréactivité qui avaient mis en évidence l'existence d'une population qui présentait une reconnaissance spécifique d'un Ag dans un contexte CMH allogénique (Heath et al, 1991 ; Rotzschke et al, 1991). De plus, les équipes de Hans J. Stauss et Hans G. Rammense avaient généré des LT allogéniques spécifiques de tumeurs et présenté l'intérêt de leur utilisation pour le traitement par immunothérapie des tumeurs (Sadovnikova et stauss, 1996 ; Obst et al, 1998 ; Sadovnikova et al, 1998 ; Munz et al, 1999).

Pour quelques patients, nous disposons d'une lignée tumorale et nous avons établi une lignée autologue de lymphocytes B immortalisés par l'EBV. Dans un premier temps, la même lignée SBN a été utilisée comme cible. Les donneurs ont été choisis HLA-A2+. Des clones reconnaissant sélectivement la lignée tumorale SBN ont ainsi été isolés à partir des cellules mononucléées périphériques de 2 donneurs sains BA et HU.

Mon travail a consisté à caractériser les clones issus du donneur BA afin de découvrir par quel mécanisme moléculaire ils étaient capables de reconnaître les cellules de MM. Autrement dit, la spécificité de ces clones correspondait-elle à la reconnaissance d'un peptide issu d'un Ag de tumeur spécifique dans un contexte HLA allogénique ?

## **B) Caractérisation des clones du donneur BA : mécanismes de reconnaissance des cellules de Myélome Multiple**

Nous avons isolé (Article 2) six clones reconnaissant sélectivement la lignée tumorale SBN à partir des cellules mononucléées périphériques du donneur BA. Ces six clones exprimaient le CD8 et un TCR de type  $\alpha\beta$ . J'ai montré que parmi ces clones, 5 présentaient le même V $\beta$  (V $\beta$ 13.1). Sur cette base, il est apparu judicieux de sélectionner et d'utiliser pour la suite de l'étude un représentant de ces clones, BA-22.2, et le seul clone qui présentait un V $\beta$  différent (V $\beta$ 17), BA-61.4.

Nous avons mis en évidence que le mécanisme de reconnaissance de ces 2 clones était dépendant de la molécule HLA-Cw6. Cette conclusion s'appuyait sur deux observations. 1) la reconnaissance de la lignée SBN par ces clones était abrogée par un antisérum anti-HLA-Cw4/Cw6. 2) des expériences de cytotoxicité menées contre 7 lignées de MM disponibles au laboratoire ont mis en évidence que BA-22.2 et BA-61.4 reconnaissaient également BCN et XG6, deux lignées qui ont en commun le génotype Cw\*0602 avec SBN.

Notre objectif a dès lors été d'écarter l'hypothèse d'un mécanisme de reconnaissance directe de la molécule HLA-Cw6. Nous avons pour commencer éliminé le biais d'interprétation possible qui pouvait résulter de l'absence de reconnaissance d'une lignée unique (la lignée SBN-EBV). Pour ce faire, nous avons mis en évidence l'absence de réactivité des clones envers deux lignées B-EBV supplémentaires génotypées Cw\*0602, des cellules mononucléées périphériques de donneurs génotypés Cw\*0602 et des LT du patient SBN. Dans ce contexte, nous avons également mis en évidence que les clones ne reconnaissaient pas des lignées de mélanome HLA-Cw6+. Nous avons montré que la molécule HLA-Cw6 était exprimée par tout ce panel de cellules excluant l'éventualité d'une reconnaissance liée à un niveau d'expression du HLA-Cw6. Nous avons même noté une expression plus faible à la surface des cellules de MM. Enfin, nous avons exclu l'implication de récepteurs de type récepteur des cellules NK (NKCR) inhibiteurs (KIR) ou activateurs (KAR). En effet, nous n'avons pas écarté l'hypothèse d'une activation de la lyse des cellules de MM ou à l'inverse d'une inhibition de la lyse des autres types cellulaires résultant de la liaison de ce type de récepteurs à leur ligand. Nous avons montré que les clones n'exprimaient aucun des NKCR alors identifiés.

Les travaux de Lee et coll ont attiré notre attention. Les auteurs ont cocultivé des cellules mononucléées isolées à partir de la rate de souris B6 (génotype H.2b) avec des cellules mononucléées traitées à la mitomycin C isolées à partir de la rate de souris BALB/C (génotype H.2d). Ils ont obtenu des LT allogéniques qui montraient une activité cytotoxique significative envers un panel de types cellulaires H.2d+ indiquant que les mécanismes de reconnaissance de ces LT étaient dépendants de la molécule de CMH H.2d. Cependant, ils ont mis en évidence l'absence d'activité cytotoxique de ces LT envers un autre panel de types cellulaires H.2d+. Ils ont démontré que cette absence d'activité cytotoxique n'était pas corrélée à une absence de reconnaissance des cellules cibles. En effet, ils ont montré que l'activité cytotoxique des LT allogéniques envers les cellules du premier panel, mesurée lors d'un test de libération du chrome 51, était inhibée en présence d'un nombre croissant de cellules du second panel non marquées au chrome 51 (Lee et al, 2004). Par conséquent, nous avons examiné l'impact de la présence d'un nombre croissant de cellules des lignées SBN ou SBN-EBV sur la lyse des cellules de la lignée XG6 pour déterminer si les cellules résistantes à la lyse pouvaient tout de même être reconnues par nos clones T allogéniques. Les résultats montrent que la lyse des cellules de la lignée XG6 est inhibée en présence de cellules de la lignée SBN (>60%) mais pas en présence de cellules de la lignée SBN-EBV.

L'ensemble de ces données soutenait, dans l'état actuel de nos connaissances sur l'alloréactivité, l'hypothèse selon laquelle la spécificité de ces clones correspondait à la reconnaissance d'un peptide issu d'un Ag de tumeur spécifique dans le contexte HLA-Cw6.

Nous avons finalement montré que l'élution acide des peptides présentés sur les molécules de CMH à la surface des cellules de la lignée SBN inhibait leur lyse par les clones T.

## ARTICLE 2

### **Allogeneic T lymphocytes as a source of peptide-dependent T cells specific for myeloma cells.**

Geffroy-Luseau A, Moreau-Aubry A, Bataille R, Pellat-Deceunynck C.

*Int Immunol.*, 2005, 17:1193-200

## IV) Discussion-Conclusion

Le but global de cette approche était de définir s'il est possible, et relevant, d'isoler des lymphocytes spécifiques de tumeur à partir du sang de donneurs sains en cocultivant les cellules mononucléées périphériques contre la cellule tumorale allogénique irradiée. La lignée SBN a été utilisée comme cible. Le choix de donneurs HLA-A2+ offrait la possibilité d'isoler des lymphocytes reconnaissant un peptide présenté dans une molécule HLA partagée par la lignée SBN. Il était également possible d'isoler des lymphocytes reconnaissant un peptide présenté dans un contexte HLA allogénique.

Les lymphocytes alloréactifs ont été éliminés par leur réactivité contre la lignée SBN-EBV. Les clones présentant une reconnaissance spécifique de la tumeur se sont avérés peu fréquents (1-2% des CD8). En outre, les clones spécifiques ne présentaient pas un mécanisme de reconnaissance dépendant de la molécule HLA-A2. Cette donnée laisse penser que dans notre système, l'isolement de LT spécifiques de tumeur présentant un mécanisme de reconnaissance de la tumeur dépendant d'une molécule HLA allogénique est plus fréquent que l'isolement de LT spécifiques de tumeur présentant un mécanisme de reconnaissance dépendant d'une molécule HLA partagée par la tumeur. Cette conclusion s'accorde parfaitement avec les données des équipes de Hans J. Stauss et Hans G. Rammense. Ces données mettent en évidence qu'un contexte allogénique est plus favorable à l'isolement de LT spécifiques d'Ag de tumeur de type surexprimés qu'un contexte autologue. En effet, ce type de LT est délété dans le répertoire T autologue (Sadovnikova et stauss, 1996 ; Obst et al, 1998 ; Sadovnikova et al, 1998 ; Munz et al, 1999).

J'ai caractérisé deux clones distincts sur la base de l'expression de leur V $\beta$ , BA-22.2 (V $\beta$ 13.1+) et BA-61.4 (V $\beta$ 17+). Nous avons mis en évidence que le mécanisme de reconnaissance de la lignée SBN par ces deux clones T était dépendant de la molécule HLA-Cw6. Nous avons accumulé de nombreux arguments qui nous permettent d'exclure l'implication d'un mécanisme autre que la reconnaissance d'un peptide issu d'un Ag de tumeur présenté par la molécule HLA-Cw6.

- 1) Des types cellulaires différents mais ayant en commun le génotype Cw\*0602 ne sont pas reconnus : 3 lignées B-EBV, les cellules mononucléées périphériques de donneurs sains (n=2), des LT du patient SBN et 2 lignées de mélanome.

- 2) Toutes ces cellules expriment la molécule HLA-Cw6. Le niveau d'expression de cette molécule s'est même avéré plus faible sur les cellules de MM.
- 3) Les clones n'exprimaient aucun des NKCR alors identifiés.
- 4) La lyse des cellules de la lignée XG6 n'est pas inhibée par la présence de cellules de la lignée SBN-EBV.
- 5) L'éluion acide des peptides présentés sur les molécules de HLA à la surface des cellules de la lignée SBN inhibe leur lyse par les clones T.

Nous avons cherché à identifier le gène codant pour l'Ag reconnu par le clone BA-22.2 en criblant une banque d'expression de la lignée tumorale SBN établie au laboratoire. Les cellules COS-1 sont cotransfectées de manière transitoire par des pools de la banque et par la molécule HLA présentatrice. La banque est alors criblée en utilisant la sécrétion de TNF $\alpha$  du clone. De manière inattendue, il s'est avéré que le clone sécrétait du TNF $\alpha$  en présence des cellules COS-1 transfectées avec le plasmide contenant l'ADNc codant pour la molécule HLA-Cw6. Ce résultat est en contradiction avec les arguments que nous avons accumulés. Nous n'avons pas de données nous permettant de comprendre cette réactivité. Toutefois, il est important de noter que deux observations nous permettent de continuer à proposer la reconnaissance d'un peptide issu d'un Ag de tumeur présenté par la molécule HLA-Cw6. 1) Le clone autologue CT6 présente le même type de réaction avec la molécule HLA-A2. 2) Des Ag communs peuvent être exprimés par les cellules de MM et les tumeurs du rein (cellules COS-1), par exemple, syndecan-1.

Une technique alternative pour nous permettre d'identifier l'Ag reconnu par le clone BA-22.2 serait de procéder à l'éluion puis au fractionnement par HPLC («high-performance liquid chromatography») des peptides présentés sur les molécules de CMH à la surface des cellules de la lignée SBN. Un criblage serait réalisé en utilisant la cytotoxicité du clone envers des cellules T2 chargées avec les différentes fractions peptidiques. Cette technique nécessite une quantité très importante de cellules pour réaliser l'éluion peptidique. Des travaux récents indiquent un nombre de  $8 \times 10^{10}$  cellules (van Bergen et al, 2007). Il est difficile d'obtenir ce nombre de cellules mais nous pouvons le faire en congelant régulièrement des ampoules contenant plusieurs millions de cellules.

L'identification de l'Ag de tumeur reconnu nous permettrait de valider l'approche que nous avons menée (reconnaissance sélective tumeur/lymphocytes B-EBV) pour isoler des LT

allogéniques spécifiques de tumeur. De manière plus générale, nous apporterions la preuve définitive de l'existence parmi des LT de donneurs sains de LT spécifiques de MM qui pourraient in vivo détruire exclusivement les cellules de MM. La sélection de ce type de LT serait d'un grand intérêt dans le cadre d'un traitement par immunothérapie adoptive des patients atteints de MM. Elle présenterait en particulier l'avantage de se dégager de la nécessité de générer des LT spécifiques de tumeur à partir de chaque patient.

Une autre perspective pour valider l'existence de ce type de lymphocytes serait d'isoler et de caractériser les lymphocytes responsables de l'effet GVM (« Graft-versus-myeloma ») chez les patients atteints de MM ayant bénéficié d'une mini-allogreffe de MO (Orsini et al, 2003).

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Shioyasono, A., Moriyama, K., Hashimoto, T., Kido, S., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., *et al.* (2004). Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood* *104*, 2484-2491.
- Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I., and Busslinger, M. (1992). Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* *6*, 1589-1607.
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R. R., Selvaggi, T., Kehry, M. R., and Staudt, L. M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* *87*, 5257-5268.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K. I., and Calame, K. (2000). Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* *165*, 5462-5471.
- Annunziata, Davis, Demchenko, Bellamy, Gabrea, Zhan, Lenz, Hanamura, Wright, Xiao, Dave, Hurt, Tan, Zhao, Stephens, Santra, Williams, Dang, Barlogie, Shaughnessy, Kuehl, Staudt (2007). Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* *12*, 115-130
- Arpin, C., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. *J Exp Med* *186*, 931-940.
- Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* *268*, 720-722.
- Attal, M., Harousseau, J. L., Stoppa, A. M., Sotto, J. J., Fuzibet, J. G., Rossi, J. F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., *et al.* (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* *335*, 91-97.
- Avery, D. T., Ellyard, J. I., Mackay, F., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2005). Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *J Immunol* *174*, 4034-4042.
- Avery, D. T., Kalled, S. L., Ellyard, J. I., Ambrose, C., Bixler, S. A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* *112*, 286-297.
- Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341-352.
- Bataille, R., and Harousseau, J. L. (1997). Multiple myeloma. *N Engl J Med* *336*, 1657-1664.
- Bernasconi, N. L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* *298*, 2199-2202.
- Blink, E. J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., and Tarlinton, D. M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* *201*, 545-554.

- Boon, T., Coulie, P. G., and Van den Eynde, B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* *18*, 267-268.
- Bradley, J. R., Thiru, S., and Pober, J. S. (1995). Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am J Pathol* *146*, 27-32.
- Calame, K. L., Lin, K. I., and Tunyaplin, C. (2003). Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 205-230.
- Cassese, G., Arce, S., Hauser, A. E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R. A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* *171*, 1684-1690.
- Cassese, G., Lindenau, S., de Boer, B., Arce, S., Hauser, A., Riemekasten, G., Berek, C., Hiepe, F., Krenn, V., Radbruch, A., and Manz, R. A. (2001). Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *Eur J Immunol* *31*, 2726-2732.
- Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* *86*, 45-53.
- Chen-Kiang, S. (2003). Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev* *194*, 39-47.
- Cyster, J. G. (2003). Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* *194*, 48-60.
- De Vos, J., Hose, D., Reme, T., Tarte, K., Moreaux, J., Mahtouk, K., Jourdan, M., Goldschmidt, H., Rossi, J. F., Cremer, F. W., and Klein, B. (2006). Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunol Rev* *210*, 86-104.
- Descamps, Wuillème-Toumi, Trichet, Venot, Debussche, Hercend, Collette, Robillard, Bataille, Amiot (2006). CD45neg but Not CD45pos Human Myeloma Cells Are Sensitive to the Inhibition of IGF-1 Signaling by a Murine Anti-IGF-1R Monoclonal Antibody, mAVE1642. *J. Immunol.* *177*, 4218 - 4223.
- Descamps, Pellat-Deceunynck, Szpak, Bataille, Robillard, Amiot (2004) The Magnitude of Akt/Phosphatidylinositol 3'-Kinase Proliferating Signaling Is Related to CD45 Expression in Human Myeloma Cells *J. Immunol.* *173*, 4953 - 4959.
- Dechanet, J., Merville, P., Durand, I., Banchereau, J., and Miossec, P. (1995). The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* *95*, 456-463.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* *24*, 269-281.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* *276*, 589-592.

- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.
- Do, R. K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M. R., Hilbert, D., and Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med* 192, 953-964.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Briere, F., Banchereau, J., and Caux, C. (1997). Human dendritic/Langerhans cells control growth and differentiation of CD40 activated B cells. *Adv Exp Med Biol* 417, 329-334.
- Ellyard, J. I., Avery, D. T., Mackay, C. R., and Tangye, S. G. (2005). Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol* 35, 699-708.
- Ellyard, J. I., Avery, D. T., Phan, T. G., Hare, N. J., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2004). Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood* 103, 3805-3812.
- Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini, R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., *et al.* (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 95, 2084-2092.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirosawa, S., Taniguchi, M., *et al.* (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186, 439-448.
- Garcia de Vinuesa, C., O'Leary, P., Sze, D. M., Toellner, K. M., and MacLennan, I. C. (1999a). 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.
- Garcia De Vinuesa, C., Gulbranson-Judge, A., Khan, M., O'Leary, P., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G. G., Owen, M. J., and MacLennan, I. C. (1999b). Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol* 29, 3712-3721.
- Gonzalez-Garcia, I., Ocana, E., Jimenez-Gomez, G., Campos-Caro, A., and Brieva, J. A. (2006). Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *J Immunol* 176, 4042-4050.
- Gras, M. P., Laabi, Y., Linares-Cruz, G., Blondel, M. O., Rigaut, J. P., Brouet, J. C., Leca, G., Haguenaer-Tsapis, R., and Tsapis, A. (1995). BCMAP: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *Int Immunol* 7, 1093-1106.

- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* *189*, 451-460.
- 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.
- Hauser, A. E., Debes, G. F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R. A. (2002). Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* *169*, 1277-1282.
- Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Raje, N., Richardson, P., Chauhan, D., and Anderson, K. C. (2003). Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* *102*, 1435-1442.
- Heath, W. R., Kane, K. P., Mescher, M. F., and Sherman, L. A. (1991). Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5101-5105.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* *14*, 779-790.
- Ingold, K., Zumsteg, A., Tardivel, A., Huard, B., Steiner, Q. G., Cachero, T. G., Qiang, F., Gorelik, L., Kalled, S. L., Acha-Orbea, H., *et al.* (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* *201*, 1375-1383.
- Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* *173*, 1165-1175.
- Jahrsdorfer, B., Muhlenhoff, L., Blackwell, S. E., Wagner, M., Poeck, H., Hartmann, E., Jox, R., Giese, T., Emmerich, B., Endres, S., *et al.* (2005). B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* *11*, 1490-1499.
- Jego, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (2001). Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* *97*, 1817-1822.
- Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* *94*, 701-712.
- Jelinek, D. F., and Lipsky, P. E. (1983). The role of B cell proliferation in the generation of immunoglobulin-secreting cells in man. *J Immunol* *130*, 2597-2604.
- Jones, S. J., Ledgerwood, E. C., Prins, J. B., Galbraith, J., Johnson, D. R., Pober, J. S., and Bradley, J. R. (1999). TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the

principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* *162*, 1042-1048.

Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., Lew, A. M., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., and Nutt, S. L. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* *26*, 555-566.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D. M., Dietrich, W., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., and Nutt, S. L. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* *200*, 967-977.

Kawano, M. M., Mihara, K., Huang, N., Tsujimoto, T., and Kuramoto, A. (1995). Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* *85*, 487-494.

Keats, Fonseca, Chesi, Schop, Baker, Chng, Van Wier, Tiedemann, Shi, Sebag, Braggio, Henry, Zhu, Fogle, Price-Troska, Ahmann, Mancini, Brents, Kumar, Greipp, Dispenzieri, Bryant, Mulligan, Bruhn, Barret, Valdez, Trent, Stewart, Carpten, Bergsagel (2007). Promiscuous Mutations Activate the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* *12*, 131-144.

Khare, S. D., Sarosi, I., Xia, X. Z., McCabe, S., Miner, K., Solovyev, I., Hawkins, N., Kelley, M., Chang, D., Van, G., *et al.* (2000). Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3370-3375.

Kim, H. J., Krenn, V., Steinhäuser, G., and Berek, C. (1999). Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol* *162*, 3053-3062.

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* *7*, 773-782.

Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* *12*, 2662-2672.

Kukreja, A., Hutchinson, A., Dhodapkar, K., Mazumder, A., Vesole, D., Angitapalli, R., Jagannath, S., and Dhodapkar, M. V. (2006). Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med* *203*, 1859-1865.

Kunkel, E. J., Kim, C. H., Lazarus, N. H., Vierra, M. A., Soler, D., Bowman, E. P., and Butcher, E. C. (2003). CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* *111*, 1001-1010.

Lacy-Hulbert, A., and Moore, K. J. (2006). Designer macrophages: oxidative metabolism fuels inflammation repair. *Cell Metab* *4*, 7-8.

Lee, K., Takenaka, H., Yoneda, Y., Goto, T., Sano, K., Nakanishi, M., Eguchi, A., Okada, M., Tashiro, J., Sakurai, K., *et al.* (2004). Differential susceptibility of cells expressing allogeneic MHC or viral antigen to killing by antigen-specific CTL. *Microbiol Immunol* *48*, 15-25.

Lin, K. I., Lin, Y., and Calame, K. (2000). Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. *Mol Cell Biol* *20*, 8684-8695.

- Lin, K. I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 22, 4771-4780.
- Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J. L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190, 1697-1710.
- Manz, R. A., Hauser, A. E., Hiepe, F., and Radbruch, A. (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23, 367-386.
- Manz, R. A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133-134.
- Matsuyama, T., Grossman, A., Mittrucker, H. W., Siderovski, D. P., Kiefer, F., Kawakami, T., Richardson, C. D., Taniguchi, T., Yoshinaga, S. K., and Mak, T. W. (1995). Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE). *Nucleic Acids Res* 23, 2127-2136.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I., and Brieva, J. A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99, 2154-2161.
- Medina, F., Segundo, C., Rodriguez, C., and Brieva, J. A. (1997). Regulatory role of CD95 ligation on human B cells induced in vivo capable of spontaneous and high-rate Ig secretion. *Eur J Immunol* 27, 700-706.
- Merville, P., Dechanet, J., Desmouliere, A., Durand, I., de Bouteiller, O., Garrone, P., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1996). Bcl-2+ tonsillar plasma cells are rescued from apoptosis by bone marrow fibroblasts. *J Exp Med* 183, 227-236.
- Minges Wols, H. A., Underhill, G. H., Kansas, G. S., and Witte, P. L. (2002). The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol* 169, 4213-4221.
- Mittrucker, H. W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T. M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P. S., and Mak, T. W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540-543.
- Moreau, P., Facon, T., Attal, M., Hulin, C., Michallet, M., Maloisel, F., Sotto, J. J., Guilhot, F., Marit, G., Doyen, C., *et al.* (2002). Comparison of 200 mg/m<sup>2</sup> melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m<sup>2</sup> melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myelome 9502 randomized trial. *Blood* 99, 731-735.
- Moreaux, J., Cremer, F. W., Reme, T., Raab, M., Mahtouk, K., Kaukel, P., Pantescio, V., De Vos, J., Jourdan, E., Jauch, A., *et al.* (2005). The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood*

106, 1021-1030.

Munz, C., Obst, R., Osen, W., Stevanovic, S., and Rammensee, H. G. (1999). Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. *J Immunol* 162, 25-34.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.

O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., Lin, L. L., Mantchev, G. T., Bram, R. J., and Noelle, R. J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.

Obst, R., Munz, C., Stevanovic, S., and Rammensee, H. G. (1998). Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 28, 2432-2443.

Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B. F., Jacobi, A. M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A., and Dorner, T. (2005). Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105, 1614-1621.

Orsini, E., Bellucci, R., Alyea, E. P., Schlossman, R., Canning, C., McLaughlin, S., Ghia, P., Anderson, K. C., and Ritz, J. (2003). Expansion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones in patients with relapsed myeloma after donor lymphocyte infusion. *Cancer Res* 63, 2561-2568.

Pellat-Deceunynck, C. (2003). Tumour-associated antigens in multiple myeloma. *Br J Haematol* 120, 3-9.

Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., Robillard, N., Harousseau, J. L., Rapp, M. J., Juge-Morineau, N., Wijdenes, J., and Amiot, M. (1994). Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 84, 2597-2603.

Pellat-Deceunynck, C., Jegou, G., Harousseau, J. L., Vie, H., and Bataille, R. (1999). Isolation of human lymphocyte antigens class I-restricted cytotoxic T lymphocytes against autologous myeloma cells. *Clin Cancer Res* 5, 705-709.

Pelletier, N., Casamayor-Palleja, M., De Luca, K., Mondiere, P., Saltel, F., Jurdic, P., Bella, C., Genestier, L., and Defrance, T. (2006). The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway. *J Immunol* 176, 1340-1347.

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

Randall, T. D., Heath, A. W., Santos-Argumedo, L., Howard, M. C., Weissman, I. L., and Lund, F. E. (1998). Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 8, 733-742.

Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J. G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94-

Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., and Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* *412*, 300-307.

Reimold, A. M., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., David, C. S., Strominger, J. L., and Glimcher, L. H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* *183*, 393-401.

Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J., and Fearon, D. T. (2000). Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* *192*, 1841-1848.

Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., and Parmiani, G. (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* *50*, 3-15.

Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Rabourdin-Combe, C., Jurdic, P., and Servet-Delprat, C. (2004). Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* *104*, 4029-4037.

Robbins, P. F., and Kawakami, Y. (1996). Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* *8*, 628-636.

Roldan, E., Garcia-Pardo, A., and Brieva, J. A. (1992). VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med* *175*, 1739-1747.

Rotzschke, O., Falk, K., Faath, S., and Rammensee, H. G. (1991). On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med* *174*, 1059-1071.

Sadovnikova, E., Jopling, L. A., Soo, K. S., and Stauss, H. J. (1998). Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* *28*, 193-200.

Sadovnikova, E., and Stauss, H. J. (1996). Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13114-13118.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* *28*, 2760-2769.

Sanderson, R. D., Lalor, P., and Bernfield, M. (1989). B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* *1*, 27-35.

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., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607-620.
- Skibinski, G., Skibinska, A., Stewart, G. D., and James, K. (1998). Enhancement of terminal B lymphocyte differentiation in vitro by fibroblast-like stromal cells from human spleen. *Eur J Immunol* 28, 3940-3948.
- Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8, 363-372.
- Smith, C. A., Ng, C. Y., Heslop, H. E., Holladay, M. S., Richardson, S., Turner, E. V., Loftin, S. K., Li, C., Brenner, M. K., and Rooney, C. M. (1995). Production of genetically modified Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive transfer to patients at high risk of EBV-associated lymphoproliferative disease. *J Hematother* 4, 73-79.
- Smith, K. G., Hewitson, T. D., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 26, 444-448.
- Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. (1997). The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo J* 16, 2996-3006.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.
- Sze, D. M., Toellner, K. M., Garcia de Vinuesa, C., Taylor, D. R., and MacLennan, I. C. (2000). Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192, 813-821.
- Tai, Y. T., Li, X. F., Breitkreutz, I., Song, W., Neri, P., Catley, L., Podar, K., Hideshima, T., Chauhan, D., Raje, N., *et al.* (2006). Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res* 66, 6675-6682.
- Tangye, S. G., Avery, D. T., and Hodgkin, P. D. (2003). A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol* 170, 261-269.
- Terstappen, L. W., Johnsen, S., Segers-Nolten, I. M., and Loken, M. R. (1990). Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76, 1739-1747.

- 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.
- Toyosaki-Maeda, T., Takano, H., Tomita, T., Tsuruta, Y., Maeda-Tanimura, M., Shimaoka, Y., Takahashi, T., Itoh, T., Suzuki, R., and Ochi, T. (2001). Differentiation of monocytes into multinucleated giant bone-resorbing cells: two-step differentiation induced by nurse-like cells and cytokines. *Arthritis Res* 3, 306-310.
- Tricot, G., Vesole, D. H., Jagannath, S., Hilton, J., Munshi, N., and Barlogie, B. (1996). Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 87, 1196-1198.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A. L., Angelin-Duclos, C. D., Yu, X., Staudt, L. M., and Calame, K. L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158-1165.
- Turner, C. A., Jr., Mack, D. H., and Davis, M. M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
- Ursini-Siegel, J., Zhang, W., Altmeyer, A., Hatada, E. N., Do, R. K., Yagita, H., and Chen-Kiang, S. (2002). TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J Immunol* 169, 5505-5513.
- van Bergen, C. A., Kester, M. G., Jedema, I., Heemskerk, M. H., van Luxemburg-Heijs, S. A., Kloosterboer, F. M., Marijt, W. A., de Ru, A. H., Schaafsma, M. R., Willemze, R., *et al.* (2007). Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood* 109, 4089-4096.
- Vasanwala, F. H., Kusam, S., Toney, L. M., and Dent, A. L. (2002). Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *J Immunol* 169, 1922-1929.
- 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.
- Warren, T. L., and Weiner, G. J. (2002). Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 29, 93-97.
- Wen, Y. J., Min, R., Tricot, G., Barlogie, B., and Yi, Q. (2002). Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 99, 3280-3285.
- Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clement, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., and Dore, J. M. (1996). A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94, 318-323.
- Withers, D. R., Fiorini, C., Fischer, R. T., Ettinger, R., Lipsky, P. E., and Grammer, A. C. (2007). T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood* 109, 4856-4864.

- Wright, L. M., Maloney, W., Yu, X., Kindle, L., Collin-Osdoby, P., and Osdoby, P. (2005). Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 36, 840-853.
- Xiang, Z., Cutler, A. J., Brownlie, R. J., Fairfax, K., Lawlor, K. E., Severinson, E., Walker, E. U., Manz, R. A., Tarlinton, D. M., and Smith, K. G. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8, 419-429.
- Yaccoby, S., Wezeman, M. J., Henderson, A., Cottler-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B., and Epstein, J. (2004). Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res* 64, 2016-2023.
- Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* 161, 3096-3102.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16, 161-170.
- Zannettino, A. C., Farrugia, A. N., Kortesisidis, A., Manavis, J., To, L. B., Martin, S. K., Diamond, P., Tamamura, H., Lapidot, T., Fujii, N., and Gronthos, S. (2005). Elevated serum levels of stromal-derived factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 65, 1700-1709.

# ANNEXE 1

**Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors.**

Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C.

*Leukemia*, 2006, 20:1130-7

## **ANNEXE 2**

**Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells.**

Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, Daniels S, Moreau P, Le Gouill S, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M, Pellat-Deceunynck C.

*Blood*, 2006, 108:1346-52.

## **REGULATION DE LA MORT ET SURVIE DES PLASMOCYTES HUMAINS NORMAUX ET DE LEURS EQUIVALENTS TUMORAUX, LES CELLULES DE MYELOME MULTIPLE.**

Résumé: Les plasmocytes (PC) représentent le stade terminal de différenciation des lymphocytes B activés suite à leur rencontre avec un antigène. Le processus de différenciation plasmocytaire est associé à une apoptose massive des cellules. Par ce biais, in vivo, l'homéostasie du compartiment plasmocytaire est maintenue. Le but de ce travail a été de progresser dans la compréhension des mécanismes qui régissent l'apoptose et la survie des cellules engagées dans le processus de différenciation plasmocytaire. Nous montrons que dès les stades précoces de la différenciation plasmocytaire, les cellules (pré-plasmoblastes) sont engagées dans le processus apoptotique avec une activation des caspases effectrices (caspase-3 et -6) associée au clivage de Mcl-1, une forte diminution de Bcl2 et une augmentation de l'isoforme EL de Bim. En outre, ces cellules sont sensibles aux signaux de mort induits par l'activation du récepteur de mort Fas mais résistantes à l'activation des récepteurs de mort à TRAIL, DR4 et DR5. Nous mettons en évidence que les cellules dérivées des monocytes (ostéoclastes (OC), cellules dendritiques (CD) et macrophages) présentent une capacité à prévenir l'apoptose spontanée de ces cellules. Toutefois, les OC paraissent capables de fournir aux PC et à ses précurseurs des signaux de survie de manière plus efficace que les macrophages tandis que les CD semblent fournir de tels signaux uniquement aux plasmoblastes. Les PC persistants au contact des OC présentent des caractéristiques phénotypiques qui évoquent le prototype du PC mature suggérant que les OC pourraient participer à la niche de survie des PC dits à longue durée de vie dans la moelle osseuse.

Mots clés : plasmocytes, différenciation, Myélome Multiple

## **DEATH REGULATION AND SURVIVAL OF HUMAN NORMAL PLASMA CELL : APPLICATION TO MULTIPLE MYELOMA**

Abstract: Plasma cells are terminally differentiated final effectors of the humoral response. Plasma cell differentiation is characterized by extensive apoptosis. By this way, plasma cell homeostasis is maintained in vivo. The aim of this study was to improve our knowledge about mechanisms underlying cell survival and apoptosis during plasma cell differentiation. We show that as early as proplasmablast stage in the time course of plasma cell differentiation, cells have entered in apoptotic process characterized by effector caspase activation (caspase-3 and -6), Mcl-1 cleavage, a marked decrease of Bcl-2 and increase of Bim EL isoform. Moreover, these cells are susceptible to Fas-mediated apoptosis but resistant to TRAIL-receptor-mediated apoptosis. We demonstrated that osteoclasts, macrophages and dendritic cells, all of monocyte origin, are able to support cell survival during plasma cell differentiation. However, osteoclasts were more potent than macrophages to support the survival of plasma cells whereas dendritic cells mediated survival of plasmablasts only. Surviving plasma cells on osteoclasts displayed phenotypic features of fully differentiated plasma cells suggesting that osteoclasts could take part to the putative bone marrow niche of plasma cells.

Key words: plasma cell, differentiation, Multiple Myeloma