Université de Montréal

Compréhension et amélioration de la présentation antigénique par les lymphocytes B, une source alternative de cellules présentatrices d'antigènes

Par

David Possamaï

Département de Médecine, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Sciences biomédicales, option Générale

Octobre 2020

© David Possamaï, 2020

Université de Montréal

Département de Médecine, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Compréhension et amélioration de la présentation antigénique par les lymphocytes B, une source alternative de cellules présentatrices d'antigènes

Présentée par

David Possamaï

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Jean-François Gauchat
Président-rapporteur

Dr Réjean Lapointe
Directeur de recherche

Dre Mélanie Dieudé
Membre du jury

Dr Alain Lamarre
Examinateur externe

Dre Sylvie Lesage
Représentante du Doyen

Résumé

Les lymphocytes B jouent un rôle central dans l'immunité humorale par leur capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T, à sécréter des cytokines et à se différencier en plasmocytes produisant des anticorps. Ces fonctions peuvent être induites par leur stimulation *in vitro*. Par leur aptitude à présenter des antigènes indépendamment de la spécificité du récepteur des lymphocytes B (BCR), les lymphocytes B peuvent être utilisés comme cellules présentatrices d'antigènes (*antigen-presenting cells*, APC) afin d'induire la réponse cellulaire des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques spécifiques. L'immunité cellulaire est cruciale pour prévenir les infections contre certains virus et en immunothérapie du cancer. L'objectif général de ces travaux est d'étudier la biologie des lymphocytes B. Plus particulièrement, nous souhaitons comprendre et améliorer leur fonction de présentation d'antigène afin d'utiliser les lymphocytes B comme source alternative d'APC.

Dans la première partie de ces travaux, notre attention s'est portée sur la compréhension du mécanisme de présentation croisée par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) par lequel un épitope de la protéine gp100 du mélanome, inséré dans une nanoparticule pseudo-virale (VLP) composée de la protéine de surface du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV), est présenté par les lymphocytes B. Cette VLP est une plateforme vaccinale capable de stimuler le système immunitaire sans l'aide d'adjuvant et facilite la présentation croisée de l'épitope inséré, de façon indépendante de l'activité du protéasome. Les résultats obtenus démontrent que l'apprêtement de l'épitope inséré dans la nanoparticule s'effectue selon une voie de présentation croisée vacuolaire qui dépend de l'activité de la cathepsine S, de l'acidification des lysosomes et requiert l'induction de l'autophagie. Ainsi, nous avons défini plus précisément le mécanisme de présentation croisée par lequel les lymphocytes B apprêtent et présentent un épitope inséré dans la VLP de PapMV.

Par la suite, nous avons cherché à améliorer le protocole d'activation *in vitro* permettant d'amplifier et d'induire les fonctions de présentation d'antigènes des lymphocytes B, dans le but d'utiliser ces cellules pour activer les réponses cellulaires des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques.

Les stimulations *in vitro* des lymphocytes B par le CD40 ligand (CD40L) et l'interleukine (IL)-21 ou la combinaison de l'IL-4 et l'IL-21 au lieu de l'activation standard avec le CD40L et l'IL-4 ont été évaluées. Nos résultats ont approfondi nos connaissances de la biologie des lymphocytes B. Nous avons démontré que la stimulation des lymphocytes B avec le CD40L et l'IL-21 augmente leur prolifération, mais mène à leur différenciation en plasmocytes sécrétant des anticorps. Au contraire, la stimulation avec le CD40L et l'IL-4 induit efficacement leur fonction de présentation d'antigènes. La stimulation des lymphocytes B avec le CD40L et la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 augmente leur prolifération, mène seulement faiblement à leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps, mais induit efficacement leur fonction de présentation d'antigènes. Nous avons démontré pour la première fois que cette méthode permet de générer des APC puissantes capables d'induire la réponse des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques *in vitro*. Nos résultats nous permettent de postuler que ces cellules pourraient être capables de mener à une réponse cellulaire *in vivo*. En tant qu'APC efficaces, les lymphocytes B pourraient être utilisés dans une stratégie vaccinale ou être employés comme APC afin d'améliorer les traitements d'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de lymphocytes T.

Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse ont porté tant sur la compréhension des mécanismes de présentation croisée d'un épitope inséré dans la VLP de PapMV par les lymphocytes B, que sur l'amélioration de la méthode permettant d'induire leur fonction de présentation d'antigènes pour activer les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques. Ces travaux de recherche fondamentale ont permis de contribuer à des avancées sur les connaissances de la biologie des lymphocytes B. Ils offrent de nouvelles pistes de réflexion quant aux utilisations biotechnologiques des lymphocytes B comme source alternative d'APC pour des applications de recherche fondamentale et clinique telles que la vaccination et les traitements d'immunothérapie du cancer.

Mots-clés : Lymphocytes B, présentation antigénique, présentation croisée vacuolaire, particules pseudo-virales, cellules CD40-B, CD40, interleukine-4, interleukine-21, activation des lymphocytes T, plateforme vaccinale.

Abstract

B lymphocytes are central to humoral immunity due to their ability to present antigens to T cells, secrete cytokines and to differentiate into antibody-producing plasma cells. These functions can be induced by their *in vitro* stimulation. Being able to present antigens independently of the specificity of their B cell receptor (BCR), B cells can be used as antigen-presenting cells (APC) to induce specific cytotoxic $CD8^+$ T cell cellular responses. Cellular immunity is crucial to prevent infections against viruses and in cancer immunotherapy. The main aim of this thesis is to study B cell biology. Specifically, we aim to deepen our understanding of their antigen presentation function and improve this function to use B cells as an alternative source of APC.

First, we focused on deciphering the class I major histocompatibility complex (MHC-I) cross-presentation mechanism by which an epitope from gp100 melanoma protein, inserted in a virus-like particle (VLP) made of the coat protein of the papaya mosaic virus (PapMV), is presented by B cells. This VLP is a vaccine platform able to stimulate the immune system with no adjuvant and mediate a proteasome independent cross-presentation of the inserted epitope. Our results show that the inserted epitope is processed through a vacuolar pathway dependent on cathepsin S activity, lysosome acidification and requires the induction of autophagy. Thus, we provide a more detailed characterization of the mechanism used by B cells to process and cross-present an epitope inserted in PapMV VLP.

Secondly, we aimed to improve the *in vitro* activation protocol used to expand B cells and induce their antigen presentation functions to use these cells to trigger cytotoxic $CD8^+$ T cell cellular responses. We evaluated the *in vitro* stimulation of B cells with CD40 ligand (CD40L) and interleukin (IL)-21 or the combination of IL-4 and IL-21 instead of the standard activation method based on CD40L and IL-4. Our results deepen our knowledge of B cell biology. We showed that stimulating B cells with CD40L and IL-21 increases their proliferation but leads to their differentiation in antibody-producing plasma cells. In comparison, the stimulation with CD40L and IL-4 efficiently induces their antigen presentation function. The stimulation of B lymphocytes with

CD40L and the combination of IL-4 and IL-21 increases their proliferation, weakly leads to their differentiation in antibody-secreting cells but is very efficient in inducing their antigen presentation function. We show for the first time that this method can generate potent APC able to induce cytotoxic $CD8^+$ T cell responses *in vitro*. Our results allow us to hypothesize that these cells could be capable of triggering cellular immunity *in vivo*. As efficient APC, B cells could be used in a vaccination strategy or be employed as APC to improve cancer immunotherapy treatments such as adoptive cell transfer of T lymphocytes.

Thus, the work presented in this thesis provides a deeper understanding of the antigen cross-presentation pathway by which B cells process and present an epitope inserted in PapMV VLP. It also reports an improved method to induce antigen presentation function of B cells to stimulate cytotoxic $CD8^+$ T cells. This research work constitutes a leap forward in fundamental B cell research by increasing our knowledge of B cell biology. It also brings new opportunities regarding biotechnological uses of B cells as an alternative source of APC for fundamental and clinical applications such as vaccination and cancer immunotherapy treatments.

Keywords: B cells, antigen presentation, vacuolar cross-presentation pathway, viral-like particles, CD40-B cells, CD40, interleukin-4, interleukin-21, T cell activation, vaccine platform.

Table des matières

Résumé 5

Abstract 7

Table des matières 9

Liste des tableaux 15

Liste des figures 17

Liste des abréviations 21

Remerciements 29

Chapitre 1 – Introduction 31

Objectif général et structure de la thèse 31

L'immunité 31

L'immunité adaptative humorale 32

Les lymphocytes B non conventionnels de la lignée B-1 33

L'ontogenèse des lymphocytes B conventionnels de la lignée B-2 34

L'induction de la réponse humorale 36

L'activation des lymphocytes B et l'internalisation des antigènes 36

La rencontre entre les lymphocytes B et les lymphocytes T 37

Les centres germinatifs 40

La zone sombre 40

La zone claire 41

Les destins cellulaires des lymphocytes B des centres germinatifs 42

Les interactions synaptiques entre les lymphocytes B et T_{FH} 43

Les molécules d'adhérence et de costimulation 44

L'interaction entre le récepteur CD40 et le CD40L 44
La sécrétion de cytokines par les lymphocytes T_{FH} 46
L'interleukine-4 47
L'interleukine-21 48
Les interactions entre les lymphocytes B et les lymphocytes T non conventionnels 50
Les fonctions alternatives des lymphocytes B 52
La sécrétion de cytokines 52
Leur rôle dans l'organogenèse et le remodelage des organes lymphoïdes 52
Leur rôle dans la modulation des réponses immunitaires 53
Les lymphocytes B sont des APC professionnelles 54
L'induction des réponses immunitaires et de la tolérance centrale 54
Les lymphocytes B sont des APC efficaces in vitro 54
L'induction de l'immunité adaptative à médiation cellulaire 56
L'engagement du TCR et les signaux de costimulation et de co-inhibition 57
La stimulation par les cytokines pro-inflammatoires 58
La présentation antigénique 59
La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe I 59
La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe II 61
Les voies de présentation croisée d'antigènes 63
La voie cytosolique 64
La voie vacuolaire 65
L'implication de l'autophagie dans les voies de présentation d'antigènes 67
La présentation d'antigènes par le CMH de classe I 70
La présentation d'antigènes par le CMH de classe II 71

La vaccination 72
Les stratégies de vaccination induisant l'immunité cellulaire 73
Les particules pseudo-virales 79
La VLP dérivée du virus de la mosaïque de la papaye 80
Mise en situation et hypothèses de recherche 83
Mise en contexte 83
Hypothèses de recherche 83
Objectifs spécifiques de recherche 84
Chapitre 2 – Manuscrit I 85
Abstract 87
Introduction 88
Results 91
Discussion 95
Materials and Methods 98
Figures 101
Supplementary Figures 108
Acknowledgements 112
Author Contributions 112
Competing Interests 112
References 113
Chapitre 3 – Manuscrit II 119
Abstract 121
Introduction 122
Material and Methods 124

Results 129
Discussion 138
Figures 142
Supplementary Material and Methods 153
Supplementary Figures and Tables 154
Acknowledgements 159
Author Contributions 159
Conflict of Interest 159
References 160
Chapitre 4 – Discussion et perspectives 169
La présentation croisée d'un épitope inséré dans la VLP de PapMV par les lymphocytes B .. 170
La description des mécanismes de la voie de présentation croisée vacuolaire 170
Retour sur les résultats 170
Justification et critique des modèles utilisés 171
Perspectives 173
Le mécanisme d'entrée de la VLP de PapMV dans les lymphocytes B 173
Les protéases impliquées dans la dégradation de la VLP de PapMV 175
Le chargement des épitopes sur les molécules du CMH de classe I 178
L'implication de l'autophagie dans la présentation croisée vacuolaire 180
L'induction de l'autophagie et l'engagement des TLR 181
La localisation des VLP de PapMV dans les autophagosomes 182
Le rôle de l'autophagie 183
La présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV par les lymphocytes B : modèle proposé 186

Les lymphocytes B stimulés *in vitro* par le CD40, l'IL-4 ou la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 sont des APC efficaces 191
La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules CD40-B 191
Mise en contexte 191
Retour sur les résultats 192
Critique des méthodes utilisées 192
Les limitations de la technique de cytométrie en flux 192
Les limitations de la stratégie d'analyse des données de cytométrie en flux 193
Critiques des résultats et perspectives 195
La prolifération des cellules CD40-B 195
La caractérisation phénotypique des cellules CD40-B 197
La migration des cellules CD40-B 199
La sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules CD40-B 202
La présentation d'antigènes et l'activation des lymphocytes T 203
Les cellules CD40-B, une potentielle plateforme vaccinale alternative aux MoDC 206
Les lymphocytes B, des cellules à fort potentiel biotechnologique 209
Une plateforme vaccinale en immunothérapie du cancer 209
La sélection de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux à l'aide des lymphocytes B 210
L'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de TIL 210
Résultats préliminaires 212
L'utilisation des lymphocytes B en tant qu'APC : modèle proposé 213
Chapitre 5 – Conclusion 219
Références bibliographiques 221

Annexe I : Curriculum vitae 283

Liste des tableaux

Tableau 1. – (Supplementary Table 1^{mII}): Antibodies used for flow cytometry analysis 157

Tableau 2. – (Supplementary Table 2^{mII}): Soluble cytokines/chemokines quantified by multiplex assay 158

Tableau 3. – Inhibiteurs proposés pour l'étude de l'entrée de la VLP de PapMV 174

Liste des figures

Figure 1. – Le développement des lymphocytes B humains 35
Figure 2. – Les réponses des lymphocytes B à un Ag [adaptée de (127)] 43
Figure 3. – Les interactions synaptiques entre les lymphocytes B et T_{FH} [adaptée de (77)] 50
Figure 4. – La voie de présentation par le CMH de classe I [adaptée de (337)] 61
Figure 5. – La voie de présentation par le CMH de classe II..... 63
Figure 6. – Les voies de présentation croisée d'antigènes [adaptée de (307)] 67
Figure 7. – Le mécanisme de la macroautophagie [adaptée de (400)] 69
Figure 8. – Les diverses plateformes vaccinales 78
Figure 9. – (Figure 1^{ml}): TAP-independent MHC class I cross-presentation of PapMV VLPs requires active processing 101
Figure 10. – (Figure 2^{ml}): Inhibition of cathepsin S and endocytic acidification abrogate MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLPs..... 102
Figure 11. – (Figure 3^{ml}): Autophagy is induced in APC following incubation with PapMV VLPs 104
Figure 12. – (Figure 4^{ml}): MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs is dependent on autophagy induction 106
Figure 13. – (Figure 5^{ml}): ATG5 knockdown reduced PapMV VLP mediated MHC class I antigen cross-presentation..... 107
Figure 14. – (Supplementary Figure $S1^{ml}$): Chloroquine and cathepsin S inhibitor treatments do not alter MHC class I surface expression in EBV-B or T2 cells but 3-MA does at high concentrations 108
Figure 15. – (Supplementary Figure $S2^{ml}$): Rapamycin alters antigen presentation in EBV-B and T2 cells 110
Figure 16. – (Figure 1^{mII}): Primary human B cells stimulated with CD40L and IL-4 and/or IL-21 induce strong proliferation but generate distinct B cell subsets 142
Figure 17. – (Figure 2^{mII}): Distinct memory B cell subsets and antibody-secreting cells are induced by stimulation with CD40L and IL-4 and/or IL-21..... 144

Figure 18. – (Figure 3^{mII}): Activation molecules and SLO homing molecules are differently regulated by IL-4-, IL-21- and Combo-stimulated CD40-B cells..... 145
Figure 19. – (Figure 4^{mII}): IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells differentially secrete multiple cytokines and chemokines 147
Figure 20. – (Figure 5^{mII}): IL-4 and Combo stimulation induce the expression of markers associated with antigen-presentation and T cell stimulation 150
Figure 21. – (Figure 6^{mII}): IL-4- and Combo-activated CD40-B cells are efficient APC that promote T cell activation and proliferation..... 152
Figure 22. – (Supplementary Figure S1^{mII}): Proliferation of CD40-B cells in response to different concentrations of IL-4, IL-21 or Combo, and CD27 vs. IgD classification of B cell phenotypes .. 154
Figure 23. – (Supplementary Figure S2^{mII}): Gating strategies used for flow cytometry data analysis 155
Figure 24. – (Supplementary Figure S3^{mII}): IL-4- and Combo-CD40-B cells are efficient APC that promote T cell activation but not due to a higher frequency of synapse formation with T cells156
Figure 25. – Inhibition de la cathepsine S dans les MoDC..... 176
Figure 26. – Modulation de l'autophagie dans les MoDC 184
Figure 27. – Induction de l'autophagie par la privation en nutriments des cellules EBV-B .. 185
Figure 28. – Présentation croisée vacuolaire de la VLP de PapMV par les lymphocytes B : modèle proposé 189
Figure 29. – Exemple d'analyse par t-SNE..... 194
Figure 30. – Expansion des cellules CD40-B 197
Figure 31. – Étude de la migration des cellules CD40-B *in vitro* et *in vivo* : modèles proposés.. 201
Figure 32. – Essai de reconnaissance avec les cellules CD40-B cultivées jusqu'au jour 12... 204
Figure 33. – Évaluation de la vaccination avec les cellules CD40-B : modèle proposé 208
Figure 34. – Utilisation des cellules CD40-B pour induire l'expansion préférentielle de CTL spécifiques d'un antigène tumoral dans une expansion par REP 214
Figure 35. – Utilisation des cellules CD40-B pour activer les lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral pré-REP 215

Figure 36. – Concept d’une possible étude utilisant les lymphocytes B comme APC pour améliorer le traitement d’immunothérapie du cancer par transfert adoptif de TIL 216

Liste des abréviations

3-MA : 3-methyladénine
Aa : acide aminé
Ab : *antibody* (anticorps)
ACT : *adoptive cell transfer* (transfert adoptif de cellule)
ADN : acide désoxyribonucléique
Ag : antigène
AID : *activation-induced cytidine deaminase*
AKT : protéine kinase B
AF647 : AlexaFluor^{TM}647
AMBRA1 : *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*
ANOVA : *analysis of variance*
AP-4 : *activating enhancer-binding protein 4*
APC : *antigen-presenting cell* (cellule présentatrice d'antigènes)
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messager
ASC : *antibody-secreting cell*
ATG : *autophagy-related protein*
BAFF : *B-cell activating factor*
BCL-2/-6/-xL : *B cell lymphoma-2/-6/-extra large*
BCR : *B cell receptor* (récepteur de cellule B)
Be1/2 : *B effector 1/2*
BIM : *B cell lymphoma-2-like protein 11*
BLIMP-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein 1*
Bm : *mature B cell*
BMDC : *bone marrow-derived dendritic cell* (cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse)
B_{MEM} : lymphocyte B mémoire
B_{REG} : lymphocyte B régulateur
BSA: *bovine serum albumin* (albumine de sérum bovin)
BTLA : *B- and T-lymphocyte attenuator*
CAR : *chimeric antigen receptor* (récepteur d'antigènes chimérique)
CatS : cathepsine S
CatS inh. : inhibiteur de la cathepsine S
CCL3/4/19/21 : *C-C motif chemokine 3/4/19/21*
CCR7/9/10 : *C-C chemokine receptor type 7/9/10*
CD40-B : lymphocyte B activé par le récepteur CD40
CD40L : *CD40 ligand*
CEF : *Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and Influenza virus*
Cellule pré-B : cellule précurseur B
Cellule pro-B : cellule progénitrice B

Chaîne Ii : chaîne invariante I
ChQ : chloroquine
CIHR : *Canadian Institutes of Health Research*
CIITA : *MHC class II transactivator* (transactivateur du CMH de classe II)
CLIP : *class II–associated invariant chain peptide*
CLP : *common lymphoid progenitor* (progéniteur lymphoïde commun)
CMH-I/-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
Combo-CD40-B : lymphocyte B activé par le CD40L, l'IL-4 et l'IL-21
CoV : Coronavirus
CoVLP : *Coronavirus (SARS-CoV-2) virus-like particle*
CP : *coat protein* (protéine de structure)
CR1/2 : *complement receptor 1/2* (récepteur 1/2 du complément)
CRISPR-Cas9 : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-caspace 9*
CSR : *class switch recombination* (commutation de classe)
CTFR: *CellTrace™ Far Red*
CTL : *cytotoxic T lymphocytes* (lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$)
CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
CTRL : contrôle
CTV : *CellTrace™ Violet*
CXCL8/12/13 : *C-X-C motif chemokine 8/12/13*
CXCR4/5 : *C-X-C motif chemokine receptor type 4/5*
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DC : *dendritic cell* (cellule dendritique)
DFCP1 : *zinc-finger FYVE domain-containing protein 1*
DMSO : dimethyl sulfoxide
D-PBS : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*
DRD1 : *dopamine receptor D1*
DriP : *defective ribosomal products*
DZ : *dark zone* (zone sombre)
EAP : *asparagine endopeptidase*
EBI2 : *Epstein-Barr virus-induced G-protein-coupled receptor 2*
EBNA1 : *nuclear antigen 1 of the Epstein-Barr virus*
EBV : *Epstein-Barr virus*
EBV-B : lymphocyte B transformé par le virus Epstein-Barr
ECL : *enhanced chemiluminescence*
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP : *enhanced green fluorescent protein*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
ELISPOT : *enzyme-linked immunosorbent spot*
ER : *endoplasmic reticulum*
ERAD : *ER-associated degradation*
ERAP1/2 : ER aminopeptidase 1/2
ERGIC : *ER-Golgi intermediate compartment* (compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi)

FBS : *fetal bovine serum*
Fc : *fragment crystallizable region* (région constante Fc)
FDA : *Food and Drug Administration*
FDC : *follicular dendritic cells* (cellules dendritiques folliculaires)
FIP200 : *RB1-inducible coiled-coil protein 1*
FRQ-S : Fonds de la recherche du Québec – santé
FSC : *forward scatter*
Gal-9 : galectin-9
GC : *germinal center* (centre germinatif)
GFP : *green fluorescent protein*
GILT : *gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*
GL : ganglion lymphatique
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
gp100 : *melanoma glycoprotein 100*
H1N1 : hémagglutinine de type 1 et neuraminidase de type 1 du virus Influenza A
H3N2 : hémagglutinine de type 3 et neuraminidase de type 2 du virus Influenza A
HA : hémagglutinine
HBSS : *Hank's balanced salt solution*
Hc : *heavy chain* (chaîne lourde)
HCMV : *human cytomegalovirus* (cytomégalovirus humain)
HEPES : *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
HEV : *high endothelial venules* (veinules à endothélium épais)
HI : *heat-inactivated*
HIV-1 : *human immunodeficiency virus-1*
HLA : *human leukocyte antigen* (antigène des leucocytes humains)
HPV : *human papillomavirus* (papillomavirus humain)
HRP : *horseradish peroxidase*
HS : *human AB serum*
HSD : *honestly significant difference*
HSP90 : *heat shock protein 90*
HSV-1 : Herpès simplex de type 1
HuCD34 : souris humanisée par le transfert adoptif de cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$
HVEM : *herpes virus entry mediator*
ICAM-1/-2 : *intercellular adhesion molecule 1/2*
ICOS : *inducible T cell co-stimulator*
ICOSL : *ICOS ligand*
ICP34.5 : *infected cell protein 34.5*
ICP47 : *infected cell protein 47*
IFN-α/-β/-γ : interféron-alpha/-beta/-gamma
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IL-4-CD40-B : lymphocyte B activé par le CD40L et l'IL-4
IL-21-CD40-B : lymphocyte B activé par le CD40L et l'IL-21
IL-2R/-4R/-6R/-21R : récepteur de l'IL-2/-4/-6/-21

IMDM : *Iscove's modified dulbecco's medium*
iNKT : *invariant natural killer T cell* (cellule tueuse naturelle T invariante)
iNKT$_{FH}$: *follicular helper iNKT* (iNKT folliculaire)
IRAP : *insulin-regulated aminopeptidase*
IRF4 : *IFN regulatory factor 4*
IRS2 : *insulin receptor substrate 2*
JAK1/3 : *Janus family kinase 1/3*
KD : *knockdown*
LAG-3 : *lymphocyte-activation gene 3*
Lc : *light chain* (chaîne légère)
LC3 : *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
LCMV : *lymphocytic choriomeningitis virus*
LFA-1 : *lymphocyte function-associated antigen-1*
Lin28b : *Lin-28 homologue B*
LLPC : *long-lived plasma cell* (plasmocyte à longue durée de vie)
LMP1 : *latent membrane protein 1*
LTα1β2 : Lymphotoxine alpha1beta2
LZ : *light zone* (zone claire)
M1 : *influenza matrix protein 1* (protéine de matrice M1 du virus influenza)
M2e : ectodomaine de la protéine de matrice M2 du virus influenza
mAb : *monoclonal antibody*
MAGE-A3 : *melanoma-associated antigen 3*
MaMV : *Malva mosaic virus*
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
MARCH1 : *membrane-associated RING-CH protein I*
MART-1 : *melanoma antigen recognized by T cells*
Me B cells : *memory B cells*
MFI : *mean fluorescence intensity*
MHC-I : *major histocompatibility complex class I*
MIIC : *MHC-II compartment* (compartiment de CMH-II)
MLR : *mixed lymphocyte reaction*
MoDC : *monocyte-derived dendritic cell* (cellule dendritique dérivée de monocyte)
mTOR : *mammalian target of rapamycin*
mTORC1 : *mTOR complex 1*
MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*
Mϕ : macrophages
Nano : *nanoparticle*
NC : non chargé
NF-κB : *nuclear factor-kappaB*
NK : *natural killer cell* (cellule tueuse naturelle)
NKT : *natural killer T cell* (cellule tueuse naturelle T)
NOX2 : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase 2
NP : nucléoprotéine du virus influenza
NSERC : *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*

OVA : ovalbumine
PAMP : *pathogen-associated molecular patterns* (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes)
PapMV : *Papaya mosaic virus* (virus de la mosaïque de la papaye)
PAX-5 : *paired box 5*
PB : *plasmablast*
PBMC : *peripheral blood mononuclear cells* (cellules mononucléées du sang périphérique)
PC : *plasma cell* (plasmocyte)
pCMH-I/-II : complexe peptide-complexe majeur d'histocompatibilité de classe I/II
PD-1 : *programmed cell death 1*
pDC : *plasmacytoid dendritic cell* (cellule dendritique plasmacytoïde)
PD-L1/2 : *programmed cell death 1 ligand 1/2*
PE : phosphatidyléthanolamine
PhosphoAg : phosphoantigènes
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PLC : *peptide-loading complex* (complexe de chargement peptidique)
PLC-γ2 : phospholipase C gamma 2
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF : *phenylmethylsulfonyl fluoride*
PP : plaques de Peyer
PRDM1 : *PR domain zinc finger protein 1*
PRR : *pattern recognition receptors* (récepteurs de patrons de reconnaissance)
PVDF : *polyvinylidene fluoride*
qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
Rapa : rapamycine
RE : réticulum endoplasmique
REP : *rapid expansion protocol* (protocole d'expansion rapide)
RHDV : *rabbit hemorrhagic disease virus*
ROS : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)
RPMI 1640 : *Roswell Park Memorial Institute 1640 medium*
RT-PCR : *reverse transcription-polymerase chain reaction*
SARS : *severe acute respiratory syndrome* (syndrome respiratoire aigu sévère)
SD : *standard deviation*
SDS-PAGE : *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SEM : *standard error of the mean*
SFU : *spot forming units*
SHM : *somatic hypermutations* (hypermutations somatiques)
shRNA : *short hairpin RNA*
shSCR : *scramble shRNA*
SI : système immunitaire
siRNA : *small-interfering RNA*
SLAM : *signaling lymphocyte activation molecules*
SLO : *secondary lymphoid organs* (organes lymphoïdes secondaires)

SLPC : *short-lived plasma cell* (plasmocyte à courte durée de vie)
SNAP23 : *synaptosomal-associated protein 23*
SSC : *side scatter*
STAT1/3/5/6 : *signal transducers and activators of transcription 1/3/5/6*
T1/T2 : lymphocyte B transitionnel 1/2
TAP : *transporter-associated with antigen presentation*
TCR : *T cell receptor* (récepteur des lymphocytes T)
T_{FH} : *follicular helper T cell* (lymphocyte T folliculaire)
T_H1/2 : *helper T cell 1/2* (lymphocyte T auxiliaire 1/2)
TGF-β : *transforming growth factor-beta*
TIGIT : *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
TIL : *tumor-infiltrating lymphocytes* (lymphocytes T infiltrants les tumeurs)
TIM-3 : *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing 3*
TLO : *tertiary lymphoid organ* (organe lymphoïde tertiaire)
TLR : *toll-like receptors*
TLS : *tertiary lymphoid structure* (structure lymphoïde tertiaire)
TNF : *tumor necrosis factor* (facteur de nécrose tumorale)
TNFR : *TNF receptor*
TNFRSF13b : *TNF superfamily member 13b*
TNF-α : TNF-alpha
TRADD : *TNFR-associated death domain protein*
TRAF : *TNFR-associated factor*
t-SNE : *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*
T-VEC : talimogene laherparepvec
ULK1 : Unc-51-like kinase 1
UMAP : *Uniform Manifold Approximation and Projection*
US : *unstimulated*
UT : *untreated*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VLP : *virus-like particle* (particule pseudo-virale)
VLP-PapMV : particule pseudo-virale dérivée du virus de la mosaïque de la papaye
WIPI : *WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins*
XBP-1 : *X-box binding protein 1*
α-GalCer : alpha-galactosylcéramide
β2m : beta 2-microglobuline
γc : chaîne gamma commune aux récepteurs de cytokines

À mes parents, Evelyne et Didier et à mon conjoint, Sylvain

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le **Dr Réjean Lapointe** de m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire. Tout au long de ces années, Réjean m'a accompagné et m'a donné les libertés et responsabilités nécessaires afin de me permettre d'acquérir les compétences requises à l'obtention de ce diplôme de doctorat. Je remercie le **Dr Simon Turcotte** qui m'a aussi accompagné et conseillé lors de mon doctorat. Merci d'avoir été impliqué dans mon parcours et de m'avoir intégré dans ton équipe.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, les **Drs Jean-François Gauchat**, **Mélanie Dieudé**, **Alain Lamarre** et **Sylvie Lesage** d'avoir accepté de participer à la révision et à l'évaluation de ma thèse de doctorat. Je remercie les **Drs Jacques Thibodeau** et **Francis Rodier** qui ont siégé sur mes comités et qui m'ont donné des conseils pour l'avancement de mon projet. Je souhaite remercier les membres de l'**Institut du Cancer de Montréal** qui organisent des collectes de fonds pour financer les travaux de recherche et les bourses étudiantes dont j'ai été récipiendaire.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire passé et présent. Je souhaite tout particulièrement remercier **Laïla Aïcha-Hanafi** de m'avoir formé et m'avoir permis de collaborer avec elle sur différents projets, dont le projet PapMV. Laïla, j'ai vraiment été heureux de travailler avec toi, un énorme merci! Un grand merci à **Cécile Grange** pour son accueil chaleureux et son aide précieuse lors de mon arrivée à Montréal et au sein de laboratoire. Cécile, tu as énormément facilité cette transition et m'a permis de faire de Montréal mon nouveau chez moi très rapidement. Au sein du laboratoire, ta bonne humeur et ton énergie ont été un moteur! Nous avons partagé de beaux moments tant au sein du laboratoire qu'en dehors, dont je garde de nombreux beaux souvenirs. Cécile, merci beaucoup pour tout! Je remercie également **Paméla Thébault** de sa gestion du laboratoire et de m'avoir formé sur la technique de cytométrie en flux. Merci également pour tes conseils au cours de ces sept années et ton aide dans la révision de ma thèse. Je suis reconnaissant à toutes les personnes qui m'ont formé, apporté de l'aide technique ou des conseils. Un merci particulier à **Sandy Pelletier** et **Mélissa Mathieu** du laboratoire du Dr Simon Turcotte. Je remercie tous mes collègues anciens et actuels de l'Institut du cancer de

Montréal qui ont partagé mon quotidien durant ces années et ont rendu mes journées agréables : **Alexandre**, **Marjorie**, **Mireille**, **Aurélie**, **Sylvie**, **Maxime**. Merci également à **Mayra** et **Pavel** pour les bonnes discussions. Un merci tout particulier à **Laudine**, **Nicolas**, **Hubert** et **Gany** pour votre amitié et votre soutien. Je garde de beaux souvenirs de nos nombreux moments passés ensemble.

J'adresse des remerciements tout particuliers à **Gabriel Pagé**. Un énorme merci pour ton soutien au cours des dernières années. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée que ce soit pour mes expériences ou la rédaction des articles et de ma thèse. Merci pour tous nos moments partagés qui ont su rendre mon quotidien plus léger, nos innombrables cafés, nos promenades dans le Vieux-Port, etc. J'en garde d'excellents souvenirs. Merci de m'avoir apporté ton soutien, de m'avoir écouté me plaindre et d'avoir partagé tous ces moments avec moi. Merci de ton amitié et j'espère que nous pourrons partager beaucoup d'autres bons moments ensemble.

Je souhaite remercier de tout mon cœur mes parents, **Evelyne** et **Didier** qui m'ont toujours soutenu dans mes études et mes projets dès le début. Merci de votre amour, d'avoir cru en moi et de vos encouragements. Merci également de votre générosité qui a rendu possible la réalisation de mes divers projets lors de ces 12 dernières années. Malgré la distance, vous avez partagé cette expérience avec moi. Je vous remercie de vos nombreux voyages pour venir me voir et de toutes vos attentions particulières à mon égard. Je vous en suis extrêmement reconnaissant et je suis chanceux d'avoir des parents comme vous. C'est en partie grâce à vous que je dois ma réussite. Je remercie également mes frères, **Cédric** et **Cyril** et ma sœur **Sandra** d'avoir également cru en moi et de m'avoir soutenu et encouragé à leur façon, tout au long de mes études.

Un merci tout particulier à mon conjoint **Sylvain** que j'ai rencontré au cours de mon doctorat et qui partage mon quotidien depuis. Merci de ton amour indéfectible. Je te remercie de ton écoute, de m'avoir soutenu tout au long de mon doctorat et du processus d'écriture. Merci d'avoir toujours été là pour moi dans les moments difficiles. Merci d'être si compréhensif et d'être à mes côtés dans tous mes projets. Je suis tellement reconnaissant de t'avoir dans ma vie et de partager mon quotidien avec toi. C'est en partie grâce à toi que je dois ma réussite. Encore une fois, mille mercis. Je suis impatient de vivre ce nouveau chapitre avec toi à mes côtés.

Merci à tous!

Chapitre 1 – Introduction

Objectif général et structure de la thèse

L'objectif général des travaux de cette thèse consiste à étudier la biologie des lymphocytes B afin d'exploiter leur fonction alternative de présentation d'antigènes (Ag) pour stimuler la réponse immunitaire de type cellulaire dans un contexte d'immunothérapies. L'**Introduction** permettra la mise en contexte des travaux présentés en décrivant la biologie des lymphocytes B et leurs fonctions alternatives. L'induction de l'immunité cellulaire, les voies de présentation d'Ag et la vaccination seront également abordés. Le **Chapitre 2**, présenté sous forme de manuscrit soumis pour publication à ***Scientific Reports,*** étudiera la voie de présentation croisée d'Ag par laquelle un épitope fusionné à une particule pseudo-virale du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) est apprêté et l'implication de l'autophagie dans les lymphocytes B. Le **Chapitre 3** présentera une caractérisation des lymphocytes B stimulés *in vitro* par l'engagement du récepteur CD40 et par l'interleukine (IL)-4 ou l'IL-21 ou leur combinaison et évaluera leur capacité respective à induire les réponses des lymphocytes T *in vitro*. Ce chapitre est sous forme de manuscrit soumis pour publication à ***The Journal of Immunology***. Enfin, la section **Discussion et Perspectives** reviendra sur les résultats présentés afin de les mettre en contexte avec la littérature publiée et proposera des expériences futures avant de présenter la **Conclusion** du projet.

L'immunité

Le système immunitaire (SI) est fondamental à la survie, car il protège l'organisme contre les agents infectieux responsables de maladies et permet d'éliminer les cellules de l'organisme dont les fonctions sont altérées comme les cellules cancéreuses. Le SI est composé de l'ensemble des organes lymphoïdes primaires (la moelle osseuse et le thymus) et secondaires (les ganglions lymphatiques (GL), les plaques de Peyer (PP) et la rate), mais également de cellules spécialisées, les leucocytes et les molécules solubles qu'ils sécrètent que sont les cytokines et chimiokines. Certains leucocytes patrouillent l'organisme grâce au système sanguin et lymphatique, tandis que d'autres résident dans des tissus. Le SI est divisé en deux branches principales interconnectées l'une avec l'autre : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Le SI inné est la première ligne de défense à répondre lors d'une infection. Parmi les cellules le constituant, on retrouve les monocytes qui circulent dans le sang et se différencient en macrophages (Mϕ) lorsqu'ils migrent dans les tissus; les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC); les granulocytes. La réponse immunitaire menée par ces cellules est rapide et très efficace, mais elle est non spécifique et ne génère généralement pas de mémoire immunitaire (1, 2). Ces leucocytes possèdent des récepteurs de patrons de reconnaissance (*pattern recognition receptors,* PRR) qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns,* PAMP) qui sont similaires chez de nombreux agents infectieux sans être présents de façon normale dans l'organisme (3). Ils ingèrent par phagocytose des particules telles que les agents infectieux et les détruisent. L'immunité innée est intimement liée à l'immunité adaptative.

Le SI adaptatif est constitué par les lymphocytes B et les lymphocytes T qui possèdent des récepteurs capables de reconnaître précisément des Ag et donc d'induire des réponses très spécifiques à un agent infectieux donné. La spécificité des réponses génère une mémoire immunologique conférant une immunité à long terme et permettant de répondre plus rapidement et efficacement lors d'une réinfection. Deux types de réponses sont induites par les lymphocytes : la réponse cellulaire menée par les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) et la réponse humorale menée par les lymphocytes B qui sécrètent des immunoglobulines (Ig)/anticorps (*antibody*, Ab) spécifiques. Par ailleurs, une immunité spécifique peut souvent être induite par des moyens artificiels, notamment par la vaccination. Dans cette thèse, nous aborderons seulement la réponse du SI adaptatif.

L'immunité adaptative humorale

L'immunité humorale constitue la branche de l'immunité regroupant l'ensemble des molécules solubles se retrouvant dans les fluides extracellulaires et conférant une protection à l'organisme. Parmi ces molécules, le système du complément et les Ig jouent des rôles prépondérants. Les lymphocytes B sont les seules cellules capables de produire les Ig. Outre ce rôle crucial, les lymphocytes B arborent une multitude de fonctions diverses régulant la réponse immunitaire. Les lymphocytes B sont constitués de deux lignées distinctes, les lymphocytes B

non conventionnels B-1 et les lymphocytes B conventionnels B-2. Les sections suivantes exploreront la biologie des lymphocytes B.

Les lymphocytes B non conventionnels de la lignée B-1

Les lymphocytes B de lignée B-1 sont une population de lymphocytes B rare et unique qui présentent des caractéristiques fonctionnelles proches de l'immunité innée. Ces cellules ont été principalement caractérisées chez la souris. Les lymphocytes B-1 murins expriment les marqueurs $IgM^{high}IgD^{low}CD45^{low}CD23^{low/-}CD43^{+}$ et sont divisés en deux sous-populations : les lymphocytes B-1a ($CD5^{+}$) et B-1b ($CD5^{-/low}$). L'ontogenèse de ces cellules s'effectue majoritairement lors du développement fœtal et la vie néo-natale et elle semble être régulée par le facteur de transcription Lin28B (*Lin-28 homologue B*) (4, 5) ou par la spécificité de leur récepteur de cellules B (*B cell receptor*, BCR) (6). Les lymphocytes B-1 ont une longue durée de vie et possèdent une capacité d'auto-renouvellement qui permet leur maintien. Ils sont principalement localisés dans les cavités péritonéales et pleurales, mais se retrouvent aussi dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (*secondary lymphoid organs*, SLO) comme la rate (7). En 2011, Griffin et al., ont mis en évidence la présence de lymphocytes B non conventionnels humains dans le sang de cordon et le sang périphérique adulte qui partageaient des caractéristiques fonctionnelles similaires aux lymphocytes B-1 murins (8, 9). Ils sont définis par les marqueurs $CD19^{+}CD20^{+}CD27^{+}CD38^{low/medium}CD43^{+}$ (10, 11). Récemment, Rodriguez-Zhurbenko et al., ont rapporté que la population de lymphocytes B-1 humains et leurs fonctions déclinent avec l'âge (11).

Les lymphocytes B-1 sont principalement responsable de la sécrétion rapide et spontanée d'Ab en absence de stimulation. Le répertoire de ces Ab dits naturels est limité et ce sont majoritairement des IgM polyréactives de faibles affinités qui reconnaissent des épitopes conservés incluant la phosphorylcholine et d'autres phospholipides, les lipides oxydés, les glycolipides et les glycoprotéines ainsi que l'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin. Ces différents Ag sont présents sur de nombreux agents pathogènes, mais également sur les cellules tumorales et les cellules apoptotiques (12). Les Ab naturels jouent ainsi un rôle important car ils constituent une première ligne de défense contre de nombreux agents infectieux et permettent

le maintien de l'homéostasie en favorisant notamment l'élimination des corps apoptotiques (7, 13, 14). Chez la souris, il semble que la sécrétion de ces Ab soit être principalement effectuée par les lymphocytes B-1 localisés dans la moelle osseuse et la rate (15).

Lors d'une infection, les lymphocytes B-1 peuvent être activés par la reconnaissance des Ag puis migrer dans les SLO où il se différencient en cellules sécrétrices d'Ab (7, 16). Bien que les mécanismes ne soient pas complètement caractérisés, des études récentes ont rapporté que l'engagement des TLR (*toll-like receptors*) par l'Ag supporte leur activation (17, 18). Par ailleurs, les réponses des lymphocytes B-1 aux Ag ne dépendent pas de l'obtention de signaux d'aide par l'interaction avec les lymphocytes T (19). Toutefois, des études ont démontré que les lymphocytes B-1 peuvent être des cellules présentatrices d'Ag (*antigen-presenting cells*, APC) efficaces et induire la polarisation et la prolifération des lymphocytes T (20-23).

L'ontogenèse des lymphocytes B conventionnels de la lignée B-2

Les lymphocytes B de la lignée B-2 sont générés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques se différenciant en progéniteurs lymphoïdes communs qui s'engageront dans la lignée B. La lymphopoïèse B est divisée en trois étapes définies chacune par des évènements de recombinaison d'ADN menant à l'expression du préBCR (24) puis d'un BCR mature (25) (**Figure 1**). Le BCR est une IgM unique exprimée à la surface de chaque lymphocyte B engendré. Les recombinaisons d'ADN se produisent au niveau de segments de gènes codant pour les chaînes d'Ig : les segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) (26). Les réarrangements V_H, D_H et J_H des chaînes lourdes (*heavy chain*, Hc) associés aux réarrangements V_L et J_L des chaînes légères (*light chain*, Lc) de l'Ig permettent de générer un vaste répertoire d'Ab estimé à environ 10^{15} chez l'Homme (27).

Les lymphocytes B immatures qui expriment l'IgM à leur surface subissent différents contrôles afin d'éditer ou d'éliminer les cellules B autoréactives possédant un BCR reconnaissant des Ag du soi présents dans la moelle osseuse (28) (**Figure 1**). Une fois sélectionnés, ils rejoignent la rate, par la circulation sanguine, où ils finalisent leur développement en passant par les stades de lymphocytes B transitionnels 1 (T1) puis T2. Cette maturation peut aussi s'effectuer dans la moelle osseuse (29, 30). Lors de leur maturation, les lymphocytes B acquièrent l'expression à leur

surface de l'IgD, un variant d'épissage de l'IgM, et développent la capacité de recirculer dans l'organisme. Enfin, ils se différencient en lymphocytes B naïfs de la zone marginale de la rate ou en lymphocytes B folliculaires de type I ($IgD^{high}IgM^{low}CD21^{medium}$) ou de type II ($IgD^{high}IgM^{high}CD21^{medium}$) (31). Les lymphocytes B folliculaires résident principalement au sein de follicules primaires dans les SLO, mais ils patrouillent également dans la circulation sanguine et lymphatique (**Figure 1**). Par la suite, nous nous concentrerons seulement sur les lymphocytes B-2 folliculaires que nous nommerons simplement lymphocytes B.

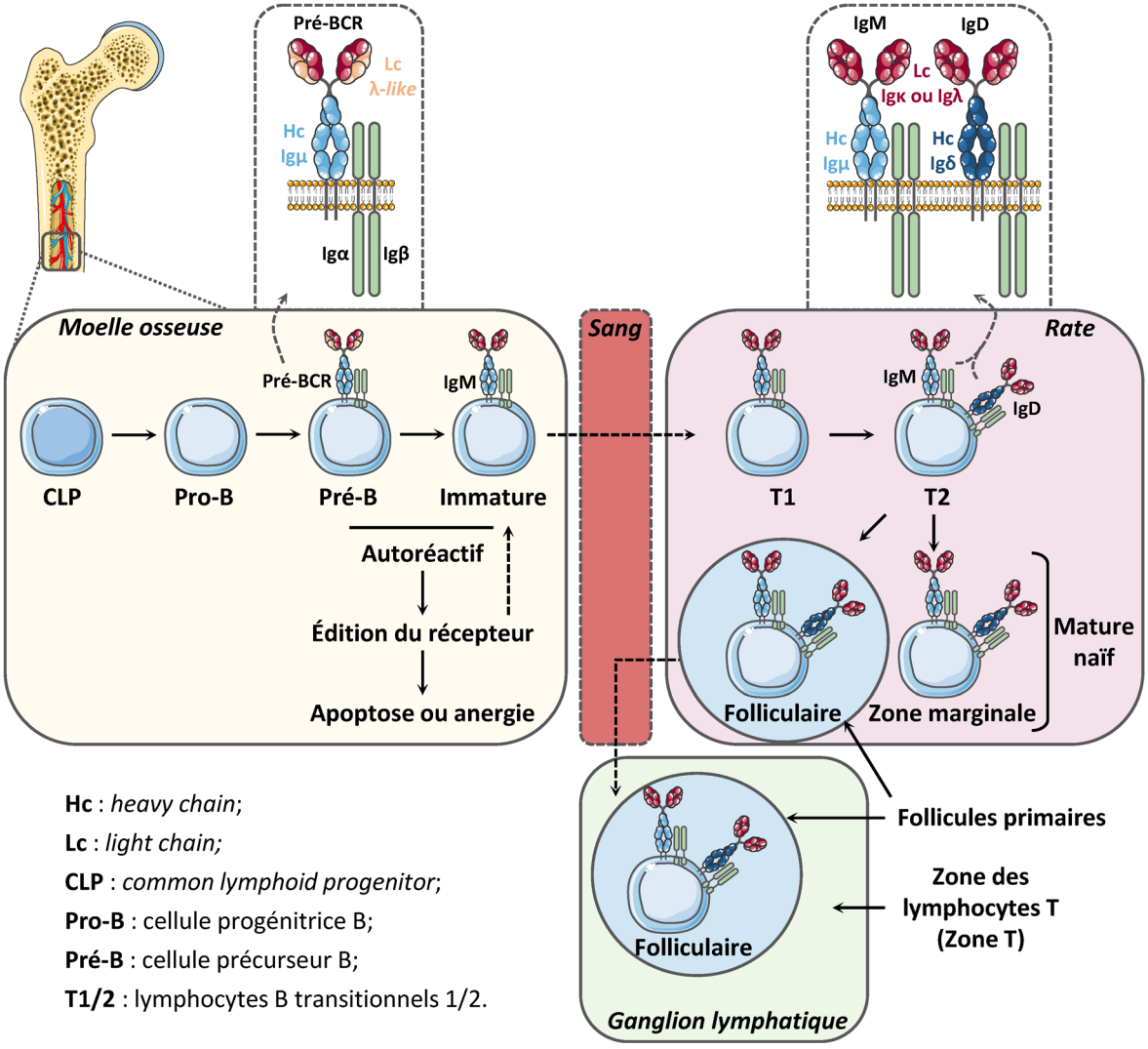


Figure 1. – Le développement des lymphocytes B humains

L'induction de la réponse humorale

L'initiation de la réponse humorale se produit principalement au sein des SLO comme les GL, dont l'organisation en niches fonctionnelles distinctes par diverses cellules stromales facilite la résidence, la survie et la mobilité des cellules essentielles à l'induction et au support de la réponse humorale (32, 33). Les lymphocytes B émigrent du sang vers le cortex du GL par les veinules à endothélium épais (*high endothelial venules*, HEV) et vont résider dans les follicules primaires du paracortex. Leur migration vers les follicules est guidée le récepteur CXCR5 (*C-X-C motif chemokine receptor type 5*) qui reconnaît la chimiokine CXCL13 (*C-X-C motif chemokine 13*) sécrétée par des cellules stromales associées aux follicules, dont les cellules dendritiques folliculaires (*follicular dendritic cells*, FDC) (34). Au sein du follicule, les cellules stromales sécrètent la cytokine BAFF/TNFRSF13b (*tumor necrosis factor (TNF) superfamily member 13b*) qui est essentielle à la survie des lymphocytes B (33, 35).

L'initiation de la réponse d'un lymphocyte B requiert la rencontre et la reconnaissance de l'Ag pour lequel il possède un BCR spécifique. Les SLO filtrent les fluides de l'organisme et concentrent les Ag dans les follicules. Les Ag de petite taille diffusent librement et peuvent être directement capturés par le BCR des lymphocytes B (36). Les Ag particulaires de grande taille sont quant à eux capturés et exposés dans leur forme native sur la membrane d'APC spécialisées pour qu'ils soient reconnus par les lymphocytes B (34, 37). Dans les GL, ce sont les Mϕ du sinus sous-capsulaire (34, 38, 39) et les FDC au centre des follicules qui capturent et exposent les Ag particulaires opsonisés (Ag auxquels se sont fixés des Ig et/ou des molécules du complément) (37). La reconnaissance de l'Ag par le BCR induit l'activation du lymphocyte B.

L'activation des lymphocytes B et l'internalisation des antigènes

L'engagement du BCR par la liaison de l'Ag déclenche des cascades de signalisation qui mèneront à l'activation du lymphocyte B (40, 41). Les Ag complexes peuvent également interagir avec des corécepteurs comme les TLR (42) ou le récepteur du complément CD21/CR2 (*complement receptor* 2) (43), ce qui permet d'amplifier le signal du BCR (42, 43) et semble abaisser le seuil d'affinité pour l'Ag requis pour déclencher l'activation (44). La transduction du signal BCR et des corécepteurs provoquent une cascade d'évènements aboutissant à l'activation

de multiples voies de signalisation, dont les voies de la phospholipase Cγ2 (PLC-γ2), des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), du NF-κB (*nuclear factor κB*) et de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-AKT (protéine kinase B) (45). L'activation de ces voies de signalisation induit des changements dans l'expression de nombreux gènes régulant la survie, le cycle cellulaire et la prolifération, la migration et les interactions avec les lymphocytes T (les molécules de costimulation et d'adhérence).

À la suite de l'engagement du BCR, les complexes BCR/Ag sont internalisés afin d'apprêter et de présenter l'Ag. Les Ag solubles liés au BCR sont principalement internalisés par endocytose qui dépend de la clathrine (46) alors que les Ag exposés sur la membrane des APC requièrent des forces mécaniques de traction générées par le cytosquelette d'actine et le moteur moléculaire myosine IIa pour être extraits et internalisés (47-49). Le lymphocyte B peut aussi sécréter des enzymes lytiques au niveau de la synapse immunologique pour digérer les Ag et capturer leurs fragments (50, 51). Après l'internalisation, l'Ag transite dans le compartiment endolysosomal où des enzymes le dégradent en fragments protéiques appelés peptides constituant des épitopes qui seront logés dans le sillon peptidique des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Les complexes peptide/CMH-II (pCMH-II) sont ensuite délivrés à la surface de la cellule pour la présentation aux lymphocytes T. Les mécanismes de présentation antigénique seront détaillés dans la section **La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe II**.

La rencontre entre les lymphocytes B et les lymphocytes T

Pour qu'une réponse immunitaire qui dépend des lymphocytes T progresse, les lymphocytes B naïfs ayant reconnu leur Ag doivent présenter les peptides sur leur CMH-II et interagir avec les lymphocytes T spécifiques du même Ag pour recevoir des signaux d'aide afin de compléter leur activation (52). La signalisation du BCR induit l'expression des récepteurs CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) (53) et EBI2 (*Epstein-Barr virus-induced G-protein-coupled receptor 2*) (54, 55) reconnaissant respectivement les chimiokines CCL19 (*C-C motif chemokine 19*), CCL21 et le 7α,25-dihydroxycholestérol. Ces récepteurs coopèrent pour guider les lymphocytes B à l'interface entre le follicule et la zone riche en lymphocytes T (56, 57). Les lymphocytes B interagissent avec les précurseurs de lymphocytes T folliculaires (*precursor*

follicular helper T cells, pré-T_{FH}), une sous-population de lymphocytes T auxiliaires (*helper*, T_H) $CD4^+$ ayant été préalablement activés et initiés (*priming*) par l'interaction avec une APC présentant l'Ag (**Figure 2**).

Les DC sont les cellules majoritairement responsables de l'initiation de la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes pré-T_{FH} (58). Cependant, des études récentes dans des modèles murins ont conclu que les lymphocytes B seuls peuvent aussi réaliser l'initiation des lymphocytes T $CD4^+$ (59, 60). Bien qu'il ait été démontré que plusieurs sous-populations de DC peuvent initier les lymphocytes T_H $CD4^+$, les DC conventionnelles de type 2 (cDC2) migratrices semblent jouer un rôle prépondérant (61, 62). Il a été proposé que la sous-population de DC impliquée dépend de la disponibilité de l'Ag dans les SLO (61). Les cDC2 patrouillent l'organisme à la recherche d'Ag du non-soi et sont sensibles aux signaux inflammatoires fournis par les PRR. L'engagement de ces récepteurs induit leur maturation et leur migration de la périphérie vers les SLO afin d'initier la réponse immunitaire (3). Elles expriment les récepteurs CCR7, CXCR5 et EBI2 ce qui leur permet de se positionner au niveau de l'interface entre le follicule et la zone riche en lymphocytes T où elles supportent la différenciation des lymphocyte T_H $CD4^+$ en lymphocyte pré-T_{FH} (63-65). Les DC matures fournissent trois signaux requis pour l'initiation des lymphocytes T_H $CD4^+$ (61, 66) :

1) *La présentation de l'Ag par le CMH-II* : l'affinité entre le récepteur des lymphocytes T (*T cell receptor*, TCR) et le complexe pCMH-II, ainsi que le temps de l'interaction entre la DC et le lymphocytes T $CD4^+$ sont des facteurs déterminants dans la différenciation des lymphocyte T_H $CD4^+$ en lymphocytes T_{FH} (67, 68). Fazilleau et al., ont démontré que les lymphocytes T $CD4^+$ ayant une forte affinité du TCR pour l'Ag se différencient préférentiellement en lymphocytes T_{FH} (67).

2) *L'engagement de multiples récepteurs par les molécules de costimulation* : l'interaction entre le récepteur CD28, exprimé par les lymphocytes T, et ses ligands CD80/CD86 est essentielle à l'initiation de la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes pré-T_{FH} (69). Les DC expriment le récepteur CD40 et son engagement par son ligand (CD40L/CD154) exprimé par les lymphocytes T conduit à l'expression de OX40L (ligand de OX40) par les DC. En parallèle, les signalisations du CD28 et du CD40L induisent l'expression de récepteur OX40 par les

lymphocytes T (70, 71). Bien que plusieurs études aient rapporté que l'engagement du récepteur OX40 est crucial pour la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes pré-T_{FH}, l'importance de cette interaction varie selon les modèles utilisés (61). Enfin, l'interaction entre le récepteur ICOS (*inducible T cell costimulator*) avec son ligand ICOSL exprimé par les DC est requise pour plusieurs étapes de l'initiation de la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes T pré-T_{FH} (61, 72).

3) *La sécrétion de cytokines* : l'IL-6 chez la souris et l'IL-12, l'IL-23 et le TGF-β (*transforming growth factor β*) chez l'Homme induisent la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes T pré-T_{FH} (61, 73-75). L'IL-27 et les interférons (IFN) de type I peuvent aussi participer à la polarisation des lymphocytes T_H $CD4^+$ en lymphocytes T pré-T_{FH} tandis que l'IL-2 inhibe cette différenciation (61).

L'ensemble de ces signaux d'activation fournis par les DC mène à la différenciation des lymphocytes T_H $CD4^+$ naïfs en lymphocytes T pré-T_{FH} exprimant le facteur de transcription BCL-6 (*B cell lymphoma-6*) (76) et à leur migration à l'interface entre le follicule et la zone riche en lymphocytes T afin d'interagir avec les lymphocytes B. Suivant l'interaction avec les lymphocytes B, les lymphocytes T_H $CD4^+$ se différencient pleinement en lymphocytes T_{FH} définis par l'expression de BCL-6, PD-1 (*programmed cell death 1*), ICOS et CXCR5 (77). Les lymphocytes B réalisent quant à eux la commutation de classe (*class switch recombination*, CSR) (78) qui consiste en la recombinaison des gènes codants pour la région constante Fc de la chaîne lourde de l'Ig. La CSR permet de changer l'isotype de l'Ig en remplaçant l'exon Cμ (IgM) par un des exons Cγ (IgG), Cε (IgE), ou Cα (IgA) (79) tout en maintenant la spécificité du BCR pour l'Ag. Ce mécanisme requiert l'expression de plusieurs enzymes, dont la cytidine désaminase AID (*activation-induced cytidine deaminase*) qui induit des mutations et des cassures double brin dans les régions d'ADN à recombiner (79).

La force du signal BCR et l'interaction avec les lymphocytes T_{FH} mènent les lymphocytes B vers plusieurs destins cellulaires (80) (**Figure 2**) :

- La différenciation en plasmocytes (*plasma cells*, PC) à courte durée de vie (*short-lived PC*, SLPC) ou plasmablastes, capables de proliférer et qui sécrètent des Ab *unswitched* (IgM) ou *switched* (IgG, IgE ou IgA) de faible affinité pour l'Ag. Leur durée de vie se limite généralement à la durée de l'infection. Ils expriment CXCR4 et se positionnent dans des niches spécifiques dans les SLO (81). Certains SLPC IgA^+ migrent dans la lamina propria de l'intestin (82).
- La différenciation en lymphocytes B mémoires (B_{MEM}) indépendamment des centres germinatifs (*germinal centers*, GC).
- La différenciation en lymphocytes B des GC : l'obtention d'une aide efficace des lymphocytes T_{FH} (83-85) ainsi que la densité des complexes pCMH-II semblent contrôler l'entrée des lymphocytes B dans la réaction GC (86).

Les centres germinatifs

Les GC permettent d'affiner la réponse humorale en mettant en place des mécanismes de maturation et de sélection de l'affinité pour l'Ag (52, 80, 87), tout en supportant l'expansion clonale de lymphocytes B ayant des affinités variables pour l'Ag (88-90). Les GC matures possèdent une organisation interne en deux zones constituées par des lymphocytes B ayant des programmes transcriptionnels différents (87, 91-93). La zone claire (*light zone*, LZ) où sont présents des FDC exposant des Ag et sécrétant la chimiokine CXCL13, les lymphocytes T_{FH} et des lymphocytes B (centrocytes) exprimant fortement le CXCR5, le CD83 et le ligand de costimulation CD86 (92, 94, 95). La zone sombre (*dark zone*, DZ) constituée par des cellules réticulaires sécrétant la chimiokine CXCL12 (96) et des lymphocytes B (centroblastes) qui ont des niveaux d'expression élevés de l'enzyme AID et de CXCR4 (92, 94, 95) (**Figure 2**).

La zone sombre

Après avoir reconnu leur Ag et reçu les signaux d'aide des lymphocytes T_{FH} dans la LZ, les lymphocytes B expriment CXCR4 et transitent vers la DZ où ils se divisent et subissent des hypermutations somatiques (*somatic hypermutations*, SHM) catalysées par AID (90, 92, 97). La vitesse et le nombre de divisions qu'ils effectuent dépendent de la force des signaux d'aide reçus

des lymphocytes T_{FH} dans la LZ (98, 99). Les SHM génèrent de nouvelles Hc/Lc et donc un nouveau BCR (79, 100). Les lymphocytes B ayant un BCR non fonctionnel à la suite des SMH sont éliminés par apoptose (101). Les lymphocytes B de la DZ expriment l'ubiquitine ligase MARCH1 (*membrane-associated RING-CH protein I*) qui permet un renouvellement rapide des complexes pCMH-II à la surface. Ce mécanisme favorise la présentation d'Ag capturés récemment promouvant ainsi la fidélité et l'efficacité de la sélection qui s'effectuera dans la LZ dans laquelle l'expression du CD83, l'antagoniste de MARCH1, inhibe ce renouvellement rapide (102). Suivant leur division extensive et aux SHM, les lymphocytes B expriment CXCR5 et migrent dans la LZ (91) pour tester l'affinité de leur nouveau BCR et entrer en compétition pour recevoir l'aide des lymphocytes T_{FH} (**Figure 2**).

La zone claire

La sélection des lymphocytes B est un processus compétitif multifactoriel qui se produit dans la LZ dont les mécanismes précis restent à définir complètement. Elle semble reposer à la fois sur l'affinité du BCR pour l'Ag et la capacité des lymphocytes B à obtenir les signaux d'aide des lymphocytes T_{FH} (103) (**Figure 2**). Il est suggéré que les lymphocytes B ayant une haute affinité pour l'Ag ont une plus forte signalisation du BCR ce qui favorise leur survie (104, 105). De plus, ils sont plus compétitifs pour interagir et capturer l'Ag afin de l'apprêter et le présenter aux lymphocytes T_{FH} pour obtenir une aide efficace (94, 98, 99, 103, 106). Les lymphocytes B qui n'obtiennent pas les signaux d'aide des lymphocytes T_{FH} meurent (107).

Dans la LZ, les signalisations synergiques déclenchées par l'engagement simultané du BCR par l'Ag et du récepteur CD40 par son ligand (CD40L/CD154) exprimé par les lymphocytes T_{FH}, permettent d'induire fortement l'expression du facteur de transcription c-MYC (103, 105, 108). Le niveau d'expression de c-MYC est proportionnel à la magnitude de l'aide reçue des lymphocytes T_{FH} (109). Il constitue un médiateur important impliqué dans la survie des lymphocytes B des GC (107) et le contrôle de la réentrée dans le cycle cellulaire (110, 111). Une fois dans la DZ, c-MYC sert de compteur de divisions, car son niveau d'expression est « dilué » à chaque division ce qui force les lymphocytes B de la DZ à retourner dans la LZ pour interagir avec les lymphocytes T_{FH} (109, 112). Les lymphocytes B ayant reçu une aide efficace sont sélectionnés et peuvent retourner dans la DZ pour une nouvelle expansion clonale et des SMH, ou bien se

différencier en lymphocytes B_{MEM} ou en PC à longue durée de vie (*long-lived PC*, LLPC) (113) (**Figure 2**).

Les destins cellulaires des lymphocytes B des centres germinatifs

La génération de lymphocytes B_{MEM} et LLPC permet la mise en place d'une mémoire immunitaire fournissant une double protection (80). Les lymphocytes B ayant une haute affinité pour l'Ag se différencient préférentiellement en PC tandis que ceux ayant un BCR de plus faible affinité se différencient en lymphocytes B_{MEM} (104, 114, 115). La différenciation en lymphocytes B_{MEM} ou PC dépend de programmes transcriptionnels distincts. Le facteur de transcription BACH2 est exprimé par les lymphocytes B s'engageant vers le phénotype de lymphocytes B_{MEM} (116) tandis que le répresseur transcriptionnel BLIMP-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) est le déterminant principal induisant la différenciation en PC. Les plasmablastes ont une expression intermédiaire de BLIMP-1 alors que les PC l'expriment fortement (117-119). Le facteur de transcription XBP-1 (*X-box binding protein 1*) est également crucial, car en participant à la réponse stress du réticulum endoplasmique (RE), il permet aux PC de sécréter des milliers d'Ab (120, 121).

Les PC générés lors de la réaction du GC quittent les SLO et sont guidés par CXCR4 vers des niches spécifiques au sein de la moelle osseuse où ils deviennent des LLPC sécrétant des Ab protecteurs de haute affinité à long terme (104, 115, 121). Les PC IgA^+ migrent vers la lamina propria de l'intestin en exprimant l'intégrine α4β7 et les récepteurs CCR9 et CCR10 (82). Les niches où ils résident sont constituées de cellules stromales qui sécrètent des facteurs comme l'IL-6 et APRIL favorisant leur survie prolongée (122, 123). Les lymphocytes B_{MEM} sont des cellules quiescentes IgM^+ ou IgG^+ pouvant être réactivées rapidement par une exposition subséquente à l'Ag et ses variants, subir la CSR et se différencier à leur tour en SLPC ou entrer dans la réaction des GC (80, 124). La majorité des lymphocytes B_{MEM} sont circulants, mais d'autres résident dans les tissus comme dans les poumons (124, 125). Dans les GL, ils semblent se positionner dans une niche au niveau du sinus sous-capsulaire ce qui permet la rencontre rapide avec les Ag portés par les Mϕ (126).

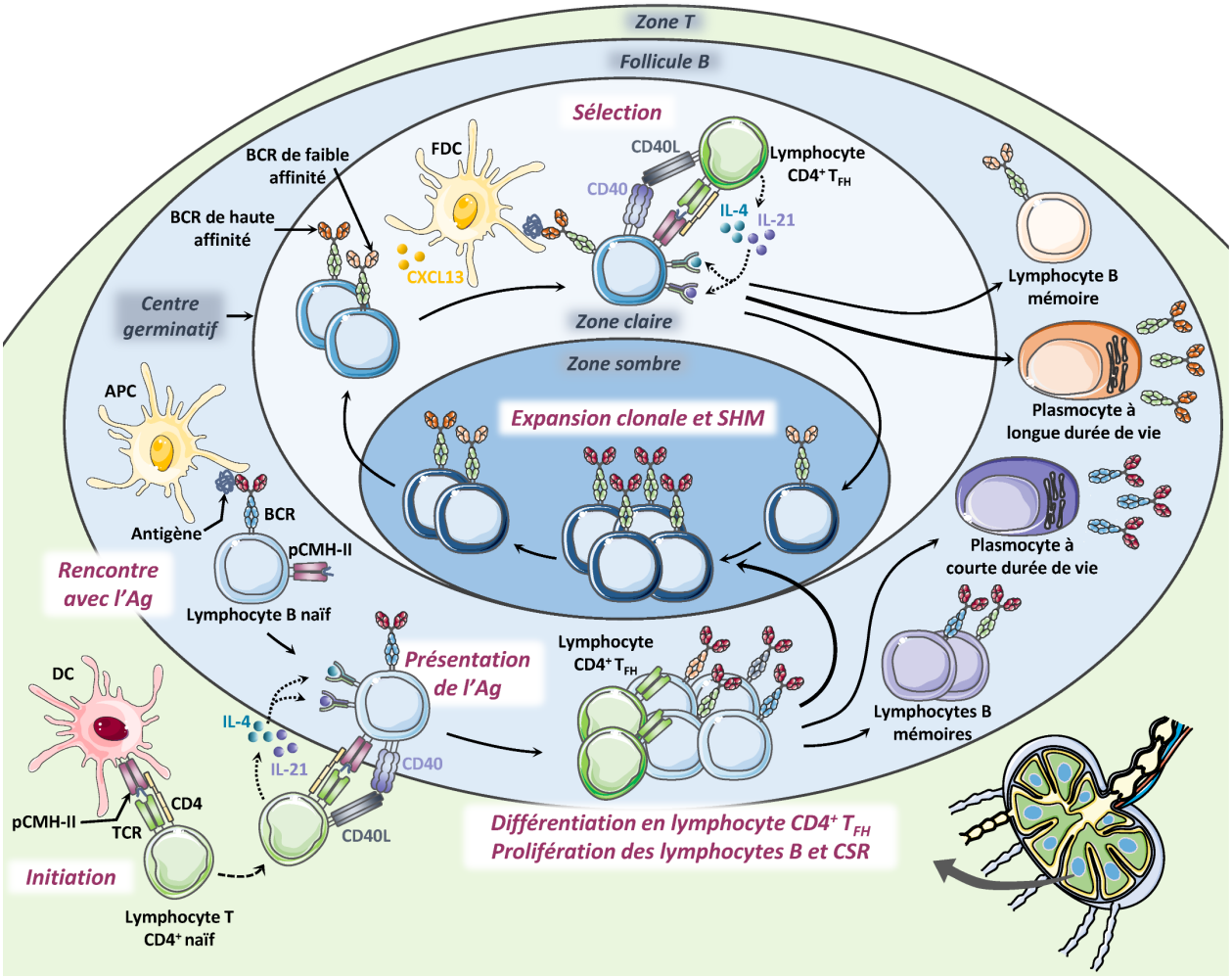


Figure 2. – Les réponses des lymphocytes B à un Ag [adaptée de (127)]

Dans les sections suivantes, nous approfondirons les interactions entre les lymphocytes B et T_{FH} et plus particulièrement les signaux d'aide qu'ils fournissent lors de la réaction des GC.

Les interactions synaptiques entre les lymphocytes B et T_{FH}

Les lymphocytes B et T s'engagent dans des interactions synaptiques qui durent des dizaines de minutes et permettent l'échange de signaux d'activation (128). Les interactions entre le pCMH-II et le TCR sur le lymphocyte T_{FH} ainsi que les intégrines, les molécules d'adhérence et de costimulation façonnent la nature des interactions entre les lymphocytes B et T_{FH} et contribuent à leur stabilité (77, 129, 130).

Les molécules d'adhérence et de costimulation

L'interaction entre l'intégrine LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) et ICAM-1/2 (*intercellular adhesion molecule 1/2*) exprimées respectivement sur les lymphocytes T_{FH} et B (131), est essentielle pour maintenir la stabilité des interactions pCMH-II/TCR et contribue à l'activation du lymphocyte T (129, 130). Des interactions homotypiques entre les molécules de la famille SLAM (*signaling lymphocyte activation molecules*) stabilisent les interactions entre ces cellules (132) et induisent l'expression de l'IL-4 par les lymphocytes T_{FH} (133) (**Figure 3**).

Dans la LZ, les lymphocytes B expriment les ligands de costimulation CD80 et CD86 qui interagissent avec le récepteur CD28 présent à la surface du lymphocyte T. Le CD86 promeut la présentation d'Ag par les lymphocytes B (134). L'engagement du CD28 est crucial pour les lymphocytes T, car il mène à leur prolifération, la production de cytokines et leur différenciation en lymphocytes T_{FH} en induisant l'expression des récepteurs CXCR5 et ICOS essentiels à la réaction des GC (66). L'interaction entre ICOS et son ligand (ICOSL), exprimé par les lymphocytes B des GC, induit la translocation du CD40L au niveau de la synapse (135, 136) ce qui permet l'engagement du CD40 à la surface des lymphocytes B des GC (**Figure 3**).

L'interaction entre le récepteur CD40 et le CD40L

Le CD40L et le récepteur CD40 sont des protéines transmembranaires homotrimériques faisant partie de la famille des TNF (137). Le CD40 est exprimé de façon constitutive par tous les lymphocytes B matures et les DC (138, 139) tandis que le CD40L est exprimé par les lymphocytes T activés (140), mais également par divers types cellulaires (139, 141). L'interaction CD40L-CD40 joue un rôle crucial dans la réaction des GC car la délétion du gène *CD40LG* codant pour le CD40L ou l'utilisation d'Ab bloquant l'interaction CD40-CD40L entraîne des anomalies dans la formation des GC, une absence de CSR ainsi que la dissolution de GC préétablis, respectivement (142, 143). Chez l'Homme, des mutations du gène *CD40LG* sont responsables du syndrome hyper IgM qui est caractérisé par une absence de lymphocytes B_{MEM} et d'IgG, IgA et IgE sériques (144).

Les molécules de CD40L sont préexprimées et stockées dans des vésicules sécrétrices dans le cytoplasme de plusieurs sous-types de lymphocytes T $CD4^+$ dont les lymphocytes T_{FH}, ce qui permet leur translocation rapide à la surface lorsque le TCR est engagé (145-147). Des études ont

mis en évidence que la signalisation d'ICOS contribue à la translocation du CD40L à la surface du lymphocyte T tant chez la souris (135) que chez les humains (136). Chez l'Homme, il a récemment été démontré que les lymphocytes T_{FH} contiennent des granules denses riches en dopamine qui est sécrétée au niveau de la synapse lors de l'interaction avec le lymphocyte B (136). Lorsque le neurotransmetteur se fixe sur son récepteur DRD1 (*dopamine receptor D1*) à la surface du lymphocyte B, la signalisation induit une expression accrue d'ICOSL. L'interaction ICOS-ICOSL conduit à l'augmentation de l'aire synaptique et à la translocation du CD40L, polarisée au niveau de la synapse, à la surface du lymphocyte T. La signalisation d'ICOS augmente aussi la production des granules de dopamine. Cette boucle de rétroaction positive favorise une stimulation optimale par le CD40L qui est requise pour la survie et la sélection des lymphocytes B des GC (136).

L'expression membranaire du CD40L est rapidement diminuée suivant l'interaction CD40L-CD40 *in vivo* (148) ou *in vitro* (149). L'engagement du CD40L entraîne son internalisation (149), mais il peut également être clivé de la surface par des métalloprotéases générant ainsi sa forme soluble (150). Les travaux de Gardell et Parker ont démontré que le CD40L peut aussi être transféré du lymphocyte T au lymphocyte B qui procède alors à son endocytose (151). Le transfert du CD40L pouvait être réalisé par la sécrétion d'exosomes ou de microvésicules relâchés au niveau de la synapse (152, 153).

Au sein du lymphocyte B, ce sont les protéines adaptatrices TRAF (*TNF receptor associated factor*), recrutées au niveau du domaine cytoplasmique du CD40 qui sont responsables de la transduction du signal (154, 155). Le CD40 active majoritairement les voies de la signalisation canonique et non canonique de NF-κB, mais également les voies PI3K-AKT, PLC-γ2, MAPK (139, 154, 155). La voie de signalisation JAK3 (*Janus family kinase 3*)-STAT3 (*signal transducers and activators of transcription 3*) semble également activée (156). La signalisation du CD40 régule de nombreux processus incluant la production de cytokines, la recombinaison des gènes d'Ig, la survie cellulaire, l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, la formation de GC, la production d'Ab de haute affinité et la formation de lymphocytes B_{MEM} (138). Dans les lymphocytes B des GC, l'activation synergique des signalisations du CD40 et du BCR est importante pour induire fortement c-MYC, ce qui est essentiel à leur sélection positive (103, 105). Par ailleurs, la force de l'interaction CD40L-CD40,

associée à l'obtention de signaux extrinsèques comme la stimulation par les cytokines, permet d'influencer les destins cellulaires des lymphocytes B (157, 158).

Dans le **Chapitre 2**, nous avons utilisé des lymphocytes B humains immortalisés par l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV). Ce virus infecte les lymphocytes B naïfs quiescents et les reprogramme ce qui mène à leur immortalisation (159). La protéine LMP1 (*latent membrane protein 1*) de l'EBV est une protéine transmembranaire qui s'insère dans la membrane plasmique du lymphocyte B et agit comme un récepteur dont l'activation est constitutive et ne dépend pas de la liaison à un ligand. Son domaine cytoplasmique C-terminal contient des domaines consensus permettant l'interaction avec plusieurs protéines adaptatrices TRAF ce qui lui confère une homologie fonctionnelle avec le domaine cytoplasmique du récepteur CD40 (160, 161). En conséquence, LMP1 mime la signalisation du CD40 et active de multiples voies de signalisation, dont majoritairement les voies de la signalisation de NF-κB, permettant ainsi l'activation et la prolifération constitutive des lymphocytes B transformés (162). Bien que similaires, les mécanismes moléculaires menant à l'activation des voies de signalisation diffèrent entre LMP1 et le CD40. Par exemple, le domaine cytoplasmique LMP1 interagit avec la protéine TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) afin de recruter TRAF6 et d'induire l'activation des voies de la signalisation de NF-κB, tandis que le domaine cytoplasmique du CD40 interagit directement avec TRAF6 (160, 161). Ainsi, l'infection des lymphocytes B par le virus EBV est une technique qui permet d'obtenir une lignée cellulaire continuellement activée et proliférative pouvant présenter des Ag par CMH-I et CMH-II de façon constitutive.

La sécrétion de cytokines par les lymphocytes T_{FH}

Les interactions récepteurs-ligands entre les lymphocytes B et T_{FH} induisent la signalisation par le calcium dans chacun des types cellulaires et promeuvent l'expression des cytokines IL-4 et IL-21 par les lymphocytes T_{FH} (77, 163) (**Figure 3**). Ces cytokines ont des fonctions cruciales non redondantes qui façonnent les réponses des lymphocytes B des GC (52, 77). Leur combinaison induit une forte expression du facteur de transcription BCL-6 dans les lymphocytes B murins activés par le CD40 (164, 165) qui est central à la régulation de la réaction du GC. Des études récentes suggèrent que les lymphocytes T_{FH} expriment l'IL-4 et l'IL-21 de façon séquentielle et

variée au cours de la réponse immunitaire. L'IL-21 semble être sécrétée tôt dans la réponse tandis que l'IL-4 n'est produite que lorsque les lymphocytes T_{FH} résident dans le follicule (166, 167).

L'interleukine-4

L'IL-4 est une cytokine pléiotrope qui régule de nombreux processus de la réponse immunitaire et joue un rôle crucial dans la stimulation des lymphocytes B. L'IL-4 possèdent deux récepteurs différents qui sont des hétérodimères membranaires formés de l'association de deux chaînes polypeptidiques. Le récepteur de type I est constitué d'une chaîne alpha (IL-4Rα), portant le domaine de liaison à l'IL-4, qui s'associe avec la chaîne γ commune aux récepteurs de cytokines (γ_c) à la suite de l'interaction avec l'IL-4. Le récepteur de type II est quant à lui formé par l'association des chaînes IL-4Rα et IL-13Rα1. Le récepteur de type I est donc spécifique de l'IL-4 alors que le récepteur de type II est commun à l'IL-4 et l'IL-13 (168). La chaîne IL-4Rα est exprimée par de nombreuses cellules tandis que l'expression des chaînes secondaires varie selon les types cellulaires. Les cellules non-hématopoïétiques n'expriment pas ou peu la chaîne γ_c mais expriment la chaîne IL-13Rα1. Au contraire, les lymphocytes expriment des niveaux relativement élevés de la chaîne γ_c mais présentent une faible expression de la chaîne IL-13Rα1. Les cellules myéloïdes expriment quant à elles à la fois la chaîne IL-13Rα1 et la chaîne γ_c (168). La liaison de l'IL-4 sur le récepteur de type I (IL-4Rα/γ_c) induit l'activation des protéines tyrosine kinases JAK1 et JAK3, ce qui mène au recrutement et à l'activation des protéines STAT6 et IRS2 (*insulin receptor substrate 2*) (168-170). Les protéines STAT6 forment des homodimères qui transloquent au noyau où ils régulent la transcription de nombreux gènes (171, 172) tandis que la phosphorylation de IRS2 mène à l'activation de la voie PI3K-AKT (170).

La stimulation par l'IL-4 joue un rôle important dans la survie des lymphocytes B. Zamorano et al., ont démontré que les lymphocytes B murins déficients en IRS2 ou en la sous-unité p85α de la PI3K entrent en apoptose même en présence d'IL-4 (173). L'activation de STAT6 induit l'expression du facteur BCL-xL qui a un effet anti-apoptotique (174). De plus, Granato et al., ont rapporté que l'IL-4 est importante dans la maturation *in vitro* des lymphocytes B murins du stade immature à transitionnel et promeut leur survie en inhibant de façon post-transcriptionnelle l'expression de la protéine proapoptotique BIM (*BCL-2-like protein 11*) induite par l'engagement du BCR (175).

Par ailleurs, la stimulation par l'IL-4 régule le métabolisme des lymphocytes B. Dufort et al., ont démontré que l'IL-4, par STAT6, augmente l'expression du transporteur du glucose GLUT1 ce qui mène à une augmentation de la glycolyse favorisant ainsi la survie des lymphocytes B spléniques murins (176). Dans un modèle murin d'asthme, il a récemment été démontré que la stimulation des lymphocytes B pulmonaires par l'IL-4 induit l'autophagie par l'activité des kinases JAK et la signalisation de la voie PI3K, mais de façon indépendante de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ce qui favorise leur survie et promeut la présentation d'Ag (177). De plus, l'IL-4 induit les fonctions de présentation d'Ag des lymphocytes B par l'activation synergique des voies de signalisation de STAT6 et de NF-κB non canonique qui mène à l'expression du CMH-II et des molécules de costimulation CD80 et CD86 (178, 179).

L'aide des lymphocytes T_{FH} par l'engagement du CD40 et de la sécrétion de l'IL-4 joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse par la sécrétion d'Ab. Les signalisations de l'IL-4 (STAT6) associées à celle du CD40 (NF-κB) agissent en synergie pour induire la forte expression de l'enzyme AID requise pour la CSR et les SHM (180-182). L'IL-4 promeut l'expression des isotypes IgG1 et IgE chez la souris (180, 183) tandis que les IgG4 et IgE sont induits chez l'Homme (184). Par ailleurs, la stimulation *in vitro* des lymphocytes B par l'IL-4 et l'engagement du CD40 permet la culture et l'expansion des lymphocytes B (185-187).

L'interleukine-21

L'IL-21 est une cytokine pléiotrope découverte en 2000 par Parrish-Novak et al. (188, 189). Elle est principalement sécrétée par les lymphocytes T_{FH} (190, 191), mais aussi par les lymphocytes T_H17 et les cellules *natural killer T* (NKT), et elle est impliquée dans la régulation des fonctions de nombreuses cellules immunitaires, dont les lymphocytes B (192-194). L'IL-21 joue un rôle fondamental dans la prolifération des lymphocytes B, la CSR et la différenciation en PC tant chez la souris que chez les humains (195, 196). Chez l'Homme, l'IL-21 induit fortement la prolifération des lymphocytes B costimulés par le CD40 (188) et biaise la CSR des lymphocytes B naïfs vers l'IgG1 et IgG3 tout en augmentant la sécrétion de ces isotypes par les lymphocytes B_{MEM} (197-200). Les IgA, notamment l'IgA1, sont également induits (199, 200), mais l'IL-21 est un régulateur négatif de la réponse par IgE (201-203). De nombreuses études ont démontré le rôle de l'IL-21 dans l'induction d'une prolifération importante et la différenciation des lymphocytes B humains,

quelle que soit leur localisation (sang de cordon ou périphérique, rate ou amygdales) ou leur étape de différenciation (transitionnel, naïf, mémoire ou lymphocytes B des GC) (198-200, 204, 205).

Les lymphocytes B humains naïfs et des GC expriment le récepteur de l'IL-21 (IL-21R) de façon constitutive et son expression peut être augmentée sur les cellules naïves, ou induite sur les lymphocytes B_{MEM} par l'activation du CD40 *in vitro* (204). Suivant son engagement, il se dimérise avec la chaîne γ_c (169) ce qui mène au recrutement de JAK1 et JAK3 et à l'activation principale de STAT3 (206-208); STAT1 et STAT5 peuvent également être activées (209-211). Les protéines STAT forment des homo- ou hétérodimères qui modulent l'expression de nombreux gènes dont des facteurs de transcription régulant la biologie du lymphocyte B (212). Les modèles murins ont mis en évidence que l'IL-21 régule la réaction des GC en maintenant l'expression des facteurs de transcription BCL-6 et AP4 par les lymphocytes B des GC (164, 213-215). Associé à d'autres facteurs de transcription, BCL-6 régule la production des Ig et la CSR en induisant l'expression de l'enzyme AID (198, 206). Bien que BCL-6 bloque la différenciation en PC en réprimant l'expression de BLIMP-1 (216), la signalisation synergique du IL-21R et du CD40 augmente la capacité de STAT3 à induire la transcription du gène *PRDM1 (PR domain zinc finger protein 1*) codant pour BLIMP-1 (217). L'expression accrue de BLIMP-1 mène à la production de XBP-1 (218) et à l'inhibition de BCL-6, PAX5 (*paired box 5*) et c-MYC ce qui enclenche le programme transcriptionnel de différenciation en PC tout en diminuant l'expression du CIITA (*MHC class II transactivator*) et du CMH-II (219). Les facteurs de transcription BLIMP-1 et XBP-1, associés à IRF4 (*IFN regulatory factor 4*) guident la différenciation des lymphocytes B en PC sécrétant des Ab *in vitro* et *in vivo* (121, 194, 199, 217). De plus, l'IL-21 induit l'expression du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (IL-2Rα/CD25) par les lymphocytes B naïfs leur permettant de répondre à la stimulation par l'IL-2, ce qui accroît leur différenciation en PC et leur sécrétion d'Ig (207).

De plus, l'IL-21 semble favoriser la survie et la sécrétion d'Ig par les PC nichés dans les SLO (220) ou générés *in vitro*, en induisant l'expression du IL-6R (198). Toutefois, elle mène à l'apoptose par l'induction de BIM si les lymphocytes B ne reçoivent pas l'aide des lymphocytes T ou en présence de signaux TLR (196, 221, 222). Attridge et al., ont démontré que l'IL-21 promeut

l'expression du CD86 par les lymphocytes B murins ce qui leur confère une meilleure capacité de costimulation des lymphocytes T (223). L'IL-21 joue ainsi un rôle crucial dans la réponse humorale en favorisant la prolifération, la CSR et la différenciation en PC des lymphocytes B.

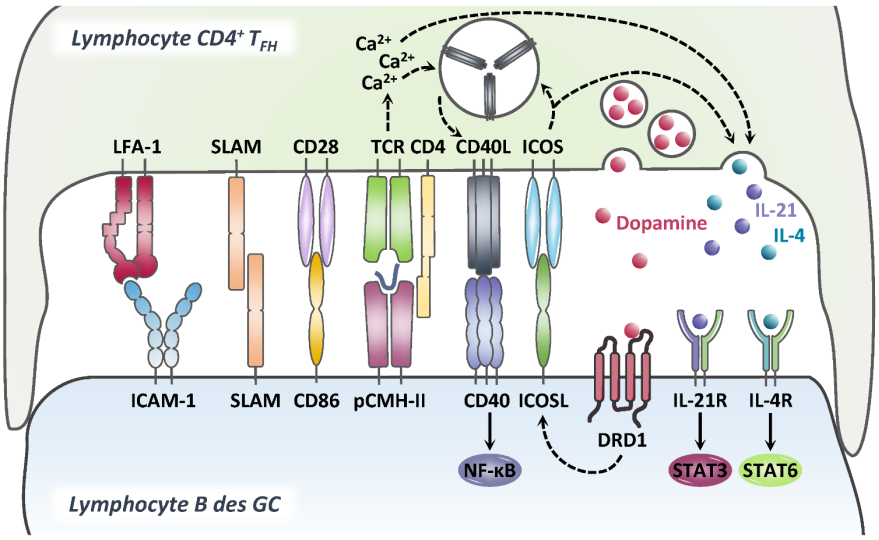


Figure 3. – Les interactions synaptiques entre les lymphocytes B et T_{FH} [adaptée de (77)]

Les interactions entre les lymphocytes B et les lymphocytes T non conventionnels

Outre les interactions avec les lymphocytes T_{FH}, les lymphocytes B peuvent recevoir des signaux d'aide de la part d'autres cellules immunitaires, dont les cellules NKT invariantes (*invariant NKT*; iNKT). Ces cellules sont une population hétérogène de lymphocytes T non conventionnels qui possèdent un TCR semi-invariant reconnaissant des Ag glycolipidiques tels que l'agoniste α-galactosylcéramide, présentés par la molécule CD1d, un analogue non-polymorphique du CMH-I. Les cellules iNKT influencent les réponses des lymphocytes B par des interactions directes ou par la modulation des réponses d'autres cellules immunitaires comme les DC et les lymphocytes T_H $CD4^+$ (224-226). Les cellules iNKT folliculaires (*follicular helper iNKT*; $iNKT_{FH}$) sont une sous-population de cellules iNKT qui partagent de nombreuses caractéristiques avec les lymphocytes T_{FH}. Elles expriment CXCR5, PD-1, CD28, ICOS, BCL-6 et sont retrouvées au sein des follicules (227) et des GC nouvellement formés (228). Elles interagissent directement avec les lymphocytes B (228, 229) et fournissent des signaux d'aide par l'engagement du CD40, CD80/CD86, ICOSL et la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-21 (228, 230, 231). Bien que ces cellules

participent à induire les réponses humorales des lymphocytes B, elles ne semblent généralement pas mener à la mise en place d'une mémoire immunitaire (228, 231, 232).

Les lymphocytes B peuvent également interagir avec les lymphocytes T γδ. Contrairement aux lymphocytes T_H $CD4^+$ et $CD8^+$ ayant un TCR hétérodimérique constitué des chaînes α et β, ces lymphocytes T non conventionnels expriment un TCR hétérodimérique constitué des chaînes γ et δ. Ils constituent une faible population de lymphocytes T périphériques, mais sont enrichis dans les tissus épithéliaux comme la peau, l'intestin et les poumons et se retrouvent également dans les SLO (233). Les lymphocytes T γδ reconnaissent des phosphoantigènes (phosphoAg) non-peptidiques indépendamment de leur présentation sur un CMH. Les phosphoAg sont des intermédiaires métaboliques d'origine microbienne ou provenant de cellules eucaryotes. Les cellules tumorales étant une source importante de phosphoAg, les lymphocytes T γδ sont impliqués dans la réponse immunitaire antitumorale (234). Les interactions entre les lymphocytes B et les lymphocytes T γδ ne sont pas entièrement caractérisées et plusieurs mécanismes ont été proposés (233). Chez l'Homme, Caccamo et al., ont démontré que les lymphocytes T $Vγ9^+Vδ2^+$ isolés du sang périphérique expriment CXCR5 et leur stimulation par un phosphoAg mène à l'expression de ICOS et du CD40L ainsi qu'à la production d'IL-2, IL-4 et d'IL-10. Lors d'une co-culture *in vitro*, ces signaux aident les lymphocytes B et conduisent à une production d'Ab accrue (235). De plus, la stimulation des lymphocytes T $Vγ9^+Vδ2^+$ par l'IL-21 contribue à l'acquisition de leur fonction d'aide pour les lymphocytes B (236). Récemment, Petrasca et al., ont rapporté que la co-culture de lymphocytes T $Vδ3^+$ humains avec des lymphocytes B conduit à une augmentation de l'expression du CD40, CD86 et de la molécule du CMH-II HLA-DR chez les deux populations cellulaires, et promeut la production d'IgM par les lymphocytes B (237).

Les sections précédentes ont décrit le rôle clé des lymphocytes B dans l'immunité humorale consistant en leur différenciation cellules sécrétrices d'Ab. Toutefois, les lymphocytes B exercent également d'autres fonctions, que nous décrirons dans les paragraphes suivants.

Les fonctions alternatives des lymphocytes B

L'ampleur et l'importance des fonctions alternatives des lymphocytes B ont été mise en évidence par l'efficacité des thérapies utilisant des Ab monoclonaux anti-CD20 pour le traitement des pathologies auto-immunes (238). Les effets cliniques de la déplétion des lymphocytes B proviennent de la perte de fonctions importantes comme la présentation d'Ag, la production de cytokines inflammatoires, l'activation des lymphocytes T et la génération de follicules lymphoïdes tertiaires (239). Ces fonctions alternatives sont également importantes dans les réponses immunitaires physiologiques contre les agents infectieux ou les tumeurs.

La sécrétion de cytokines

Par la production de cytokines, les lymphocytes B guident le développement des tissus lymphoïdes et modulent les réponses des lymphocytes T effecteurs et mémoires. Ils peuvent aussi être pathogéniques dans un contexte d'auto-immunité (240, 241).

Leur rôle dans l'organogenèse et le remodelage des organes lymphoïdes

Les lymphocytes B participent à l'organogenèse des SLO par la sécrétion de cytokines (242). Dans la rate, les lymphocytes B naïfs sécrètent la lymphotoxine (LT) α1β2 et le TNF-α qui sont requis pour le développement des FDC et leur sécrétion de CXCL13 (243-246). Cette interaction entre les lymphocytes B et les FDC constitue une boucle de rétroaction positive : la LTα1β2 induit la production de CXCL13 par les FDC et réciproquement la CXCL13 promeut la chimiotaxie et l'organisation des lymphocytes B en follicules et leur sécrétion de LTα1β2 (247). La LTα1β2 contribue aussi à l'organisation de la zone T du stroma(248) et de la zone marginale de la rate (246). Dans les GL et les PP, le développement des FDC dépend seulement du TNF-α produit par les lymphocytes B (246, 249). De plus, lors d'une inflammation ou d'une infection, la LTα1β2 produite par les lymphocytes B est responsable du remodelage des SLO. Dans un modèle murin d'infection par LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*), la LTα1β2 sécrétée par les cellules B est responsable de l'augmentation du volume des GL et l'expansion du réseau de HEV (250).

Par ailleurs, il est suggéré que l'expression de la LTα1β2 par les lymphocytes B permet la formation de structures/organes lymphoïdes tertiaires ectopiques (*tertiary lymphoid structures/organs,* TLS/TLO) dans les tumeurs, les tissus affectés par l'auto-immunité et les

greffons (251-255). Les TLO pourraient ainsi être responsables de la réponse immunitaire locale permettant notamment la présentation d'Ag (256) ou la production d'Ab protecteurs (infection, cancer, athérosclérose) ou pathogéniques (auto-immunité) au niveau des sites d'inflammation (257). Dans les tumeurs de mélanome, de carcinome à cellules rénales et différents types de sarcomes, la présence de TLS et des lymphocytes B est associée à un pronostic favorable lorsque les patients reçoivent des traitements d'immunothérapie (258-260).

Leur rôle dans la modulation des réponses immunitaires

Les lymphocytes B peuvent contrôler la polarisation des réponses des lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs et la formation des cellules T mémoires par diverses cytokines (242). Harris et al., ont démontré que les lymphocytes B peuvent se différencier en deux sous-populations, nommées Be1 (*B effector 1*) et Be2 qui sécrètent des cytokines associées aux phénotypes T_H1 (TNF-α, IFN-γ, IL-2 et IL-12) et T_H2 (IL-4, IL-6, IL-10 et IL-12). Ces cytokines sont capables de polariser la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ vers les phénotypes T_H1 et T_H2, respectivement (261, 262). Li et al., ont récemment rapporté que les lymphocytes B humains sont importants dans les réponses des lymphocytes T_H1 et T_H17 contre l'infection à *Candida albicans.* Ils présentent les Ag fongiques par CMH-II, fournissent les signaux de costimulation par le CD80/CD86 et produisent du GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et de l'IL-6. Le GM-CSF amplifie leur production d'IL-6 et cette dernière participe directement à la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en T_H17 (263).

Les lymphocytes B peuvent aussi réguler négativement l'immunité afin de maintenir l'homéostasie (264). Diverses populations de lymphocytes B régulateurs (B_{REG}) ont été décrites chez la souris et l'Homme, toutes définies par la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (264-266). Les lymphocytes B_{REG} régulent l'immunité par différents mécanismes (266, 267) et notamment par la sécrétion d'IL-35 (268) et de TGF-β (269). L'IL-35 induit elle-même la différenciation des lymphocytes B humains en lymphocytes B_{REG} (270). Ces cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les lymphocytes B_{REG} inhibent la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et leur différenciation en $T_H1/17$ et inhibent les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques. Ils induisent aussi la différenciation des lymphocytes T régulateurs et peuvent entraver les fonctions des DC, Mϕ, neutrophiles et des cellules NK (266, 267).

Les lymphocytes B sont des APC professionnelles

L'induction des réponses immunitaires et de la tolérance centrale

Les lymphocytes B activés sont des APC professionnelles (271). Grâce à la spécificité de leur BCR, ils reconnaissent, capturent, apprêtent et présentent très efficacement sur leur CMH-II des Ag présents en faible concentration. Dans les SLO, cette fonction est cruciale pour l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ $T_{FH,}$ et l'obtention de leurs signaux d'aide (272, 273). Des études récentes ont confirmé le rôle des lymphocytes B en tant qu'APC professionnelles. Un modèle murin d'infection à *Plasmodium* a démontré que ce sont les lymphocytes B qui induisent une réponse forte des lymphocytes T $CD4^+$ et leur différenciation vers le phénotype T_{FH} (60). De façon similaire, les lymphocytes B sont les APC professionnelles responsables de l'initiation de la réponse des lymphocytes T $CD4^+$ contre une nanoparticule pseudo-virale (*virus-like particule*, VLP) ou le virus influenza A inactivé (59). Dans ces deux études, l'initiation des lymphocytes T $CD4^+$ ne nécessite pas la présentation d'Ag par les DC et dépend uniquement des lymphocytes B (59, 60). Dans un contexte vaccinal, les lymphocytes B semblent être les APC impliquées dans la génération et le maintien des lymphocytes T mémoires $CD4^+$ T_H1 (274).

Les lymphocytes B jouent aussi un rôle important dans la tolérance centrale des lymphocytes T. Ils font partie des APC qui résident dans le thymus où ils présentent des Ag pour induire la délétion clonale des thymocytes $CD4^+$ autoréactifs (275-277). Cependant, les lymphocytes B peuvent être pathogéniques et être eux-mêmes responsables du développement de maladies auto-immunes (278) et du rejet de greffes allogéniques (279, 280) par la présentation d'auto- ou alloantigènes, respectivement.

Les lymphocytes B sont des APC efficaces in vitro

Les fonctions de présentation d'Ag des lymphocytes B peuvent être induites et exploitées *in vitro*. En 1991, Banchereau et al., ont démontré que la culture à long terme *in vitro* de lignées cellulaires de lymphocytes B humains pouvait être établie par la stimulation continue du CD40 et par l'IL-4 (CD40-B) ce qui mime partiellement les signaux fournis par les lymphocytes T_{FH} (186, 281). Depuis, des travaux effectués par notre laboratoire et d'autres équipes se sont concentrés sur l'utilisation des cellules CD40-B pour l'induction de réponses immunitaires contre des Ag

spécifiques. Schultze et al., ont été les premiers à démontrer que les cellules CD40-B humaines étaient des APC très efficaces capables d'induire l'activation d'une réponse des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques à un Ag (282). Des travaux de notre laboratoire ont par la suite établi que les cellules CD40-B humaines chargées en présence de lysats de cellules du mélanome étaient capables d'internaliser les Ag exogènes indépendamment de la spécificité de leur BCR, de les apprêter et les présenter de façon efficace sur leur CMH-II et ainsi induire l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ mémoires spécifiques des Ag tumoraux (283). Les travaux de von Bergwelt et al., ont ensuite rapporté que les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs pouvaient également être activés (284). Par ailleurs, les cellules CD40-B générées *ex vivo* et chargées avec des Ag peuvent présenter les Ag par CMH-I ou CMH-II et possèdent des propriétés immunostimulatrices puissantes, car elles sont capables de réaliser l'initiation des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ *in vitro* et *in vivo* (285-287). Nous avons également démontré que les cellules CD40-B transfectées avec de l'ADN ou de l'acide ribonucléique (ARN) codant pour des Ag viraux ou tumoraux induisent des réponses fonctionnelles des lymphocytes T contre ces Ag (288-290).

Puisque les lymphocytes B représentent une plus grande population des cellules immunitaires circulantes que les DC, il est aisé d'en obtenir à partir d'un faible volume de sang périphérique et leur stimulation par le CD40 et l'IL-4 permet de les accroître *ex vivo*. Puisque ce sont des APC efficaces, les cellules CD40-B générées *in vitro* peuvent être une alternative aux DC ou aux DC dérivées des monocytes (*monocyte-derived DC*, MoDC) tant pour les applications de recherche fondamentale que clinique comme la vaccination. Elles permettent de surpasser les difficultés du protocole de préparation des DC ou de culture des MoDC *in vitro* (282, 291, 292). Dans le sang périphérique, les DC sont une population rare et très hétérogène (293) et il est nécessaire d'effectuer une leucaphérèse afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour une utilisation clinique (294). Les MoDC sont quant à elles obtenues par la différenciation *ex vivo* des monocytes $CD14^+$ avec le GM-CSF et l'IL-4, puis leur maturation est réalisée par leur stimulation avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6 avec la prostaglandine E2 (295) et l'IFN-γ (296) ou encore avec le CD40L (297). Les MoDC générées sont hétérogènes et leurs phénotypes varient selon les conditions de culture *in vitro* (298). Elles ne ressemblent pas aux DC conventionnelles, mais elles sont similaires aux DC inflammatoires, une

autre sous-population hétérogène de DC. De plus, les MoDC semblent avoir une capacité de migration limitée dans les SLO (293, 294, 299).

Les études dans des modèles murins ont démontré que les cellules CD40-B expriment fortement et de façon stable des molécules de costimulation et sont aussi efficaces que les DC pour présenter des peptides aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (300). De plus, la vaccination avec des cellules CD40-B murines chargées avec des Ag peut conduire à l'initiation des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques *in vivo* (286) et induire une réponse antitumorale des CTL comparable à celle induite par les DC (301). Chez l'Homme, les cellules CD40-B de donneurs sains ou de patients atteints de cancers ont une expansion *in vitro* ainsi que des propriétés de présentation d'Ag et de migration similaires (302). Enfin, les cellules CD40-B humaines générées *ex vivo* expriment des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines requis pour la migration et leur résidence dans les SLO et démontrent une propension à migrer vers leurs ligands respectifs *in vitro* ce qui suggère ainsi qu'elles pourraient migrer vers les SLO afin d'interagir avec les lymphocytes T *in vivo* (302, 303).

Les lymphocytes B sont très polyvalents et exercent diverses fonctions dont la sécrétion d'Ab est centrale à la réponse humorale. Par la sécrétion de cytokines et la présentation d'Ag, ils modulent les réponses d'autres cellules immunitaires, dont les lymphocytes T. Dans le **Chapitre 3**, nous avons caractérisé les cellules CD40-B humaines stimulées *in vitro* avec l'IL-4 ou l'IL-21 ou la combinaison des deux cytokines et évalué leur capacité respective à être des APC efficaces capables d'induire l'activation *in vitro* des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques spécifiques d'Ag. Dans la section suivante, l'induction de la réponse cellulaire des CTL sera abordée.

L'induction de l'immunité adaptative à médiation cellulaire

L'immunité cellulaire par les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques est essentielle à l'élimination des cellules tumorales et des cellules infectées par des micro-organismes. Ils sont aussi impliqués dans le rejet de greffe allogénique. Grâce à leur TCR spécifique, ils reconnaissent des Ag étrangers à l'organisme (non-soi) présentés par les molécules du CMH-I exprimées à la surface des cellules nucléées. La voie de présentation par CMH-I sera détaillée dans la section **La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe I**. Les Ag du non-soi peuvent être des

Ag du soi altérés (peptide muté dérivé d'une protéine mutée) ou des Ag dérivés d'agents infectieux. Après leur développement, les lymphocytes T $CD8^+$ naïfs émigrent du thymus et colonisent les SLO dans l'attente de rencontrer l'Ag pour lequel ils sont spécifiques.

L'engagement du TCR et les signaux de costimulation et de co-inhibition

L'initiation des lymphocytes T $CD8^+$ requiert trois signaux principaux. Le premier signal correspond à la reconnaissance de l'Ag par le TCR grâce à sa présentation sur le CMH-I d'une APC professionnelle mature. L'engagement du TCR induit une cascade de signalisation qui mène à l'activation du lymphocyte T (304, 305). Les APC patrouillent l'organisme à la recherche d'Ag du non-soi et sont sensibles aux signaux inflammatoires fournis par les PRR. L'activation de ces récepteurs conduit à leur maturation et leur migration de la périphérie vers les SLO afin d'initier la réponse immunitaire (3). Le statut de maturation de l'APC est crucial, car la présentation par une APC mature mène à l'activation des CTL alors qu'une APC immature entraîne la tolérance (anergie ou délétion) (306). Les DC conventionnelles de type 1 (cDC1) sont classiquement responsables de l'initiation des CTL car elles semblent être les cellules les plus efficaces à effectuer la présentation croisée d'Ag exogènes (307-309). Les mécanismes de la présentation croisée d'Ag seront détaillés dans la section **Les voies de présentation croisée d'antigènes**. Toutefois, d'autres APC comme les cDC2 et les MoDC peuvent aussi induire l'immunité cellulaire par les CTL(299, 310, 311). Par exemple, Kuhn et al., ont démontré que les MoDC activent les réponses antitumorales des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques chez les souris ayant des tumeurs de mélanome et traitées avec un agent immunostimulant et *Mycobacterium smegmatis* (312). De façon similaire, dans un modèle murin d'infection aigüe à LCMV, les MoDC jouent un rôle crucial dans la génération de lymphocytes T $CD8^+$ mémoires (313).

Pour activer complètement le lymphocyte T, l'APC doit fournir un signal de costimulation (deuxième signal) qui détermine le destin cellulaire du lymphocyte T. Les APC matures expriment les molécules de costimulation CD80 et CD86 qui sont les ligands du CD28 à la surface des lymphocytes T; le CD28 constitue le récepteur de costimulation majeur requis lors de l'initiation (314). Son engagement permet d'amplifier les signaux transduits par le TCR et il déclenche une signalisation propre régulant la biologie du lymphocyte T (315). L'absence de signaux de

costimulation fournie par le CD28 conduit à l'anergie des cellules T naïves (316, 317). Par ailleurs, les lymphocytes T reçoivent des signaux de costimulation par l'engagement d'autres récepteurs de la famille CD28/B7 comme ICOS ou par l'intermédiaire de récepteurs de la famille des TNF/TNFR dont font partie les récepteurs CD27, OX40, 4-1BB et le CD40L. À l'exception du CD27, l'expression de ces récepteurs est induite plusieurs heures suivant l'engagement du TCR/CD28; ils sont donc impliqués dans les étapes tardives d'activation des lymphocytes T (318, 319). Une étude a démontré que la vaccination de souris portant des tumeurs de mélanome avec des lymphocytes B modifiés génétiquement pour coexprimer le CD40L et CD70 ou OX40L et chargés avec des peptides, conduit à une réponse antitumorale des CTL plus efficace que la vaccination avec les DC dérivées de la moelle osseuse (*bone marrow-derived DC,* BMDC) (320). De façon similaire, les cellules CD40-B murines transfectées avec les ARNm codants pour OX40L, 4-1BBL et l'IL-12p70 induisent une plus forte prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ et leur sécrétion d'IL-2 et d'IFN-γ. Ces cellules sont aussi efficaces que les BMDC pour induire la réponse cytotoxique des CTL *in vitro* mais la vaccination avec les BMDC semble être plus efficace pour initier les CTL *in vivo* (321).

L'activation des lymphocytes T induit également l'expression de récepteurs co-inhibiteurs comme CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), PD-1 et TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing 3*) qui freinent et inhibent l'activation des lymphocytes T lorsqu'ils sont engagés par leurs ligands respectifs, CD80/86, PD-L1/2 et la galectin-9, exprimés par l'APC. Ces récepteurs inhibiteurs régulent la réponse immunitaire et permettent de contracter la population de lymphocytes T amplifiée afin de revenir à l'homéostasie (322, 323). L'initiation efficace des CTL requiert donc l'expression majoritaire de ligands de costimulation par l'APC et la régulation fine de l'expression des récepteurs de costimulation et de co-inhibition par les lymphocytes T afin que la réponse progresse et soit contrôlée convenablement.

La stimulation par les cytokines pro-inflammatoires

Afin de compléter l'activation des lymphocytes T, les APC fournissent un troisième signal aux CTL par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines. L'IL-12 et les IFN-α/β de type I fournissent ce signal crucial afin d'augmenter l'expansion clonale des CTL, de promouvoir l'acquisition de

leurs fonctions effectrices incluant leur activité cytotoxique et la production d'IFN-γ (324, 325). La sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires est induite par la maturation des APC à la suite de l'engagement des PRR comme les TLR ou bien par l'engagement du récepteur CD40 par l'interaction avec les lymphocytes T_H $CD4^+$ (326, 327). Les IFN-α/β sont principalement sécrétés par les DC plasmacytoïdes (*plasmacytoid DC*, pDC) (328).

L'activation des CTL est un processus finement régulé qui nécessite trois signaux principaux fournis par une APC mature permettant ainsi d'empêcher leur suractivation. L'obtention de ces signaux orchestre la prolifération, la migration et l'acquisition des fonctions effectrices des CTL incluant la production de cytokines (IL-2, IFN-γ) et leur activité cytolytique.

La présentation antigénique

La présentation d'Ag par les APC est centrale à l'induction des réponses immunitaires adaptatives et elle constitue une fonction clé des lymphocytes B. On distingue trois voies : la présentation classique et croisée par CMH-I et la présentation par CMH-II permettant l'activation respective des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ (329, 330).

La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe I

Les molécules du CMH-I, HLA (*human leukocyte antigen*)-A, B et C chez l'Homme, sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. Elles sont formées par l'association d'une chaîne lourde transmembranaire polymorphique alpha (αHc) et de la β2-microglobuline (β2m) créant un sillon dans lequel les peptides de 8-10 résidus d'acides aminés s'insèrent (**Figure 4**).

Les CMH-I présentent des peptides dérivés de protéines cytosoliques ou nucléaires synthétisées par la cellule. Dans les cellules saines, toutes les protéines sont des protéines autologues pour lesquelles les lymphocytes T $CD8^+$ sont tolérants (331, 332). Toutefois, lorsque la cellule exprime des protéines avec des séquences mutées (cellules cancéreuses), des protéines dérivées de gènes d'agents pathogènes (infections virales), ou de gènes polymorphiques étrangers (transplantation), ces peptides du non-soi sont présentés ce qui permet aux CTL de détecter et détruire ces cellules anormales (329). Toutes les protéines synthétisées par la cellule sont dégradées en fragments peptidiques par le protéasome 26S qui est un complexe

enzymatique multiprotéique (333) (**Figure 4**). Les cellules immunitaires telles que les DC et lymphocytes B expriment de façon constitutive un immunoprotéasome dont l'expression peut être induite dans les cellules non immunitaires par la stimulation des IFN lors d'une infection virale. Il hydrolyse les protéines au niveau de sites de clivage différents du protéasome et apprête les Ag plus efficacement pour leur présentation sur les CMH-I (332).

La plupart des peptides générés par les protéasomes ont des longueurs variées et sont intégralement dégradés par des peptidases cytosoliques (334, 335). Toutefois, une faible proportion des peptides sont dégradés partiellement puis entrent dans la lumière RE par le transporteur peptidique spécialisé TAP (hétérodimère TAP1/2, *transporter associated with antigen processing*) inséré dans la membrane du RE (336, 337). Dans le RE, les peptides longs sont taillés à une longueur de 8-9 résidus d'acides aminés par les aminopeptidases ERAP1/2 (*ER aminopeptidase 1/2*) afin d'être chargés sur les CMH-I (338) (**Figure 4**).

Dans le RE, les CMH-I vides nouvellement synthétisés sont associés avec des protéines chaperonnes qui participent à leur repliement et facilitent leur recrutement au niveau du complexe de chargement peptidique (*peptide-loading complex*, PLC). Au niveau du PLC, la protéine chaperonne tapasine, associée à TAP (339), maintient les CMH-I dans une conformation ouverte, et facilite le chargement de peptides de haute affinité façonnant ainsi le répertoire des peptides présentés (339, 340) (**Figure 4**). Lorsqu'un peptide est associé de façon stable, les protéines chaperonnes sont libérées et les complexes peptide-CMH-I (pCMH-I) quittent le RE et transitent par l'appareil de Golgi avant de rejoindre la surface de la cellule. Les peptides non associés et les CMH-I ayant un repliement non fonctionnel sont transportés dans le cytosol par le complexe ERAD (*ER-associated degradation*) pour qu'ils soient dégradés (341, 342) (**Figure 4**).

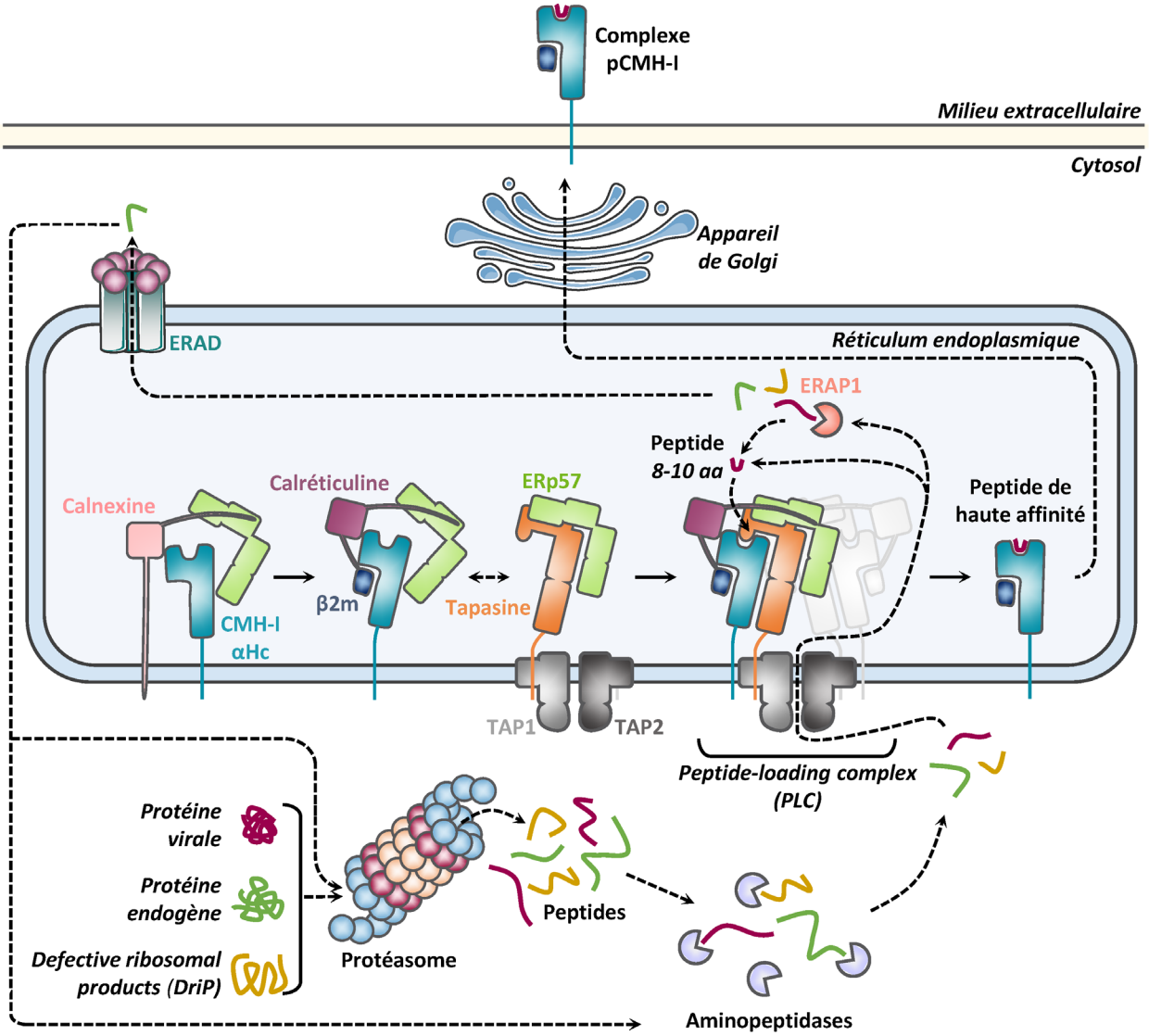


Figure 4. – La voie de présentation par le CMH de classe I [adaptée de (337)]

La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe II

Les molécules du CMH-II, HLA-DR, DP et DQ chez l'Homme, sont principalement exprimées à la surface des APC professionnelles que sont les DC, les Mϕ et les lymphocytes B et présentent des Ag exogènes aux lymphocytes T $CD4^+$ (272, 343). Les cellules non immunitaires peuvent exprimer les CMH-II en réponse à différents stimuli comme l'IFN-γ qui induit l'activation du CIITA (343, 344). Les CMH-II sont assemblés dans le RE, mais leur maturation fonctionnelle et le chargement avec les peptides de 13 à 25 résidus d'acides aminés s'effectue dans le compartiment endolysosomal (345) (**Figure 5**). Les CMH-II sont constitués de deux chaînes polymorphiques α et

β associées la chaîne invariante I (Ii, CD74) qui promeut leur repliement adéquat et protège le sillon peptidique, inhibant ainsi le chargement de peptides dans le RE (346). Une fois assemblé, les complexes Ii-CMH-II quittent le RE et sont guidés vers la membrane plasmique ou le compartiment de CMH-II (*MHC-II compartment*¸ MIIC) (347). Le MIIC correspond aux endosomes tardifs riches en enzymes de dégradation et il existe sous la forme de corps multivésiculaires ou de structures multilamellaires (343, 348) (**Figure 5**). Contrairement aux DC et Mϕ, les lymphocytes B non activés possèdent peu de CMH-II présents dans les endosomes tardifs, ceux-ci sont préférentiellement localisés à la surface cellulaire et dans les endosomes précoces (349).

Les Ag exogènes peuvent être internalisés par phagocytose, pinocytose ou endocytose qui dépend de récepteurs comme c'est le cas pour les lymphocytes B (272, 343). Les lymphocytes B peuvent également endocyter des Ag de façon indépendante du BCR (283). Les vésicules d'endocytose subissent une cascade de changements biochimiques qui entraînent leur évolution en endosomes précoces puis tardifs par la fusion avec les lysosomes. Leur pH acide permet l'activation de nombreuses protéases et enzymes lysosomales comme la réductase GILT (*gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*) (272). Les protéases dégradent les Ag en peptides et catalysent également la protéolyse progressive de la chaîne Ii liée au CMH-II jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un peptide résiduel CLIP (*class II–associated invariant chain peptide*) associé avec le sillon peptidique. Parmi les protéases lysosomales, la cathepsine S est impliquée dans la dernière étape d'hydrolyse menant au peptide CLIP (350) (**Figure 5**).

Par la suite, les CMH-II interagissent avec HLA-DM qui les stabilise dans une conformation induisant la dissociation de CLIP et des peptides de faible affinité, mais catalyse l'association avec des peptides de haute affinité jouant ainsi un rôle d'édition (351). Les fonctions de HLA-DM sont modulées par HLA-DO qui régule ainsi finement le processus de sélection des épitopes présentés (272, 352, 353) (**Figure 5**). L'expression de HLA-DO est majoritairement limitée aux lymphocytes B et est diminuée par leur activation (283, 354, 355). Elle est également exprimée par certaines sous-populations de DC et des cellules épithéliales du thymus (272, 353, 354). Lorsque les CMH-II ont lié un peptide de façon stable, les complexes pCMH-II quittent les endosomes tardifs et transitent jusqu'à la membrane plasmique (272, 343).

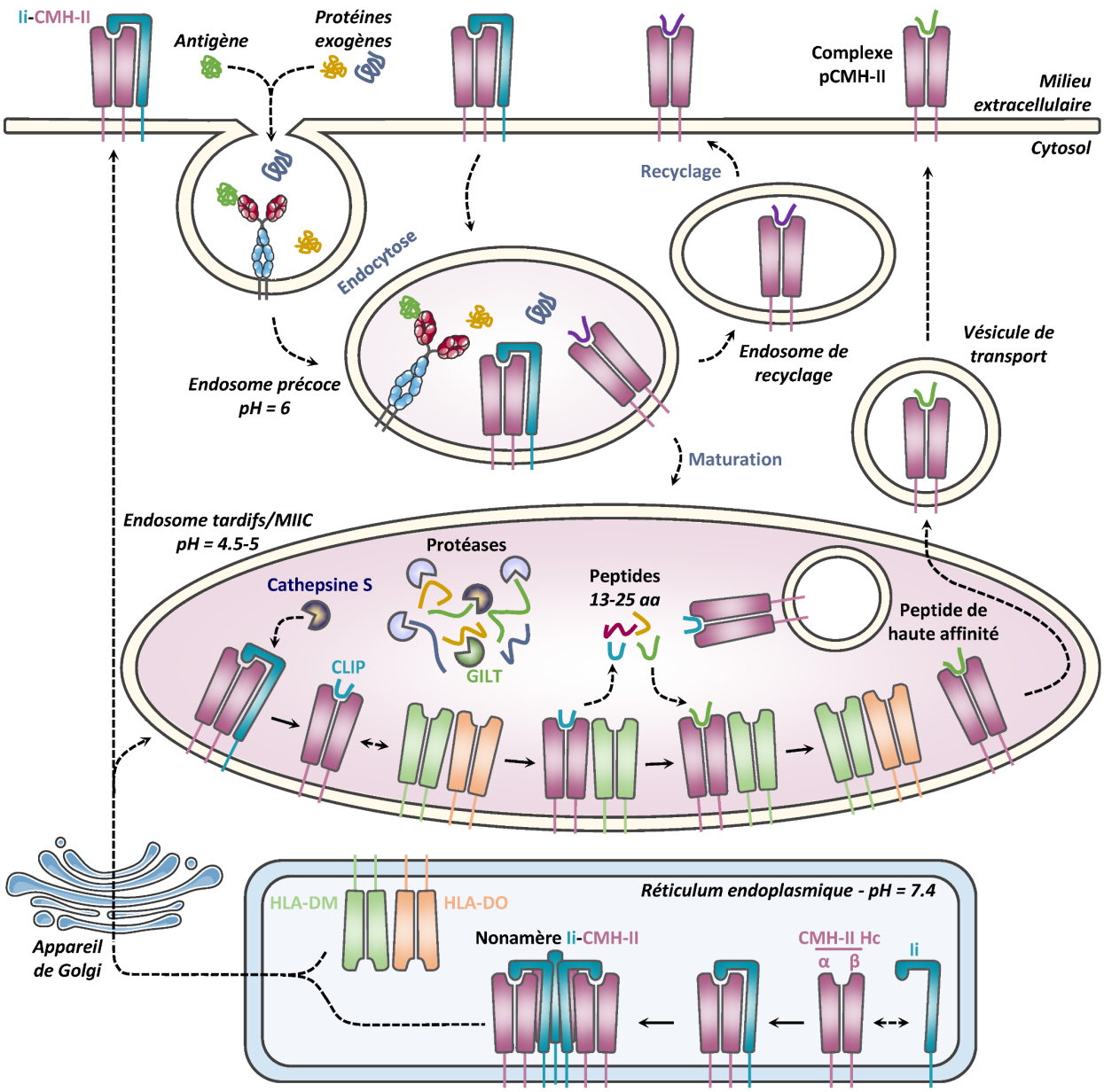


Figure 5. – La voie de présentation par le CMH de classe II

Les voies de présentation croisée d'antigènes

La présentation croisée d'Ag a été décrite pour la première fois en 1976 par Bevan et al., dans un contexte de transplantation allogénique (356). Ce mécanisme consiste en la présentation d'épitopes dérivés des protéines exogènes (protéines extracellulaires, micro-organismes et cellules mortes internalisées) sur les CMH-I afin d'activer les lymphocytes T $CD8^+$. Elle permet ainsi aux APC d'induire la réponse des CTL contre des Ag viraux provenant de virus qui ne les ont pas infectées ou contre des Ag tumoraux. Les mécanismes de présentation croisée ont été

principalement étudiés dans les DC. Les cDC1 ($CD8\alpha^+$ et $CD103^+$ chez la souris et $CD141^+$ chez l'Homme) sont généralement considérées comme les DC les plus efficaces à réaliser la présentation croisée d'Ag exogènes (307). L'étude des cDC1 $CD8\alpha^+$ murines a notamment révélé que ces cellules limitent la dégradation des Ag exogènes par la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) dans les endosomes (357, 358) et possèdent une expression plus élevée des protéines impliquées dans l'apprêtement des Ag pour leur présentation par CMH-I (359). Toutefois, il a été démontré que plusieurs autres sous-populations de DC murines et humaines comme les cDC2 ($CD1c^+$) et les pDC ($CD123^+$) possèdent aussi des capacités de présentation croisée (307, 360, 361). Par ailleurs, nos travaux précédents ont démontré que les cellules CD40-B sont capables de présenter des protéines exogènes par les CMH-I (362, 363). D'autres groupes ont également étudié la capacité de présentation croisée des lymphocytes B *in vitro* et *in vivo* (364-369). Deux voies de présentation croisée distinctes ont été décrites, la voie cytosolique et la voie vacuolaire (307, 330) (**Figure 6**).

La voie cytosolique

Les Ag présentés par la voie cytosolique sont internalisés par phagocytose, pinocytose ou endocytose puis transloquent à travers la membrane du phagosome/endosome. Dans le cytoplasme, ils sont dégradés par le protéasome, dont les sous-unités cytosoliques peuvent s'associer de façon transitoire avec la membrane des phagosomes (370, 371). Les peptides générés sont transportés dans le RE par le transporteur TAP afin d'être apprêtés et chargés sur les CMH-I de façon similaire à la présentation classique par CMH-I (372). Par ailleurs, il a été démontré que des vésicules provenant du compartiment intermédiaire RE-Golgi (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*, ERGIC) fusionnent avec la membrane des endosomes/phagosomes (370, 371, 373) par un mécanisme qui semble dépendre de la protéine Sec22b insérée dans la membrane des vésicules (374). Des protéines du RE telles que le PLC incluant TAP, la tapasine et les CMH-I se retrouvent ainsi au niveau des endosomes/phagosomes. Les peptides générés dans le cytosol peuvent donc retourner dans les mêmes endosomes/phagosomes pour être chargés sur les CMH-I (370, 375, 376). Les CMH-I peuvent aussi provenir de leur recyclage à partir de la membrane plasmique (377) (**Figure 6**). De retour dans les endosomes/phagosomes, les peptides peuvent être taillés à la longueur adéquate pour

leur chargement sur le CMH-I par l'aminopeptidase IRAP (*insulin-regulated aminopeptidase*) qui joue un rôle similaire à ERAP1/2 dans le RE (378) (**Figure 6**). Récemment, il a été démontré que des protéasomes actifs sont recrutés au sein même dans les phagosomes/endolysosomes où ils dégradent les Ag internalisés ce qui facilite le chargement direct des épitopes sur les CMH-I (379).

Les mécanismes par lesquels les Ag sont transportés des endosomes/phagosomes vers le cytosol ne sont pas entièrement caractérisés (380). Les travaux de Singh et al., ont démontré que la réductase lysosomale GILT est essentielle à la présentation croisée par son rôle dans le dépliement des Ag qui est requis pour leur translocation avant qu'ils soient repliés dans le cytosol par la protéine chaperonne HSP90 (*heat shock protein 90*) (381, 382). Il a été proposé que le complexe ERAD et notamment les protéines Sec61, pourraient former le translocon responsable de l'export des Ag exogènes des endosomes/phagosomes vers le cytosol de façon similaire à leur rôle dans le transport des protéines mal repliées du RE vers le cytosol (341, 383-386) (**Figure 6**). L'AAA-ATPase p97 requise pour les fonctions d'ERAD semble également importante pour la présentation croisée en permettant de fournir l'énergie nécessaire à la translocation des Ag (383, 384, 387, 388). Il est possible que la translocation des Ag requière différents mécanismes. Dans les DC, il a été suggéré que les Ag pourraient être relargués dans le cytosol à cause d'une fuite des endosomes résultant de dommages membranaires causés par la peroxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène produites par le complexe NOX2 (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase 2) inséré dans la membrane endosomale (389) (**Figure 6**).

La voie vacuolaire

Lors de la présentation croisée par la voie vacuolaire, l'ensemble des processus d'apprêtement et de chargement de l'Ag s'effectue uniquement dans les compartiments endolysosomaux. Les Ag internalisés sont dégradés par les protéases lysosomales et les peptides sont chargés sur les CMH-I dans le même compartiment où s'effectue la dégradation (**Figure 6**). Cette voie de présentation n'est pas affectée par des inhibiteurs ciblant le protéasome, ou la déficience en TAP. Toutefois, certaines études ont rapporté une voie de présentation croisée vacuolaire qui dépend de TAP, car sa déficience inhibe l'export du RE de certains CMH-I nouvellement synthétisés (390). La cathepsine S joue un rôle prééminent dans la dégradation des Ag dans la voie vacuolaire par sa propriété unique lui permettant d'être hautement active au pH

neutre requis pour le chargement des peptides sur les CMH-I (391). D'autres protéases semblent impliquées dans la génération des peptides pouvant s'associer au CMH-I dans le compartiment endosomal comme IRAP (392). Certaines études rapportent l'importance des endosomes de recyclage pour le chargement des peptides dans la voie vacuolaire (393, 394) (**Figure 6**).

Bien que la plupart des études rapportées décrivent majoritairement la présentation croisée cytosolique, certains Ag semblent emprunter intégralement une voie vacuolaire. Par exemple, la nucléotidase de *Leishmania major* est présentée par cette même voie (395). Le virus influenza est présenté par une voie rapide indépendante du protéasome par les pDC (393). Dans un modèle murin déficient en TAP, l'engagement du TLR-9 par l'ADN riche en motifs CpG augmente l'efficacité de la présentation croisée de l'ovalbumine (OVA) soluble par la voie vacuolaire (396). Le couplage d'un peptide avec la protéine HSP90 permet une présentation croisée par les BMDC indépendamment de TAP, mais qui dépend de la cathepsine S et qui est sensible aux inhibiteurs des lysosomes (394). Notre laboratoire a également démontré que des épitopes insérés dans des VLP du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) sont présentés par une voie de présentation croisée indépendante du protéasome dans les cellules CD40-B (362). Nos travaux subséquents ont suggéré un mécanisme similaire pour la présentation d'épitopes insérés dans une autre VLP dérivée d'un virus de plante (363).

Par ailleurs, deux études récentes ont démontré que de longs peptides dérivés des Ag du mélanome gp100 (glycoprotéine 100), MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cells 1*) et MAGE-A3 (*melanoma-associated antigen 3*) sont apprêtés puis présentés par la voie vacuolaire dans les MoDC immatures humaines (390, 397). Le chargement des peptides s'effectue sur des CMH-I nouvellement synthétisés. Ces CMH-I suivent une voie de sécrétion alternative pour atteindre les endolysosomes où les peptides chargés dans le RE sont alors échangés par les épitopes dérivés des Ag (390, 397). Contrairement à gp100 qui est présenté par HLA-A2, l'épitope de MAGE-A3 est présenté par HLA-A1 et sa présentation croisée dépend indirectement de TAP. Par son rôle, TAP permet le chargement de peptides dans le RE qui une étape essentielle pour l'export de HLA-A1 afin qu'il atteigne les endolysosomes où l'échange pour le peptide de MAGE-A3 s'effectue (390). De façon similaire, Tung-Huau et al., ont isolé des MoDC et des Mϕ dérivés de monocytes à partir d'ascites de la cavité péritonéale de patients atteints de cancer, et

ont démontré que ces cellules apprêtent et présentent l'Ag long MART-1 exclusivement par une voie vacuolaire qui dépend des cathepsines, mais est indépendante du protéasome (398).

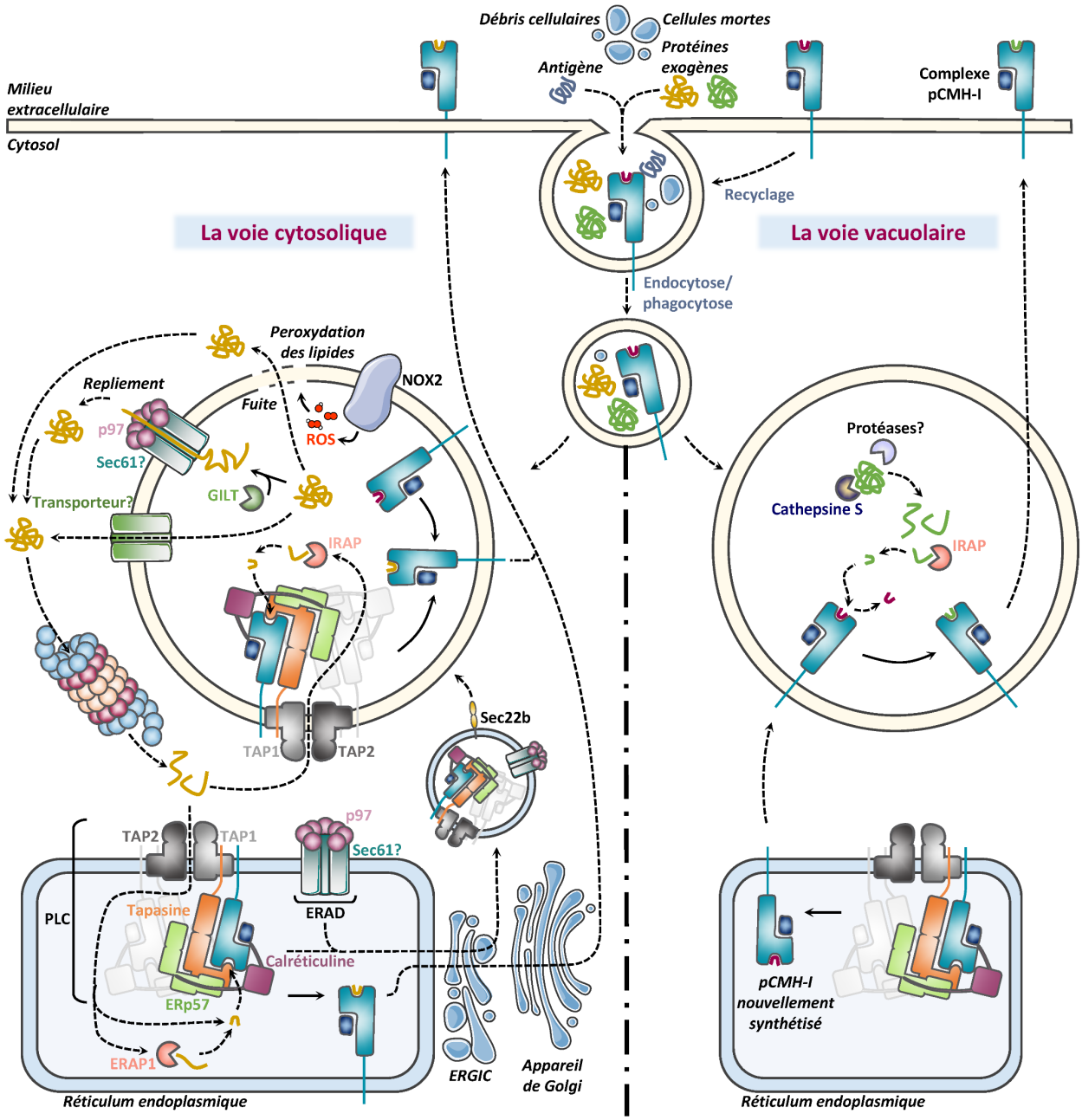


Figure 6. – Les voies de présentation croisée d'antigènes [adaptée de (307)]

L'implication de l'autophagie dans les voies de présentation d'antigènes

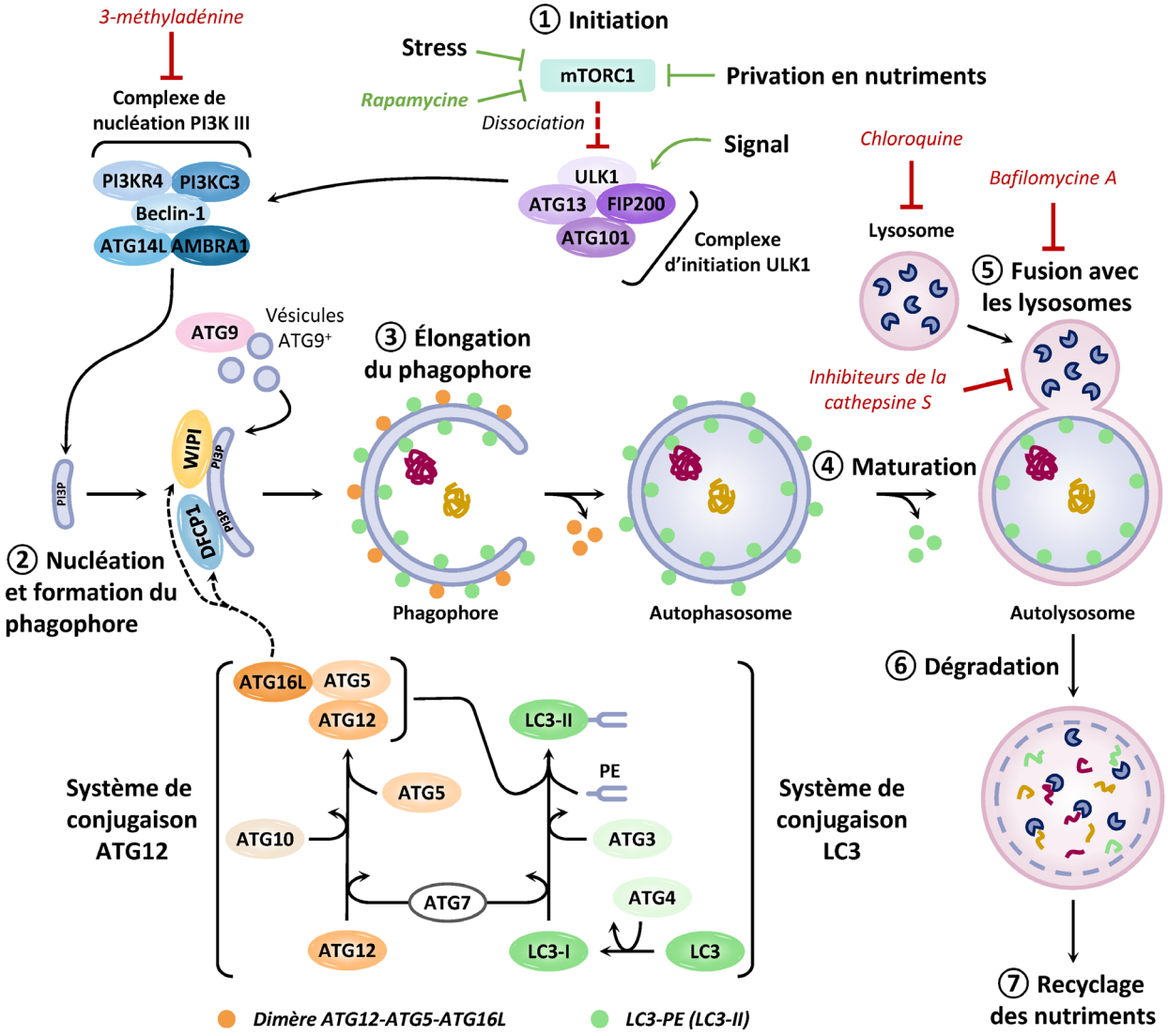
L'autophagie ou digestion (phagie) de soi (auto) est un mécanisme constitutif conservé qui permet aux cellules de dégrader des protéines cytosoliques et des organites endommagés. Elle

représente également une réponse de la cellule à des signaux de stress tels que la privation en nutriments. Par ce processus, la cellule recycle les éléments de bases résultant de la dégradation pour synthétiser de nouveaux composants cellulaires et produire l'énergie suffisante au maintien de ses fonctions et à sa survie. Trois mécanismes ont été décrits : la microautophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (399) et la macroautophagie (400). Nous décrirons seulement la macroautophagie que nous nommerons simplement autophagie et qui implique les protéines ATG (*autophagy-related proteins*) (400, 401) (**Figure 7**).

Tout d'abord, la privation en nutriments ou d'autres signaux de stress induisent l'inhibition de mTORC1 (*mTOR complex 1*) ce qui provoque la dissociation du complexe ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*) et l'initiation de l'autophagie (402, 403). Il s'en suit le processus de nucléation qui consiste en la formation d'un segment membranaire appelé phagophore, par l'activité du complexe de nucléation constitué notamment de la PI3K de classe III (PIK3C3/PIK3R4) (404). Ce complexe catalyse la formation du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau de la membrane du phagophore (405) ce qui mène au recrutement de deux complexes protéiques de conjugaison qui permettent son élongation et la formation de l'autophagosome.

L'élongation dépend de deux réactions de conjugaison semblables aux réactions d'ubiquitination (406). Lors de la première réaction, ATG7 et ATG10 catalysent la liaison covalente d'ATG12 à ATG5, puis ATG16L1 se lie à ATG5. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 se dimérise puis interagit avec le complexe de liaison PI3P par l'intermédiaire d'ATG16L1 (407), et promeut la réaction de conjugaison de LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) (408). LC3 est clivé par la protéase ATG4 pour former LC3-I qui est ensuite conjugué au lipide phosphatidyléthanolamine (PE) par ATG7 et ATG3 générant ainsi LC3-II. Ce conjugué est incorporé dans les membranes du phagophore et de l'autophagosome où LC3 peut interagir avec des cargos qui arborent des motifs d'interaction avec LC3 (406). Les membranes pour l'expansion du phagophore sont en partie fournies par des vésicules arborant ATG9 (409). LC3-II est incorporé dans la membrane jusqu'à la fusion avec les lysosomes où alors seule la fraction intravacuolaire reste associée à l'autophagosome, les autres protéines sont recyclées. Suivant la fusion avec les lysosomes le contenu des autophagosomes est dégradé (410) et les produits obtenus sont

relargués dans le cytosol par des perméases lysosomales, puis recyclés pour générer de nouveaux constituants cellulaires et de l'énergie (**Figure 7**).



AMBRA1 : *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*; **DFCP1** : *zinc-finger FYVE domain-containing protein 1*; **FIP200** : *RB1-inducible coiled-coil protein 1*; **WIPI** : *WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins*.

Figure 7. – Le mécanisme de la macroautophagie [adaptée de (400)]

L'autophagie est un processus à plusieurs étapes incluant ①l'initiation, ②la nucléation et la formation du phagophore, ③l'élongation du phagophore, ④la maturation, ⑤la fusion avec les lysosomes, ⑥la dégradation et ⑦le recyclage des nutriments. Le **3-méthyladénine** (3-MA) inhibe le complexe de nucléation PI3K III. La **chloroquine** inhibe l'acidification des lysosomes. Les **inhibiteurs de la cathepsine S** affectent spécifiquement cette protéase. La **bafilomycine A** inhibe la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. L'autophagie peut être induite par le traitement à la **rapamycine** ou la **privation en nutriments** pour inhiber mTORC1.

Le suivi de la génération de LC3-II par *western blot* ou par microscopie à fluorescence lorsque LC3 est fusionnée à une protéine fluorescente comme la *green fluorescent protein* (GFP) est l'une des méthodes permettant d'étudier l'autophagie dans les cellules. Cette méthode nécessite des contrôles adéquats comme l'utilisation d'inhibiteurs ciblant spécifiquement des étapes clés du processus (**Figure 7**), car une augmentation de la forme LC3-II peut représenter tant une induction de l'autophagie que le blocage de la dégradation des autophagosomes (411).

L'autophagie est impliquée dans les réponses du système immunitaire tant inné qu'adaptatif (412) et est notamment importante pour le développement et les réponses des lymphocytes B (413, 414). Les protéines régulant l'autophagie jouent également des rôles dans de multiples processus cellulaires comme l'endocytose, la phagocytose et le trafic vésiculaire (415). L'autophagie est impliquée dans les différentes voies de présentation d'Ag (416, 417).

La présentation d'antigènes par le CMH de classe I

Plusieurs études ont démontré que l'autophagie est impliquée dans la présentation classique et croisée par CMH-I, mais les mécanismes décrits sont très variés (418). Lors de la phase tardive de l'infection de Mϕ par le virus de l'Herpès simplex de type 1 (HSV-1), l'autophagie permet une première dégradation de la glycoprotéine B dans les autolysosomes puis les polypeptides générés sont pris en charge par le protéasome cytosolique (419, 420). Budida et al., ont aussi rapporté un rôle de l'autophagie dans la dégradation et la présentation des Ag viraux de HSV-1 par les BMDC (421). L'autophagie est impliquée dans la présentation de peptides dérivés de la protéine pUL138 du cytomégalovirus humain (*human cytomegalovirus*, HCMV) selon une voie indépendante du protéasome et de TAP, dont le chargement des CMH-I se déroule dans les compartiments endosomaux (422).

L'autophagie semble également jouer un rôle dans la présentation croisée par CMH-I, mais son implication diverge selon les études et la méthodologie employée (423). Premièrement, l'autophagie induite dans les cellules mortes améliore la présentation croisée par les DC des Ag viraux ou tumoraux associés à ces cellules mortes (424-426). Mintern et al., ont rapporté que l'autophagie est induite dans les sous-populations de DC murines et humaines spécialisées dans la présentation croisée (427). En utilisant des DC murines déficientes en ATG7, ils ont mis en

évidence que l'autophagie est requise pour la présentation croisée de l'OVA soluble, mais n'est pas nécessaire lorsque cet Ag est ciblé vers un récepteur ou associé à des cellules mortes (427). Au contraire, Parekh et al., ont décrit que l'induction de l'autophagie est nécessaire à la présentation croisée de l'OVA associée à des cellules mortes, mais est dispensable lorsque l'Ag est sous forme soluble, ciblé vers un récepteur ou associé à une bactérie (428). Dans les BMDC, il a été démontré que l'induction de l'autophagie est requise pour dégrader des Ag dérivés de la bactérie *Chlamydia* et générer des peptides qui sont ensuite présentés par une voie cytosolique qui dépend du protéasome et de TAP. Les auteurs ont aussi décrit que le chargement des peptides s'effectue dans les amphisomes, des structures résultant de la fusion des autophagosomes avec les endosomes de recyclage (376). Enfin, Dasari et al., ont rapporté que les cellules EBV-B présentent l'Ag soluble pp65 du HCMV endocyté par une voie de présentation croisée qui dépend du protéasome, mais pas de TAP et implique l'autophagie, car la présentation aux CTL est inhibée par le 3-MA et des *short-hairpin RNA* (shRNA) ciblant l'ARN messager (ARNm) codant pour ATG5 ou ATG12. De plus, les peptides sont chargés sur les CMH-I dans les autophagosomes (364).

Des études ayant ciblé des Ag vers les autophagosomes par conjugaison ont rapporté des résultats opposés. La conjugaison à LC3 n'a pas d'impact significatif sur leur présentation par CMH-I (429) tandis que des Ag tumoraux conjugués à des nanoparticules sont présentés efficacement par présentation croisée par les DC et induisent une réponse antitumorale (430).

La présentation d'antigènes par le CMH de classe II

L'étude du peptidome par spectrométrie de masse a révélé qu'environ 20 à 30 % des peptides présentés sur les CMH-II par les lymphocytes B et les DC sont dérivés de protéines cytosoliques ou nucléaires (431-433), suggérant l'implication de l'autophagie dans le transport de ces Ag vers les compartiments vacuolaires comme le MIIC où ils sont apprêtés et chargés. Plusieurs évidences ont confirmé le rôle de l'autophagie dans la présentation par CMH-II.

Tout d'abord, le ciblage des Ag aux autophagosomes par leur conjugaison à LC3 augmente la présentation d'Ag viraux (429, 434, 435) et tumoraux (436) aux lymphocytes T $CD4^+$ spécifiques. Le traitement des cellules EBV-B par des inhibiteurs de l'autophagie bloque la présentation par CMH-II de la néomycine phosphotransférase II cytosolique (437). Similairement, l'inhibition de

l'autophagie par le 3-MA ou des *small interfering RNA* (siRNA) ciblant ATG12 (438) ou ATG7 (439) compromet l'apprêtement intracellulaire de l'Ag EBNA1 (*nuclear antigen 1 of the EBV*) et sa présentation par CMH-II par les cellules EBV-B. Il a également été rapporté que la perte de l'expression d'ATG5 par les DC murines compromet les réponses antivirales des lymphocytes $CD4^+$ contre HSV-1 (440). De façon similaire, Thiele et al., ont démontré que le virus modifié de la vaccine Ankara induit l'autophagie dans les BMDC et son inhibition par le 3-MA, la bafilomycine A ou la déficience en ATG7 diminue la stimulation des lymphocytes T $CD4^+$. Par ailleurs, du fait de l'importance de l'autophagie dans la présentation par CMH-II, de nombreux agents infectieux tant bactériens que viraux ont développé des moyens de l'inhiber (441, 442).

Le rôle de l'autophagie dans la présentation par CMH-II est important dans la sélection du répertoire des lymphocytes T $CD4^+$ par les cellules épithéliales du thymus qui possèdent un haut niveau d'autophagie constitutive (443, 444). L'utilisation de souris dont les cellules épithéliales thymiques sont déficientes en ATG5 a démontré que l'autophagie est essentielle à la tolérance centrale et à la régulation du répertoire des lymphocytes T $CD4^+$ (443, 444). Dans ce contexte, l'autophagie permet de transporter les protéines endogènes dans le compartiment vacuolaire pour les présenter par CMH-II et permettre la sélection des lymphocytes T $CD4^+$ (445).

Du fait de l'implication de l'autophagie dans les voies de présentation d'Ag, sa modulation constitue une approche intéressante afin d'augmenter l'efficacité des vaccins et améliorer les réponses immunitaires (446). Dans les prochaines sections, les différentes formes de vaccination qui activent l'immunité cellulaire seront abordées.

La vaccination

Les premiers succès de vaccination sont attribués à Edward Jenner en 1796 et Louis Pasteur en 1885 pour leurs travaux ayant mené au développement respectif des vaccins contre la variole et la rage (447). Depuis ces travaux fondamentaux, de nombreuses stratégies vaccinales ont été développées. L'objectif de la vaccination est d'induire une première réponse immunitaire adaptative contre un agent infectieux ou un Ag afin de générer une mémoire immunitaire qui protégera l'hôte d'une réinfection. Pour se faire, il est essentiel de tirer parti des APC. Les Ag de petite taille (<200 nm) diffusent librement de la périphérie vers les SLO et peuvent être reconnus

directement par les lymphocytes B (448). En revanche, les Ag de grande taille ou les agents pathogènes constituants les vaccins sont capturés par les DC immatures recrutées au niveau du site d'injection. L'activation des PRR par l'agent vaccinal ou par l'adjuvant conduit à la maturation des DC et à leur migration vers les SLO afin d'induire à la fois la réponse humorale des lymphocytes B et T_H $CD4^+$ et la réponse cellulaire des CTL effecteurs. La production d'Ab neutralisants empêche les micro-organismes circulants d'infecter les cellules alors que les CTL sont essentiels pour éliminer les niches infectieuses correspondant aux cellules infectées.

Les stratégies de vaccination pour induire une réponse humorale sont très efficaces contrairement à celles visant à induire une réponse cellulaire. Il n'y a pas eu d'avancées majeures dans la vaccination contre les agents pathogènes responsables d'infections chroniques comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou les cancers qui requièrent l'induction d'une réponse cellulaire efficace. Depuis quelques années, la propagation rapide de plusieurs infections sévères causées par les virus Ebola, Zika et les coronavirus (CoV) associés au syndrome respiratoire aigu sévère (*severe acute respiratory syndrome*, SARS) SARS-CoV et SARS-CoV-2 ont mis en avant la nécessité d'une mise au point très rapide de vaccins conférant une protection à long terme. De plus, le développement de vaccins contre le cancer est d'autant plus difficile. Contrairement à la vaccination prophylactique contre les agents infectieux, elle a un but thérapeutique visant à induire des CTL efficaces pour reconnaître des Ag tumoraux et éliminer les cellules cancéreuses afin de contrôler la maladie établie ou résiduelle. La **Figure 8** illustre de façon non exhaustive les différentes formes de vaccination.

Les stratégies de vaccination induisant l'immunité cellulaire

Les vaccins conventionnels utilisant des agents infectieux sous forme atténuée ou inactive ont permis d'éradiquer ou de diminuer significativement la prévalence de maladies. Bien que les formes atténuées aient une capacité d'infection et de réplication affaiblie, ils génèrent des réponses humorales et cellulaires à long terme. Cette stratégie ne peut toutefois pas être généralisée, car certains agents infectieux sont trop virulents et présentent un risque de réversion à leur forme infectieuse rendant cette approche très risquée pour les agents extrêmement pathogéniques et infectieux comme le VIH. La génération de formes vivantes atténuées est

également plus difficile pour certains micro-organismes complexes comme les bactéries. Enfin, l'inactivation peut rendre l'agent infectieux inefficace dans l'induction d'une réponse protectrice ou peut conduire à des effets indésirables (449, 450).

Il est également possible d'inoculer des protéines antigéniques recombinantes plus ou moins complexes telles que des sous-unités de micro-organismes. La prédiction et l'identification des épitopes reconnus par le TCR permettent l'utilisation des séquences peptidique afin d'activer les CTL. Toutefois, les peptides injectés *in vivo* ont une faible demi-vie et sont souvent peu immunogéniques. Il est nécessaire de les conjuguer ou de les modifier pour améliorer leur stabilité et leur immunogénicité (451, 452), ainsi que de délivrer un adjuvant approprié pour soutenir une réponse immunitaire satisfaisante (453, 454). Une des stratégies possibles est la formation de VLP que nous détaillerons dans la section suivante.

Une réponse cellulaire peut être générée par la vaccination avec des acides nucléiques codants pour des Ag d'agents infectieux ou tumoraux qui seront traduits puis présentés sur les CMH-I des cellules. Les acides nucléiques peuvent être sous forme de plasmide ADN, d'ARNm ou de gènes insérés dans le génome de virus non apparentés et génétiquement modifiés constituants des vecteurs viraux (455-457). Ces plateformes vaccinales permettent d'insérer d'autres gènes codant pour des adjuvants moléculaires comme des ligands des PRR, différentes cytokines ou encore des ARN interférents (ARNi) dans le but de stimuler l'activation des DC et d'augmenter leur immunogénicité (458). De nombreux vaccins à ADN contre le cancer ont été évalués par des études cliniques de phase I, I/II et II (459, 460). Une étude de phase II utilisant un vaccin à ADN (VGX-3100) contre le cancer du col de l'utérus ciblant les protéines E6 et E7 du papillomavirus humain (*human papillomavirus*, HPV) a montré une induction significative des CTL(461) et deux études de phase III sont en cours (460). L'utilisation d'ARNm codant pour l'Ag d'intérêt est également une avenue prometteuse (462-464). De nombreuses plateformes vaccinales à ARNm contre des maladies infectieuses et des cancers ont rapporté des résultats encourageants dans les modèles précliniques (456). L'efficacité des différentes technologies de vaccins à ARNm est actuellement évaluée par de nombreuses études cliniques (465, 466).

L'utilisation de virus oncolytiques comme vaccins thérapeutiques contre le cancer est en expansion (467). Ces virus infectent et se répliquent préférentiellement dans les cellules tumorales causant leur mort et le relargage d'Ag tumoraux et débris viraux. En 2015, la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis a approuvé le talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic™) constitué du virus HSV-1 atténué et génétiquement modifié pour se répliquer dans les cellules du mélanome et produire le GM-CSF (468). D'autres candidats sont en cours d'étude à diverses phases cliniques (469).

Une des stratégies les plus directes pour stimuler la réponse cellulaire est la vaccination cellulaire; aussi appelée thérapie cellulaire. Plusieurs vaccins utilisent des cellules tumorales irradiées et modifiées génétiquement pour exprimer des cytokines, chimiokines ou des molécules de costimulation pour induire une réponse immunitaire robuste. Plusieurs études cliniques de différentes phases utilisant cette plateforme vaccinale sont actuellement à l'étude. Par exemple, le vaccin OncoVAX® est constitué de cellules du cancer du côlon autologues irradiées et combinées aux Bacilles Calmette-Guerin atténués comme adjuvant (470). Les vaccins GVAX® sont quant à eux constitués de cellules tumorales allogéniques ou autologues du patient qui sont modifiées génétiquement pour exprimer le GM-CSF puis irradiées. Les vaccins GVAX ont notamment été évalués dans le traitement du cancer de la prostate (471), du mélanome (472), du cancer du pancréas (473) et du poumon (474). Bien que ces études emploient des stratégies similaires, les formulations des vaccins GVAX varient. Par exemple, des patients atteints d'un cancer du pancréas avancé ont été traités avec un vaccin constitué de deux lignées cellulaires de cancer du pancréas modifiées pour secréter du GM-CSF et administrées seules ou de façon séquentielle avec du cyclophosphamide (473). En revanche, lors d'une étude de phase I, des patients souffrant d'un cancer du poumon non à petites cellules métastatique ont reçu une injection intradermique et sous-cutanée d'un vaccin GVAX formulé à partir de cellules tumorales autologues isolées de métastases pulmonaires et infectées par un vecteur adénoviral codant pour le GM-CSF (474). Ces différentes études ont rapporté une efficacité limitée des vaccins GVAX malgré leur capacité à stimuler les réponses immunitaires. Par ailleurs, deux études cliniques de phase III ayant évalué l'injection de lignée allogéniques de cancer de la prostate ont été arrêtées précocement par manque d'effet thérapeutique (475).

Récemment, la combinaison des vaccins GVAX aux Ab monoclonaux bloquant les points de contrôle immunitaires a été évaluée et plusieurs études cliniques sont en cours, notamment dans le cancer du pancréas. Une étude de phase II menée chez des patients atteints d'un cancer du pancréas a comparé l'efficacité d'un vaccin GVAX associé à l'Ipilimumab (anti-CTLA-4) comme thérapie de maintenance, comparativement à la poursuite du traitement de chimiothérapie. Bien que des réponses immunitaires aient été observées, l'étude a été arrêtée prématurément car le traitement n'améliorait pas la survie globale. Au contraire, les patients ayant reçu la combinaison de thérapie démontraient une survie diminuée comparativement à ceux traités par chimiothérapie (476). De façon similaire, la combinaison d'un vaccin GVAX/cyclophosphamide et du Pembrolizumab (anti-PD-1) n'a pas conduit à des réponses objectives chez les patients atteints de cancer colorectal dans une étude de phase II (477). En 2015, Le et al., ont rapporté que le traitement de patients atteints d'un cancer du pancréas avec un vaccin GVAX/cyclophosphamide combiné à la forme atténuée de *Listeria monocytogenes* exprimant l'Ag tumoral mésothéline, menait à une amélioration de la survie globale (478). Une étude récente a évalué si l'addition du Nivolumab (anti-PD-1) à ce traitement pouvait en augmenter l'efficacité. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'observer une amélioration de la survie globale (479).

Une autre stratégie de vaccination cellulaire correspond à l'utilisation d'APC autologues chargées *ex vivo* avec des (néo)-Ag (protéines/peptides) ou transfectées avec des acides nucléiques pour présenter l'Ag, avant de les réinjecter aux patients (480, 481). En 2010, la FDA a approuvé l'utilisation du Sipuleucel-T (Provenge®) pour le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration hormonale chez les patients asymptomatiques et n'ayant pas de métastases viscérales (482). Ce vaccin est formulé à partir d'APC autologues du patient. Les cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells,* PBMC) sont collectées par leucaphérèse puis les précurseurs de DC sont isolés des leucocytes par deux gradients de densité successifs. Ces cellules sont ensuite chargées et activées pendant 36 à 44 heures avec l'Ag PA2024 constitué de la phosphatase acide prostatique (une enzyme surexprimée dans 95 % des cancers de la prostate) fusionnée au GM-CSF (482-485). Les patients reçoivent trois infusions intraveineuses de Sipuleucel-T, espacées de deux semaines, contenant au moins 40 millions de cellules exprimant CD54/ICAM-1 (485). Les études cliniques ont rapporté que plus

de 95 % des patients subissent des effets secondaires, toutefois ceux-ci sont légers et se dissipent quelques jours après chaque infusion (484, 485). La vaccination avec le Sipuleucel-T permet de prolonger la survie globale médiane d'environ 4 mois comparativement au placebo, mais elle n'améliore pas la survie sans progression (482).

Les essais cliniques de phase I et II ont mis en évidence que les hommes traités avec le Sipuleucel-T développent des réponses des lymphocytes T spécifiques à PA2024 dès la première infusion. Une réponse humorale est aussi induite car une augmentation des IgM et IgG spécifiques de PAP et du GM-CSF est observée (483, 486). Par ailleurs, l'étude de phase II menée par Fong et al., a démontré qu'en plus des réponses des lymphocytes T périphériques (prolifération et production d'IFN-γ), le Sipuleucel-T administré comme thérapie néoadjuvante (avant une prostatectomie radicale) conduit à une augmentation de l'infiltration immunitaire à l'interface de la tumeur comparativement à la biopsie obtenue prétraitement et aux hommes n'ayant pas reçu la thérapie néoadjuvante. L'infiltrat immunitaire est constitué de lymphocytes T $CD3^+$, T_H $CD4^+FOXP3^-$, T $CD8^+$ et dans une moindre mesure de lymphocytes T_{REG} $CD4^+FOXP3^+$ et de lymphocytes B. La majorité des lymphocytes T $CD3^+$ expriment PD-1 et Ki-67 suggérant qu'il s'agit de lymphocytes T activés (487). Actuellement, des études évaluent l'efficacité du Sipuleucel-T administré aux patients ayant un stade de cancer plus précoce ou bien comme thérapie néoadjuvante. Sa combinaison avec d'autres immunothérapies est également en cours d'étude afin d'améliorer les réponses immunitaires. Par exemple, une étude clinique de phase Ib évalue la séquence d'administration de l'Atezolizumab (anti-PD-L1) et du Sipuleucel-T pour le traitement de patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration hormonale, asymptomatiques ou peu symptomatiques (482).

Les vaccins anticancers formulés à partir de DC sont un type d'immunothérapie en développement dont l'efficacité contre différents types de cancer est actuellement évaluée par de nombreuses études cliniques (295, 488). Outre l'utilisation des DC, les lymphocytes B constituent une source alternative d'APC. Des essais précliniques animaux ont rapporté des résultats encourageants quant à l'utilisation clinique des cellules CD40-B comme vaccin cellulaire contre le cancer (291). Par exemple, une étude a évalué le traitement de chiens atteints d'un lymphome non hodgkinien avec un vaccin constitué de cellules IL-4-CD40-B autologues

électroporées avec des ARNm codants pour des Ag tumoraux. Les résultats rapportés indiquent que les lymphocytes B jouent leur rôle d'APC *in vivo* et stimulent la sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes T spécifiques d'un Ag tumoral. De plus, la vaccination a accentué les effets du traitement de sauvetage par chimiothérapie et a amélioré le taux de deuxième rémission (489).

Finalement, il est également possible de réaliser un transfert adoptif de CTL (*adoptive cell transfer*, ACT) (490). Les tumeurs sont excisées des patients par chirurgie et les CTL infiltrant les fragments tumoraux (*tumor-infiltrating lymphocyte,* TIL) sont multipliés extensivement *in vitro* avant d'être réinjectés au patient. Cette thérapie personnalisée permet le traitement du mélanome métastatique avec une bonne efficacité (491, 492). Des études tentent d'améliorer le protocole d'expansion existant et d'étendre cette stratégie à d'autres types de cancers (490, 493, 494). Récemment, une étude de phase II utilisant la thérapie par TIL pour le traitement des cancers épithéliaux provoqués par HPV a rapporté une régression des tumeurs à la suite du traitement (495). Si l'Ag associé aux tumeurs est identifié, il est possible d'employer des lymphocytes T $CD8^+$ génétiquement modifiés pour exprimer un TCR transgénique ou un récepteur d'Ag chimérique (*chimeric antigen receptor*, CAR) ciblant spécifiquement cet Ag. Bien que prometteuse, cette stratégie se révèle efficace que pour les tumeurs hématologiques (496).

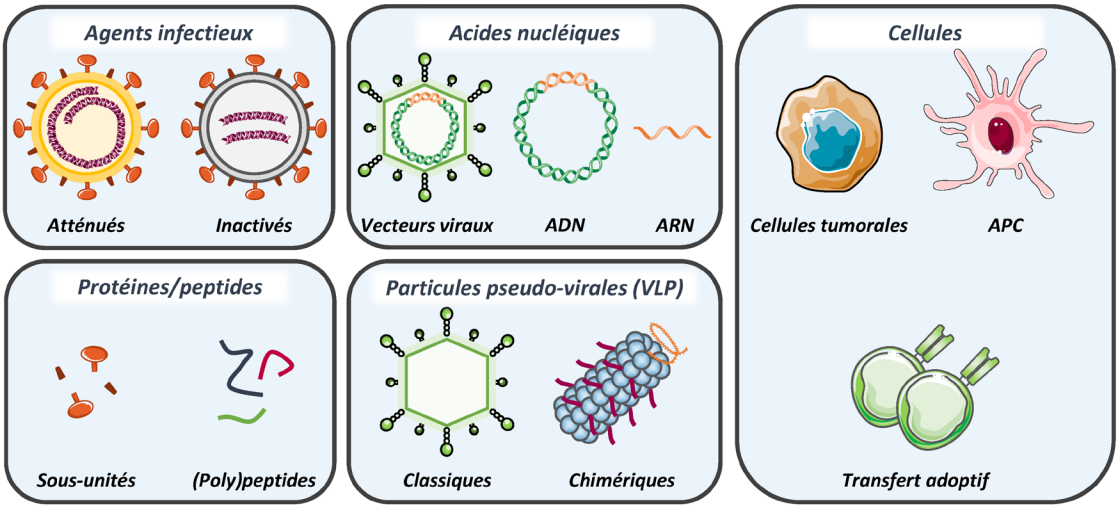


Figure 8. – Les diverses plateformes vaccinales

Les particules pseudo-virales

Les VLP font partie de la famille des nanoparticules. Ce sont des structures supramoléculaires formées par l'autoassemblage répétitif d'une ou plusieurs protéines qui s'organisent en structures icosaédriques ou hélicoïdales pouvant être enveloppées de lipides, ressemblant ainsi aux virus nus ou enveloppés. Du fait de l'organisation des protéines virales dans leur conformation physiologique, elles miment les épitopes antigéniques des virus naturels sans posséder de génome viral ce qui les rend non infectieuses, non réplicatives et donc non pathogènes (497, 498). Leur nature particulaire répétitive rend les VLP immunogènes. Elles sont reconnues par les différents types de PRR exprimés par les APC, dont les DC qui les internalisent afin de les présenter (499). Les VLP peuvent aussi induire directement l'activation des lymphocytes B (500), menant ainsi à de fortes réponses cellulaires et humorales (501, 502). De plus, les VLP peuvent être produites à large échelle et à faibles coûts dans de nombreux systèmes d'expression, et être obtenues avec le degré de pureté requis selon les normes *Good Manufacturing Practices* (503). Les VLP peuvent servir de plateforme d'échafaudage pour des Ag. Les protéines de structures peuvent être modifiées génétiquement ou chimiquement afin d'intégrer un épitope d'un virus hétérologue ou d'un Ag tumoral ou être couplées à des protéines entières (498, 504, 505). Leur immunogénicité peut être augmentée en codélivrant différents adjuvants ou bien par l'encapsulation directe d'adjuvants moléculaires dans la VLP (498, 506).

Plusieurs vaccins prophylactiques utilisant des VLP ont été développés et sont disponibles sur le marché. Le vaccin contre le virus de l'hépatite B généré il y a plus de 30 ans est le premier exemple du succès des VLP (507). Plus récemment, les vaccins Cervarix™ (GlaxoSmithKline) et Gardasil® (Merck) utilisent des VLP formées de la protéine L1 de deux (Cervarix™), quatre (Gardasil®) ou neuf (Gardasil®9) souches du virus HPV dont l'infection est liée au développement de cancers comme le cancer du col de l'utérus. Ces VLP induisent de fortes réponses humorales générant des Ab neutralisants contre les souches de virus HPV ciblées (508). Le vaccin Hecolin®, approuvé en Chine, est formulé à partir d'une VLP constituée de la protéine de structure pORF2 tronquée du virus de l'hépatite E et les résultats rapportés indiquent qu'il fournit une protection contre le virus (509). Plusieurs autres VLP sont en cours de développement ou en évaluation clinique et préclinique (498) et ont pour objectif la prévention de la malaria (510, 511) et des

infections virales aux virus Chikungunya, Zika (512), influenza (513-515), de l'hépatite C (516), VIH (517, 518) ou même Ebola (519). En mars 2020, la compagnie québécoise Medicago a rapporté le développement d'une VLP du virus SARS-CoV-2 (CoVLP) constituée de la glycoprotéine *spike* (S) recombinante produite dans la plante *Nicotiana benthamiana*. Les résultats de l'étude de phase I ont démontré que l'administration de la CoVLP en présence d'un adjuvant est sécuritaire et induit de fortes réponses humorales (IgG anti-S neutralisantes) et cellulaires (520). Une étude de phase II/III est actuellement en cours afin de confirmer ces résultats et évaluer l'efficacité du vaccin.

Dans un contexte d'immunothérapie du cancer, l'induction d'une immunité cellulaire est d'autant plus importante pour que les CTL reconnaissent et éliminent les cellules tumorales. Outre la production d'Ab neutralisants, les VLP peuvent induire la réponse des CTL. L'utilisation de VLP dans divers modèles précliniques de cancers comme le cancer du pancréas, le carcinome hépatocellulaire et le mélanome ont démontré une induction de réponses antitumorales des CTL (502, 521). Par exemple, l'insertion d'une à trois copie(s) d'un peptide dérivé de gp100 dans la protéine de structure du virus de la maladie hémorragique du lapin induit une réponse antitumorale *in vivo* (522). Chez l'Homme, des essais cliniques de phase I/II et IIa ont rapporté une réponse des lymphocytes T spécifiques à MART-1 à la suite du traitement de patients atteints de mélanome de stade III/IV avec des VLP conjuguées cet Ag (523, 524).

La VLP dérivée du virus de la mosaïque de la papaye

L'utilisation de particules virales de plantes comme plateforme vaccinale présentant des Ag hétérologues offre de nombreux avantages (525, 526). Les virus de plantes ne sont pas infectieux pour les animaux, dont les humains, ce qui rend leur utilisation très sécuritaire. Comparativement aux virus animaux, leur structure est très simple, la plupart ne sont pas enveloppés et sont souvent constitués par un seul type de protéine de structure (*coat protein*, CP) avec un génome ARN. L'ingénierie de ces virus est aisée, ce qui permet la fusion avec des Ag et leur production s'effectue à faible coût (525, 527). Au sein du laboratoire, nous avons porté notre attention sur un virus de la famille des *Flexiviridae* du genre Potexvirus infectant le papayer (*papaya mosaic virus,* PapMV). L'équipe de notre collaborateur Dr Denis Leclerc a développé des VLP dérivées de PapMV (VLP-PapMV) pouvant être utilisées comme adjuvant ou plateforme

vaccinale lorsqu'elles sont modifiées pour présenter un Ag à leur surface (VLP de PapMV chimérique) (528). Les VLP-PapMV sont constituées de la CP unique de PapMV qui s'autoassemble (529) autour d'un ARN simple brin bactérien (528) ou synthétique (530) formant ainsi une particule ayant la forme d'une tige flexible (528). Cette propriété permet à ces nanoparticules d'avoir des propriétés adjuvantes. Les VLP-PapMV internalisées par les cellules immunitaires rejoignent les endosomes où l'ARN est libéré et active le TLR-7 chez la souris (531, 532) et les TLR-7/8 chez l'Homme (533), permettant l'activation des cellules de l'immunité innée (530, 533), dont les pDC (531-533). Ces cellules vont sécréter des cytokines et chimiokines dont l'IFN-α (531-534) et l'IL-6 (530, 531, 533) ce qui résulte en l'activation des DC, Mϕ, cellules NK ainsi que des lymphocytes T et B (531-535).

L'utilisation des VLP-PapMV comme adjuvant améliore la réponse immunitaire des souris immunisées contre *Salmonella enterica serovar Typhi* (534) ainsi que la réponse aux vaccins trivalents contre le virus influenza (536-538). La modification des nanoparticules par l'insertion d'un peptide qui augmentent leur avidité pour la nucléoprotéine (NP) du virus influenza améliore son action adjuvante dont résulte une meilleure réponse immunitaire et une protection contre une réinfection par le virus (539). Les VLP-PapMV peuvent être des immunomodulateurs qui potentialisent les réponses cellulaires et humorale (534). Leur vaporisation dans les poumons de souris permet l'induction de l'immunité innée locale et d'une protection contre influenza et *Streptococcus pneumoniae* (530). L'injection des VLP-PapMV préimmunisation augmente la réponse des CTL permettant une protection contre l'infection à *Listeria monocytogenes* (531). L'administration intratumorale des VLP-PapMV induit la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires au sein de la tumeur qui augmente l'infiltration immunitaire et la fréquence des CTL spécifiques de la tumeur, freinant ainsi la progression du mélanome et l'établissement de métastases pulmonaires. Enfin, l'injection systémique des VLP-PapMV agit en synergie avec la vaccination cellulaire par DC et le blocage de PD-1 ce qui potentialise les réponses antitumorales (540). Chez l'Homme, une étude de phase I a conclu que l'utilisation des VLP-PapMV comme adjuvant du vaccin trivalent contre le virus influenza est sécuritaire. Toutefois, l'effet adjuvant des VLP-PapMV n'a pas conduit à une amélioration significative de la réponse humorale et cellulaire comparativement au vaccin utilisé seul (541).

Les VLP-PapMV peuvent servir de plateforme vaccinale en les modifiant pour présenter un Ag à leur surface. L'insertion de la séquence de peptides antigéniques dans la séquence codant pour la CP permet de produire une VLP chimérique présentant des centaines de copies du peptide à sa surface. Plusieurs sites de fusion d'épitopes ont été identifiés dans la structure de la CP offrant ainsi l'opportunité d'introduire des épitopes différents (542, 543). Les VLP-PapMV chimériques peuvent induire *in vivo* une réponse humorale menant à la production d'Ab reconnaissants l'épitope (515, 544, 545) et à la présentation croisée indépendante du protéasome de l'épitope inséré (362, 363, 535) engendrant une réponse des CTL (362, 514, 535, 546). L'équipe du Dr Denis Leclerc a démontré que la fusion de l'ectodomaine de la protéine de matrice M2 du virus influenza (M2e) au domaine N-terminal de la CP de PapMV permet l'assemblage d'une VLP très immunogénique dont l'injection intramusculaire unique est suffisante pour induire une forte réponse humorale anti-M2e qui protège les souris d'une infection létale subséquente par le virus influenza A (515, 545). Ils ont également développé un vaccin candidat formulé par la VLP-PapMV-M2e et une VLP de la protéine NP, qui confère une protection humorale et cellulaire robuste et large aux souris contre deux souches du virus influenza A (H1N1) et (H3N2) (514).

La fusion de longs épitopes dans la séquence codant pour la CP de PapMV peut altérer sa structure et affecter sa capacité à s'autoassembler en nanoparticules (542). Récemment, une nouvelle stratégie de couplage a été développée. Elle repose sur le couplage covalent de longs peptides ou de protéines entières aux VLP-PapMV préassemblées présentant un motif reconnu par la transpeptidase bactérienne sortase A, ce qui permet une conjugaison rapide et efficace sans affecter la structure des nanoparticules. Cette approche est plus versatile que la fusion génétique de petits épitopes et se révèle être efficace pour induire une réponse humorale et cellulaire contre les Ag protéiques auxquels les VLP sont couplées (505, 547).

Mise en situation et hypothèses de recherche

Mise en contexte

Les lymphocytes B sont des cellules dont les fonctions variées sont centrales à l'induction des réponses immunitaires. L'étude de la biologie des lymphocytes B permet d'améliorer notre compréhension de leurs fonctions et offre des pistes de recherche pour en induire ou moduler spécifiquement certaines comme la présentation d'Ag. Dans un contexte vaccinal, la connaissance des mécanismes par lesquels un vaccin conduit à une réponse immunitaire effectrice et mémoire est essentielle afin d'optimiser la stratégie vaccinale.

Les lymphocytes B sont une source d'APC particulièrement intéressante. Il est possible de les cultiver, les accroître et d'induire leur fonction de présentation d'Ag par la stimulation *in vitro* du récepteur CD40 et de l'IL-4. Bien qu'efficace, cette méthode présente des limitations car l'expansion des lymphocytes B est limitée et requiert au moins 14 jours de culture *in vitro*, freinant ainsi leur utilisation pour des applications biotechnologiques. L'acquisition de nouvelles connaissances reliées à la biologie des lymphocytes B permettra d'améliorer notre capacité à induire efficacement leur fonction de présentation d'Ag ce qui encouragera l'utilisation biotechnologique des cellules CD40-B comme source alternative d'APC, au lieu des DC, tant pour des applications de recherches fondamentales que cliniques comme la vaccination et les traitements d'immunothérapie du cancer.

Hypothèses de recherche

Dans ces travaux, nous avons souhaité étudier la voie de présentation par laquelle les lymphocytes B apprêtent et présentent des épitopes fusionnés à une nanoparticule virale, la VLP de PapMV. Puisque nous avons précédemment décrit qu'un épitope inséré dans la VLP de PapMV est présenté de façon croisée sur le CMH-I indépendamment du protéasome (362), nous avons postulé que la voie de présentation croisée est de type vacuolaire. De plus, nous proposons que la VLP de PapMV induise l'autophagie pour faciliter la présentation d'Ag par CMH-I.

Par ailleurs, nous avons proposé que la stimulation des lymphocytes B humains par leur récepteur CD40, l'IL-4 et l'IL-21 mimerait plus efficacement les signaux fournis *in vivo* par les

lymphocytes T_{FH} ce qui pourrait permettre une expansion clonale accrue des cellules B. De plus, nous avons émis l'hypothèse que les cellules CD40-B générées par cette méthode pourraient être des APC efficaces capables d'induire la réponse des CTL *in vitro*.

Objectifs spécifiques de recherche

Pour répondre aux hypothèses proposées, nous avons défini des objectifs spécifiques :

1. Identification du rôle de l'autophagie dans la présentation de l'épitope insérée dans la VLP de PapMV par la voie de présentation croisée par le CMH-I de type vacuolaire.

a. Valider la présentation croisée par la voie vacuolaire.

b. Évaluer l'induction de l'autophagie par la VLP de PapMV.

c. Définir le rôle de l'autophagie induite par la VLP de PapMV dans la présentation croisée.

2. Caractérisation des fonctions de présentation d'antigènes des lymphocytes B humains stimulés *in vitro* par le CD40 et l'IL-4 ou l'IL-21 ou la combinaison des deux cytokines.

a. Évaluer l'impact des différentes cytokines sur la prolifération des cellules CD40-B.

b. Déterminer les phénotypes des cellules CD40-B générées au cours de la culture *in vitro.*

c. Valider l'induction d'un phénotype favorable aux fonctions d'APC des cellules CD40-B.

c. Définir la capacité des cellules CD40-B stimulées avec les différentes cytokines à induire les réponses des lymphocytes T $CD8^+$ *in vitro*.

Chapitre 2 – Manuscrit I

MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen presenting cells is dependent on autophagy

Manuscrit **soumis à *Scientific Reports*** (octobre 2020)

Contribution des auteurs :

D. Possamaï et L.-A. Hanafi sont responsables de la réalisation de la majorité des travaux de recherche et ont contribué équitablement. P. Thébault a fourni une contribution technique lors de la réalisation des essais de reconnaissance (Figures 2 et 4 du manuscrit). A. Bellemare-Pelletier et É. Gagnon ont participé aux expériences de shRNA (Figure 5 du manuscrit). K. Hamelin et M.-J. Hébert ont fourni le support technique pour la microscopie confocale (Figure 3C-E du manuscrit). D. Leclerc est responsable de design et de la production des VLP PapMV M1 et gp100. M.-J. Hébert, É. Gagnon et D. Leclerc ont fourni un apport intellectuel. D. Possamaï, L.-A. Hanafi et R. Lapointe ont rédigé le manuscrit. L.-A. Hanafi et R. Lapointe sont responsables du design expérimental. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen-presenting cells is dependent on autophagy

David Possamaï[1,+], Laïla-Aïcha Hanafi[1,+], Angélique Bellemare-Pelletier[2], Katia Hamelin[1], Paméla Thébault[1], Marie-Josée Hébert[1], Étienne Gagnon[2], Denis Leclerc[3] and Réjean Lapointe[1,4,*]

[1]Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal and Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC, H2X 0A9, Canada

[2]Département de Microbiologie et Immunologie, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada

[3]Centre de recherche en infectiologie, CHU Québec and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université Laval, Québec City, QC, G1V 4G2, Canada

[4]Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

[+]These authors contributed equally to this work.

[*]Corresponding author: Réjean Lapointe.

Abstract

Nanoparticles (nano) made of the coat protein (CP) of papaya mosaic virus (PapMV) and a single-strand RNA (ssRNA) were previously shown to be an efficient antigen presentation system for the trigger of cellular immunity. Engineering of PapMV nano with a cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope was previously shown activating specific T lymphocytes through a proteasome-independent major histocompatibility complex class I (MHC-I) cross-presentation. In this study, we provide new insights into the mechanism of the MHC-I cross-presentation mediated by PapMV nano. We demonstrate that PapMV nano do not require the transporter associated with antigen presentation (TAP), but rather depend on lysosome acidification and cathepsin S protease activity for presentation of the T cell epitope. We have also linked the induction of autophagy with this vacuolar MHC-I cross-presentation process. Interestingly, autophagy is induced in antigen-presenting cells (APC) after PapMV nano exposure and inhibition of autophagy reduce MHC-I cross-presentation. This study demonstrates that autophagy is associated with TAP- and proteasome-independent MHC-I cross-presentation. A deeper understanding of the autophagy-dependent MHC-I cross-presentation will be useful in designing vaccination platforms that aim to trigger an efficient CTL response.

Keywords: MHC class I antigen cross-presentation, vacuolar pathway, vaccine platform, virus-like particles, EBV-transformed B lymphocytes.

Introduction

Among the various vaccine vectors that have recently been developed, virus-like particles (VLPs) present multiple advantages. VLPs are protein structures composed of viral proteins assembled in a non-productive virus-like structure that do not have a viral genome. The use of VLPs reduces risks linked to productive infection by attenuated viruses while keeping their immunogenicity, making them safer vaccine candidates[1-3]. VLPs can serve as vaccine carriers through the addition of sequences coding for major histocompatibility complex class I (MHC-I) and class II epitopes from viral or tumor target proteins into the coat protein virus sequence[3,4].

We have developed a VLP in which human leukocyte antigen (HLA)-A2 epitopes of influenza matrix protein 1 (M1) or melanoma glycoprotein 100 (gp100) was inserted at the C-terminus of the papaya mosaic virus (PapMV) coat protein sequence[5], the building block of the PapMV nanoparticles. PapMV VLPs have been studied as a promising candidate vaccine platform by displaying relevant epitopes for the induction of immune responses[6,7]. We have previously demonstrated that the inserted epitopes are cross-presented on MHC-I by antigen-presenting cells (APC) through a proteasome-independent mechanism[8]. Also, we observed that Malva mosaic virus (MaMV) VLPs, another plant virus with a rod-like shape like PapMV VLPs, are internalized, cross-presented by APC and lead to specific T lymphocyte expansion in a similar manner than PapMV VLPs[5]. Similarly, Hepatitis B VLPs containing ovalbumin (OVA) epitope are presented on MHC class I and class II in murine $CD8^+$ dendritic cells (DC) and promote cytotoxic and helper T cell priming[9]. Besides, human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-based VLPs coupled with E7 oncoprotein of the human papillomavirus (HPV) can cross-present E7 epitopes and induce an anti-tumor response[10]. Recently, Mohsen et al., developed a cucumber-mosaic virus-derived VLPs fused with the p33 epitope and showed an enhanced specific T cell response in the stringent B16F10p33 murine melanoma model[11]. Proteasome-independent cross-presentation has also been described for other particulate antigens, such as VLPs prepared from the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), which are presented via the MHC-I recycling pathway[12]. This pathway involves processing in vacuolar compartments and depends on cathepsin S for protein degradation[13]. An antigen cross-presentation pathway dependent on recycling process and

cathepsins has also been described in plasmacytoid dendritic cells (pDC), where it showed rapid potential for presentation from this particular vacuolar process[14].

In this report, we aimed to define the MHC-I cross-presentation pathway mediated by PapMV VLPs. MHC-I antigen cross-presentation pathways can be categorized into two subtypes. The cytosolic pathway where internalized antigens must access the cytosol to be processed through the classical MHC-I machinery (proteasome degradation and endoplasmic reticulum (ER) loading)[15-17] . A second pathway where degradation and loading onto MHC-I molecules are performed entirely in the vacuolar compartment[17-19]. This last pathway is defined as vacuolar or vesicular cross-presentation. Our previous data suggested that PapMV VLPs are cross-presented through a proteasome-independent pathway[8]. Therefore, we investigated the role of the transporter associated with antigen presentation (TAP), cathepsin S, and lysosome acidification in PapMV VLP cross-presentation.

Autophagy is a ubiquitous cellular survival process that has previously been implicated in many immunological processes, including antigen presentation[20-23]. First, it plays a role in T lymphocyte development during the negative selection of $CD4^+$ T cells in the thymus, where autophagy is highly implicated in MHC class II presentation of endogenous proteins[24,25]. However, the role of autophagy in MHC-I presentation is poorly characterized. Autophagy is involved in MHC-I antigen presentation in a context where classical MHC-I presentation is inhibited by infection with the herpes simplex virus (HSV)-1[26,27]. Also, Budida et al., showed an increase in the capacity of murine DC to present viral antigens through MHC-I after infection with a mutant of herpes simplex virus-1 (HSV-1) which lacks infected cell protein 34.5 (ICP34.5) known to suppress autophagy, as compared to the wild-type HSV-1 strain. This study demonstrates the important role of autophagy in processing endogenous viral proteins in HSV-1-infected DC[28]. Also, when TAP is inhibited, autophagy is implicated in MHC-I presentation of human cytomegalovirus[29]. Thus, we hypothesized that PapMV VLPs are cross-presented by MHC-I through an autophagy-dependent vacuolar pathway.

We report here that MHC-I cross-presentation of epitopes inserted in PapMV nanoparticles requires cathepsin S enzymatic activity and endosomal acidification. We further

demonstrated that cross-presentation of PapMV VLPs was independent of TAP transport to the ER. We also identified autophagy as an important cellular activity for the MHC-I cross-presentation of cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes fused to PapMV VLPs. We show an induction of autophagy in APC exposed to PapMV VLPs. Finally, the MHC-I antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs requires autophagic processes to be efficient.

Results

PapMV cross-presentation is a TAP-independent active process

To study antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs, we developed an *in vitro* assay[3] consisting of a 6-hour pulsing of APC with PapMV VLPs fused to specific MHC-I epitope from influenza M1 or melanoma gp100. After extensive washing, APC were co-cultured with $CD8^+$ T lymphocytes specific to the inserted epitope. Assaying the activation of T cells through the secretion of interferon (IFN)-γ in co-culture supernatant allowed us to quantify the level of cross-presentation by APC. First, we performed a cross-presentation assay in Epstein-Barr virus-transformed (EBV)-B cells incubated with PapMV VLPs at either 37°C or 4°C to verify that the release for antigen presentation of the epitope inserted in the VLP structure was mediated by an active degradation by the APC. As shown in Figure 1A, PapMV VLPs loaded APC were efficiently recognized only when pulsed at 37°C, demonstrating that presentation of the epitope fused to PapMV VLPs requires active processes. As expected, external loading of APC with a peptide corresponding to the minimal epitope was almost equally recognized by specific T lymphocytes when loading was performed at both 37°C and 4°C.

We performed the same antigen cross-presentation assay using pulsed T2 cells, a TAP-deficient cell line[30]. TAP is implicated in the transport of peptides from the cytoplasm to the ER. This process is essential in classical MHC-I antigen presentation and in cytosolic antigen cross-presentation[31,32]. The efficient T lymphocyte-mediated recognition of T2 cells pulsed with PapMV VLPs suggests that antigen cross-presentation pathway is independent of TAP, and again, only cells pulsed at 37°C were efficiently recognized (Figure 1B).

These data strongly suggest that PapMV VLP mediated cross-presentation is independent of TAP transport of the epitope into the ER and requires an active intracellular process. These results support our hypothesis that PapMV VLPs are presented by a vacuolar cross-presentation pathway.

PapMV nanoparticles transit and are processed through the vacuolar pathway

Since our results suggested that cross-presentation of PapMV VLPs was via the vacuolar pathway, we aimed to confirm the role of previously described mediators of the vacuolar pathway (lysosomes and cathepsin S) by using chemical inhibitors. We used chloroquine, a common inhibitor that accumulates in acidic lysosomes and increases the lysosomal pH[33] thereby inhibiting lysosomal hydrolases and preventing lysosome fusion with autophagosomes. Chloroquine efficiently inhibited cross-presentation of PapMV VLPs, as illustrated by reduced IFN-γ secretion by epitope-specific T lymphocytes (Figure 2A-B). This reduction was significant compared to the small effect of chloroquine on the recognition of the externally loaded Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes (EBV-B) and T2 cells.

Cathepsin S is a cysteine protease that has previously been linked to proteasome-independent MHC-I cross-presentation[13,34]. When EBV-B or T2 cells were pretreated with a cathepsin S specific inhibitor before PapMV VLP pulsing, we observed a decrease in the epitope cross-presentation. External loading of MHC-I with a control peptide (minimal epitope M1 or gp100) was not affected by this treatment (Figure 2C-D).

We controlled whether the decrease in MHC-I cross-presentation by both inhibitors was due to a reduced internalization of PapMV VLPs. Our results demonstrate that fluorescent PapMV VLP internalization, measured by flow cytometry, was not affected by inhibitors (Figure 2, bottom panels). Similarly, we measured the expression of MHC-I molecules at the cell surface by flow cytometry. Treatment of APC with neither inhibitor altered the expression of MHC-I molecules at the cell surface as shown by similar mean fluorescence intensity (MFI) (Supplementary Figure S1). Collectively, these results show that chloroquine and cathepsin S specific inhibitor do not affect internalization of PapMV VLPs or MHC-I expression but inhibit PapMV VLP antigen processing. Thus, lysosomes and cathepsin S are essential in PapMV nanoparticle processing.

Autophagy is induced in APC by PapMV nanoparticles

Based on our results with chloroquine and our hypothesis that autophagy is implicated in MHC-I cross-presentation of PapMV VLPs, we aimed to evaluate the induction of autophagy following pulsing with PapMV nanoparticles.

We first evaluated the induction of autophagy by western blot using the lipidated form of LC3 (LC3-II) as a marker for autophagosome formation. We showed that PapMV VLPs, both at 25 or 50 µg/mL, induced the formation of autophagosomes in EBV-B cells (Figure 3A). This induction can be quantified by the ratio of LC3-II over LC3-I (the cytosolic form) bands. Incubation with PapMV VLPs at 50 µg/mL or the positive control rapamycin significantly enhanced the LC3-II/LC3-I ratio (Figure 3B). The autophagosome induction inhibitor 3-methyladenine (3-MA) blocked the induction of autophagy by both PapMV VLPs and rapamycin as shown by the reduction of LC3-II/LC3-I ratios (Figure 3A-B).

To confirm these results, we transfected EBV-B cells with a plasmid coding for a green fluorescent protein (GFP)-LC3 fusion protein to evaluate the induction of autophagy by confocal microscopy. Following transfection, GFP^+ cells were sorted by flow cytometry and treated with PapMV VLPs labelled with Alexa Fluor 647 (PapMV-AF647), or rapamycin to induce autophagy, and imaged by confocal microscopy. As presented in Figure 3C, PapMV VLP and rapamycin exposure increased the number of LC3-GFP^+ puncta. We quantified the formation of LC3-GFP^+ vesicles in multiple cells and observed a 3-4-fold increase in the number of $LC3^+$ puncta per cell in the presence of PapMV VLPs and rapamycin as compared to untreated cells (Figure 3D). The total surface covered by GFP^+ puncta was also larger in PapMV nanoparticles and rapamycin-treated cells (Figure 3E). Besides, we sometimes observed a partial colocalization between PapMV VLPs and $LC3^+$ vesicles but there does not seem to be a preferred localization of PapMV VLPs in autophagosomes at the time point evaluated. However, the number and surface of $LC3^+$ vesicles correlate with the number of PapMV VLP puncta and their surface, respectively, as shown by positive Pearson correlation coefficients (Figure 3F-G). Collectively, these results show that PapMV nanoparticles induce autophagy in EBV-B cells.

PapMV VLP cross-presentation is dependent on autophagy induction

To confirm the implication of autophagy in MHC-I cross-presentation of PapMV VLPs, we treated APC with 3-MA to inhibit autophagy during PapMV VLP or peptide pulsing. Pretreatment of APC with 2 mM or 5 mM 3-MA resulted in significant reductions of MHC-I cross-presentation

mediated by PapMV VLPs as compared to peptide-pulsed APC after similar treatment (Figure 4A-B).

We controlled the impact of 3-MA treatment on the uptake of fluorescent PapMV nanoparticles and the expression of MHC-I molecules. We showed that this inhibitor had no impact on PapMV VLP endocytosis in EBV-B cells (Figure 4A, bottom panel) but induced a mild decrease of PapMV-AF647 uptake in T2 cells (Figure 4B, bottom panel). We also evaluated the effect of 3-MA treatment on MHC-I expression. Treatment of EBV-B cells with 3-MA at 2 mM had no impact on MHC-I expression but a significant decrease of MHC-I MFI was observed when cells were incubated with 3-MA at 5 mM (Supplementary Figure S1). In T2 cells, 3-MA treatment significantly decreased MHC-I expression on the cell surface both at 2 nM and 5 mM as shown by a lower MFI compared to untreated cells (Supplementary Figure S1). Those results may explain the stronger effect of 3-MA on the reduction of PapMV VLP cross-presentation seen in T2 cells compared to EBV-B cells (Figure 4A-B). In summary, data presented in Figure 4 demonstrate that MHC-I cross-presentation of PapMV VLPs is inhibited in presence of the autophagy induction inhibitor 3-MA.

We also used RNA interference as an alternative method to inhibit autophagy. EBV-B cells were transduced with lentivirus expressing mAmetrine (fluorescent protein) and short hairpin RNA (shRNA) against autophagy related 5 (ATG5) mRNA (shATG5) or a scramble shRNA (shSCR). After sorting for mAmetrine^{+} cells, we obtained a population of EBV-B cells having a 40-60% ATG5 knockdown (KD) as evaluated by western blot densitometry (Figure 5A). Internalization of PapMV VLPs was not affected by ATG5 KD by both shRNAs compared to shSCR and untransduced cells (Figure 5B). When ATG5 KD EBV-B cells were pulsed with PapMV VLPs for a recognition assay, we observed a significant downregulation of MHC-I cross-presentation compared to peptide-pulsed EBV-B cells transduced with the same shRNA (Figure 5C).

Overall, our results presented in Figures 3 to 5 demonstrate the implication of autophagy in MHC-I vacuolar cross-presentation of PapMV nanoparticles.

Discussion

MHC-I cross-presentation is an essential pathway for the priming of $CD8^+$ T lymphocytes. When APC are not infected by pathogens or when cancer antigens are not expressed in APC, the induction of cross-presentation using a vaccine platform is an attractive method to improve uptake and presentation of antigens to prime naive $CD8^+$ T cells and mount an effective cellular immune response.

Multiple pathways of MHC-I cross-presentation have been described. Some processes depend on the conventional pathway where endocytosed antigens are transferred into the cytosol for their degradation by the proteasome and loading of resulting epitopes on MHC-I in the ER (reviewed by Blander et al.[17]). In our system, we have previously shown that epitopes inserted in the PapMV VLP vaccine platform were presented on MHC-I through a proteasome-independent mechanism[8]. In this study, we further demonstrate that MHC-I cross-presentation of PapMV VLPs is TAP-independent but dependent on lysosomes and cathepsin S. Many viruses have evolved to inhibit TAP activity to evade antiviral immune surveillance[35-37]. However, the immune system has developed different MHC-I presentation pathways that do not require TAP activity[38,39]. Interestingly, TAP-deficient individuals are still able to present viral associated antigens and harbor a polyclonal $CD8^+$ T cell repertoire capable of recognizing peptides from the Epstein-Barr virus[40]. Thus, the TAP-independent pathway is efficient to induce $CD8^+$ T cell immunity and our data support the use of PapMV VLPs as a very efficient and attractive technology for developing a vaccine platform able to generate a cellular immunity against inserted epitopes.

Autophagy has been implicated in alternative MHC-I antigen presentation pathways[22]. English et al., showed that in late stages of infection by HSV-1, a novel form of autophagy using the nuclear envelope is implicated in MHC-I antigen presentation[26,27]. This antigen presentation pathway still required the MHC-I classical machinery, including proteasome and TAP. In contrast, when using TAP-deficient cells, Tey et al., demonstrated that processing of an endogenous antigen from the human cytomegalovirus (HCMV) occurred completely in the vacuolar pathway and was mediated by macroautophagy[29]. While previous studies required active infection and

protein translation for classical MHC-I presentation, in our study, we report that antigen cross-presentation of epitopes inserted in PapMV VLPs is mediated by the same vacuolar autophagy-dependent pathway. We showed that inhibition of autophagy by 3-MA or using shRNAs targeting ATG5 mRNA significantly reduced cross-presentation of the epitope inserted in PapMV VLPs. Of note, several other shRNAs targeting ATG5 mRNA were also evaluated to improve ATG5 knockdown. Unfortunately, most shRNA induced EBV-B cell death few days after cell sorting. These results may be explained by the important role of autophagy in EBV-B cell survival[41]. Using shRNAs targeting other proteins implicated in autophagy such as ATG7 would allow us to circumvent this limitation. Thus, we concluded that PapMV nanoparticles induce autophagy in EBV-B cells which is required for cross-presentation of the inserted epitope.

Recently, Dasari et al., showed that EBV-B cells can cross-present a soluble recombinant HCMV-encoded pp65 protein through a proteasome-dependent but TAP-independent cross-presentation pathway to $CD8^+$ T cells[42]. Similar to our data, cross-presentation was inhibited by pretreating B cells with chloroquine, 3-MA or by ATG5 or ATG12 knockdown, strongly supporting that cross-presentation of pp65 was mediated by autophagy. The authors proposed a new antigen cross-presentation pathway by B cells involving processing of antigens through an autophagy- and proteasome-dependent pathway and loading of peptides onto MHC-I proteins in autophagosomes. Overall, this suggests that several cross-presentation pathways may rely on autophagy for processing and presentation of different types of antigens.

We also evaluated whether the induction of autophagy before the recognition assay would increase levels of IFN-γ secretion by specific T lymphocytes. We induced autophagy by pretreating EBV-B and T2 cells with rapamycin similar to Figure 3. Surprisingly, this treatment reduced antigen presentation of both PapMV VLPs and externally loaded peptide. These results could not be explained by a decrease in PapMV VLP uptake or a downregulation of surface MHC-I by rapamycin treatment (Supplementary Figure S2). Further experiments are needed to decipher the impact of rapamycin on antigen presentation by EBV-B and T2 cells. We then assessed whether cell starvation, an inducer of autophagy through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway[43] would increase PapMV VLP cross-presentation. We incubated EBV-B cells for 3 hours in HBSS (Hank's balanced salt solution) during the 6-hour antigen loading and proceeded

with the recognition assay as described above. Incubation in HBSS for 3 hours induced the lipidation of LC3 in EBV-B cells and a higher antigen recognition of EBV-B cells pulsed with PapMV VLP but not with the minimal epitope (data not shown). However, this result could not solely be explained by an enhanced processing of PapMV VLPs when autophagy was induced due to a higher endocytosis of PapMV nanoparticles under starvation conditions (data not shown).

The next question to be addressed is how cathepsin S-generated peptides can access MHC-I molecule for loading. Several hypotheses were derived from other models. First, because MHC-I is constantly recycled from the cell surface, endo-lysosomes can fuse with recycling endosomes to allow peptide loading on MHC-I[14,18,44]. This hypothesis is supported by the recent work of Makarkov et al., using a plant-derived VLP bearing influenza hemagglutinin (HA). After pulsing of human monocyte-derived macrophages, they detected that a substantial portion of HA-derived peptides were retained in early and/or recycling endosomes where HA colocalized with MHC-I protein[45]. There is also evidence that tubular recycling endosomes can participate in the early stage of autophagosome formation and share their membranes[46]. The second pathway for MHC-I peptide loading is cross-presentation involving exogenous release of newly formed peptides. This form of cross-presentation has been described in immature DC and CpG-activated DC[47]. Autophagy can also be an important regulator of this peptide release. Autophagy has been linked to exosome release from apoptotic/autophagic endothelial cells[48] and multivesicular bodies[49]. These exosomes can fuse with autophagosomes under autophagic conditions[48,49]. These lines of evidence suggest that autophagy could be implicated in MHC-I peptide loading in the cross-presentation of PapMV VLPs by the vacuolar pathway.

In conclusion, we report that a vaccine platform composed of a chimeric plant VLP is efficiently cross-presented through a vacuolar cross-presentation pathway dependent on autophagy induction. This knowledge can help us design new vaccine platforms that will have greater autophagy induction properties to promote their cross-presentation by APC and enhance cellular immunity.

Materials and Methods

Cells and Reagents

T2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection. EBV-B cells were generated from HLA-A2 normal donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with supernatant-containing Epstein-Barr virus as previously described[50]. Both cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 µg/mL gentamicin (all from Wisent Bioproducts). Rapamycin (Calbiochem) was used at 0.1-1 µM from a stock solution of 10 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). 3-methyladenine (3-MA; Sigma-Aldrich) was prepared in dimethylformamide (Sigma-Aldrich) at 100 mM stock solution. A cathepsin S inhibitor (Calbiochem) and chloroquine (Sigma-Aldrich) were prepared in DMSO at 11.7 mM and 100 mM stock solution, respectively.

PapMV VLP Preparation

PapMV-M1 and PapMV-gp100 VLPs used in this report have been described elsewhere[8]. Sequences of PapMV clones were confirmed by DNA sequencing.

shRNA Lentivirus Production and Infection

Specific shRNAs targeting ATG5 mRNA were designed based on the sequence reference TRCN0000330394 (CCTGAACAGAATCATCCTTAA). A non-target scramble shRNA (CAACAAGATGAAGAGCACCAA) was used as a control. As described before, annealed forward and reverse hairpin oligonucleotides were cloned into a modified pLKO.1-TRC1.5 vector where the puromycin-resistance gene was replaced with mAmetrine[51]. Lentiviral particles were produced by co-transfecting HEK293T cells with shRNA-containing pLKO-mAM vector along with pMD2-VSVG, pMDLg/pRRE, and pRSV-REV, as previously described[36]. Viral supernatants were used to infect EBV-B cells. Transduced cells were sorted by flow cytometry according to mAmetrine fluorescence on a FACSAria™ III (BD Biosciences) about one week following lentivirus transduction. Validation of ATG5 knockdown was performed by western blot.

Cross-presentation Assay

EBV-B or T2 cells were pulsed with PapMV fused to M1 or gp100 epitope (PapMV VLPs; 25 μg/mL) or with M1 peptide (GILGFVFTL, 1 μM) or mutated gp100 peptide (IMDQVPFSV, 1 μM) for 6 hours. Cells were washed extensively and co-cultured overnight with antigen-specific $CD8^+$ T cells, generated as previously described[5]. Co-culture supernatants were collected and IFN-γ was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. For 4°C control, cells were kept on ice for pulsing and between washes. In assays with chemical inhibitors, cells were pretreated for 1 hour with indicated concentrations of inhibitors before adding PapMV-M1/-gp100 or M1/gp100 peptide without washing off inhibitors and cells were pulsed for 6 hours.

Flow Cytometry

PapMV VLPs were labeled with Alexa Fluor 647 fluorochrome (PapMV-AF647), according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). EBV-B cells were pretreated with indicated inhibitor concentrations for 1 hour before adding PapMV-AF647. Cells were then incubated for an additional 3 hours. After extensive washing, cells were analyzed by flow cytometry on a BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD Biosciences). Flow cytometry data were analyzed with FlowJo™ Software version 10.6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR). Cells were identified by their scatter properties (FSC-A vs. SSC-A plot), then doublets were excluded by gating on FSC-H vs. FSC-W.

Western Blot Analysis

EBV-B cells were treated for 3 hours with PapMV nanoparticles or rapamycin, with or without pretreatment with 5 mM 3-MA. Cells were collected and washed Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Wisent Bioproducts). Proteins were extracted in the presence of HALT proteinase/phosphatase inhibitors (ThermoFisher) from the above-mentioned pelleted cells and quantified by Bio-Rad protein assay. Proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated with rabbit an anti-human LC3B antibody (Ab; 1:3,000) (Novus Biologicals), a rabbit anti-ATG5-specific Ab (Cell Signaling) or a mouse anti-human

β-actin-specific Ab (1:10,000) (Millipore). Membranes were revealed with horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit (1:5,000) or anti-mouse (1:40,000 for β-actin) Abs (Chemicon) followed by enhanced chemiluminescence (ECL) prime detection (Amersham) on film. Densitometry was performed with ImageJ software and indicated as the ratio between densities of LC3-II over LC3-I bands or the ratio of ATG5 over β-actin bands.

Confocal Microscopy

EBV-B cells were transfected with a plasmid coding for LC3 fused to enhanced green fluorescent protein (eGFP), kind gift of John Brumell (University of Toronto), using a microporator (Digital Bio) with 100 µL Neon kit (Life Technologies). The next day, GFP^+ cells were sorted by flow cytometry using a BD FACSAria™ III (BD Biosciences). Sorted cells were incubated with PapMV-AF647 (10 µg/mL) or rapamycin (0.1 µM) for 3 hours. Cells were cytospun using a Cytofuge 2 (StatSpin) on slides and coverslips were mounted with ProLong™ Gold antifade mountant with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Life Technologies). Pictures were taken on an Olympus FV100 confocal microscope and analyzed with ImageJ software for LC3-GFP^+ vesicle count and surface quantification.

Statistical Analysis

When two groups were compared, statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. When three groups were compared, statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) for comparing multiple treatments or Dunnett's multiple comparison test when means were compared to a control mean. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. All *in vitro* assays were repeated at least three times. Data were analyzed using Prism - GraphPad Software v8.3.0 (San Diego, CA, USA).

Data Availability

Data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Figures

Possamaï et al., manuscript I (mI)

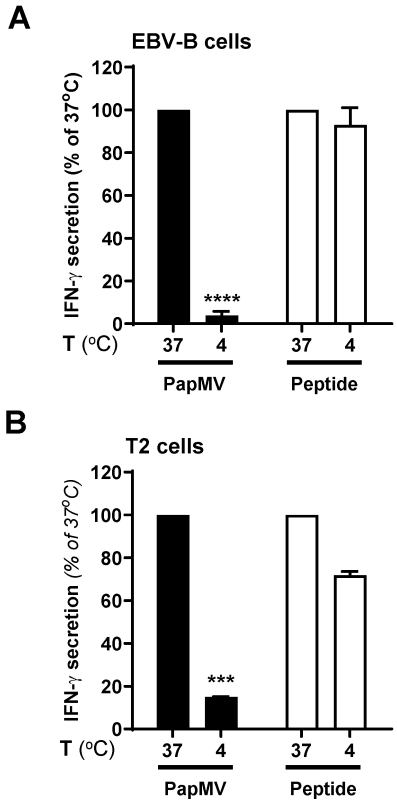


Figure 9. – (Figure 1[mI]): TAP-independent MHC class I cross-presentation of PapMV VLPs requires active processing

EBV-B (**A**) or T2 (**B**) cells were loaded with PapMV-M1 or M1 peptide for 6 hours at 4°C or 37°C. Cells were then washed and co-cultured with M1-specific $CD8^+$ T lymphocytes for 16–18 hours at a 1:1 ratio. Supernatants were collected and IFN-γ was quantified by ELISA to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. Results are represented as mean ± SEM (standard error of the mean), % of IFN-γ secretion at 37°C. Data were pooled from four (**A**) or two (**B**) independent experiments. For each experiment, IFN-γ secretion was measured in two technical replicates for each condition. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. ***$p < 0.001$ ****$p < 0.0001$ significantly lower than peptide control at 4°C.

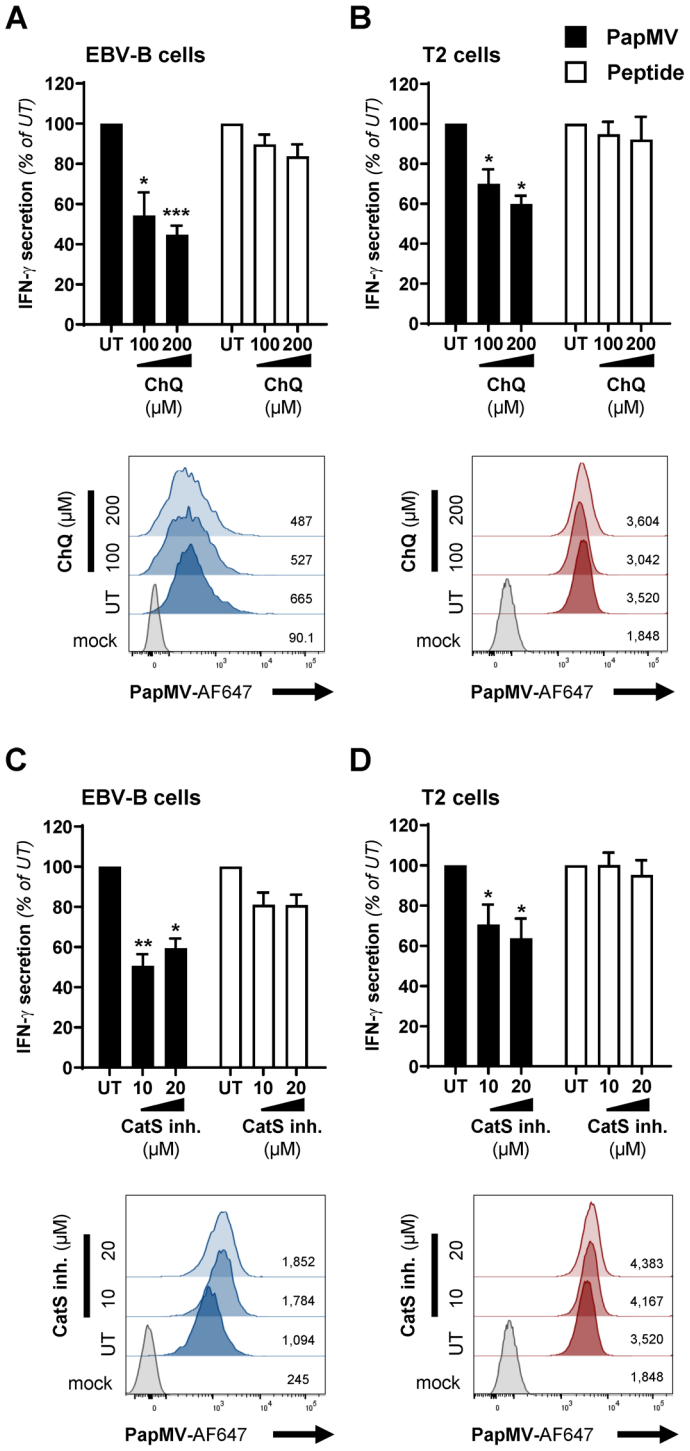


Figure 10. – (Figure 2[ml]): Inhibition of cathepsin S and endocytic acidification abrogate MHC class I cross-presentation mediated by PapMV VLPs

A-D Top panel: EBV-B and T2 cells were pretreated for 1 hour with chloroquine (ChQ) (**A-B)** or a cathepsin S specific inhibitor (CatS inh.) (**C-D)** at indicated concentrations. PapMV-gp100

(25 µg/mL) or gp100 peptide (1 µM) was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. Cells were washed and co-cultured with gp100-specific $CD8^+$ T lymphocytes for 16–18 hours at a 1:1 ratio. Supernatants were collected and IFN-γ was quantified by ELISA to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. Results are presented as mean ± SEM, % of IFN-γ secretion of untreated (UT) cells. Data were pooled from five (**A, C**) seven (**B**) or six (**D**) independent experiments. For each experiment, IFN-γ secretion was measured in two technical replicates for each condition. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. *$p < 0.05$ **$p < 0.01$ ***$p < 0.001$ significantly lower than peptide control at corresponding inhibitor concentration. **A-D** Bottom panel: PapMV labeled with Alexa Fluor 647 (PapMV-AF647, 10 µg/mL) was added for 3 hours and internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV endocytosis and are representatives of two (**A, B, D**) or three (**C**) independent experiments. For each experiment, PapMV uptake was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate PapMV-AF647 MFI from the representative experiment showed.

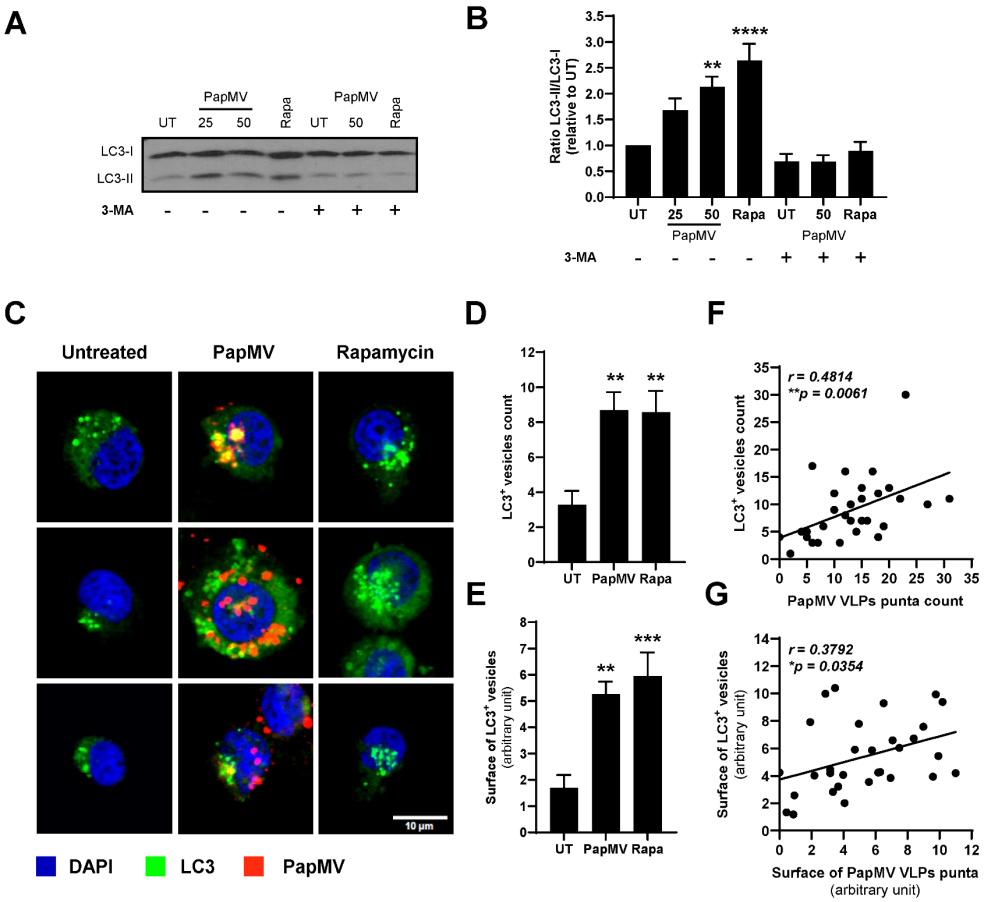


Figure 11. – (Figure 3[ml]): Autophagy is induced in APC following incubation with PapMV VLPs

A-B EBV-B cells were treated for 3 hours with PapMV VLPs (indicated concentration in µg/mL) or rapamycine (Rapa, 0.1 µM) with or without 1-hour pretreatment with 3-MA (5 mM). Cells were collected, protein extracted and resolved by SDS-PAGE using a 15% acrylamide gel, and LC3 was revealed by western blot. The scanned image of the blot was cropped between 20 kDa and 10 kDa for LC3 and is representative of three independent experiments. **B** Ratio of densitometry of LC3-II/LC3-I bands relative to the untreated (UT) control. Data are pooled from seven (without 3-MA treatment) or three (with 3-MA treatment) independent experiments and are represented as mean ± SEM. For each experiment, ratio of densitometry LC3-II/LC3-I was calculated in one technical replicate for each condition. Statistical significance was calculated using a one-way ANOVA with post-hoc Dunnett's multiple comparison test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. $^{**}p < 0.01$ $^{****}p < 0.0001$ significantly lower than UT control. **C-E** EBV-B cells were transfected with LC3-GFP plasmid and GFP$^+$ cells were sorted and incubated for 3 hours with PapMV-AF647. **C** Pictures of representative cells per condition (untreated, PapMV or rapamycin) at 60x magnification from one representative experiment of three independent experiments. Blue: DAPI, Green: LC3-GFP and Red: PapMV-AF647. Scale bar represents 10 µm. **D-E** Quantification of LC3$^+$ vesicles per cell (**D**) and the relative surface of LC3$^+$ vesicles over total cell surface (**E**). Data are from a compilation of 30 cells per condition from one representative experiment of three independent experiments and are shown as mean ± SEM. Statistical

significance was calculated using a one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. **$p < 0.01$ ***$p < 0.001$ significantly lower than untreated (UT) control. **F-G** Linear regression plots showing the correlation between (**F**) the number of $LC3^+$ vesicles and the number of PapMV VLP puncta or (**G**) the surface of $LC3^+$ vesicles and the surface of PapMV VLP puncta. Pearson correlation coefficients were calculated with 30 cells from one representative experiment of three independent experiments. *$p < 0.05$ **$p < 0.01$.

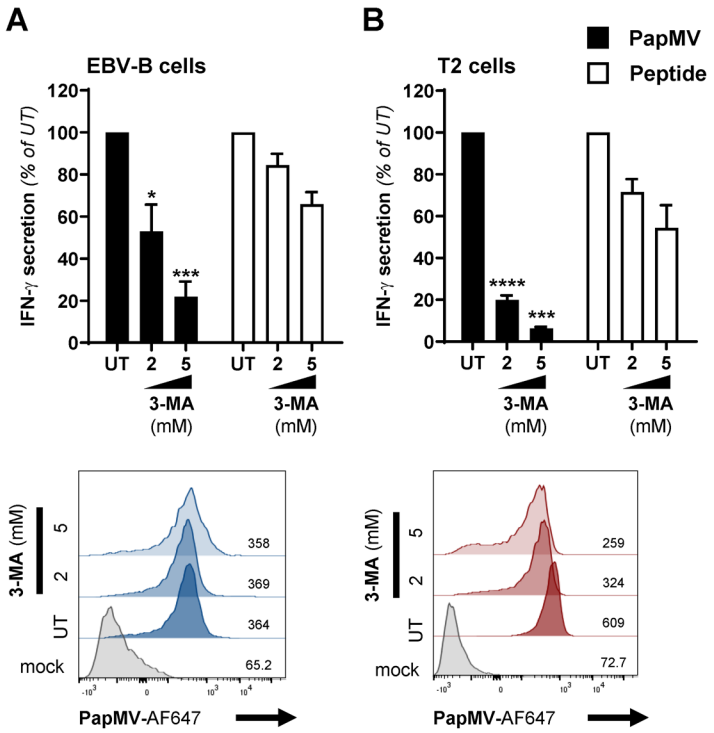


Figure 12. – (Figure 4[ml]): MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV VLPs is dependent on autophagy induction

A-B Top panel: EBV-B and T2 cells were pretreated for 1 hour with 3-MA at indicated concentrations. PapMV-gp100 (50 µg/mL) or gp100 peptide (1 µM) were added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37°C. Cells were washed and co-cultured with gp100-specific $CD8^+$ T lymphocytes for 16–18 hours at a 1:1 ratio. Supernatants were collected and IFN-γ secretion was quantified by ELISA to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. Results are presented as mean ± SEM, % of IFN-γ secretion compared to untreated cells from ten (**A**) or seven (**B**) independent experiments. In each experiment, IFN-γ secretion was measured in two technical replicates for each condition. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. *$p < 0.05$ **$p < 0.01$ ***$p < 0.001$ ****$p < 0.0001$ significantly lower than peptide control.

A-B Bottom panel: PapMV-AF647 (10 µg/mL) was added for 3 hours before internalization was assessed by flow cytometry. Representative histograms of PapMV-AF647 internalization in EBV-B (**A**) or T2 (**B**) cells from three independent experiments. For each experiment, PapMV-AF647 uptake was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate PapMV-AF647 MFI from the representative experiment showed.

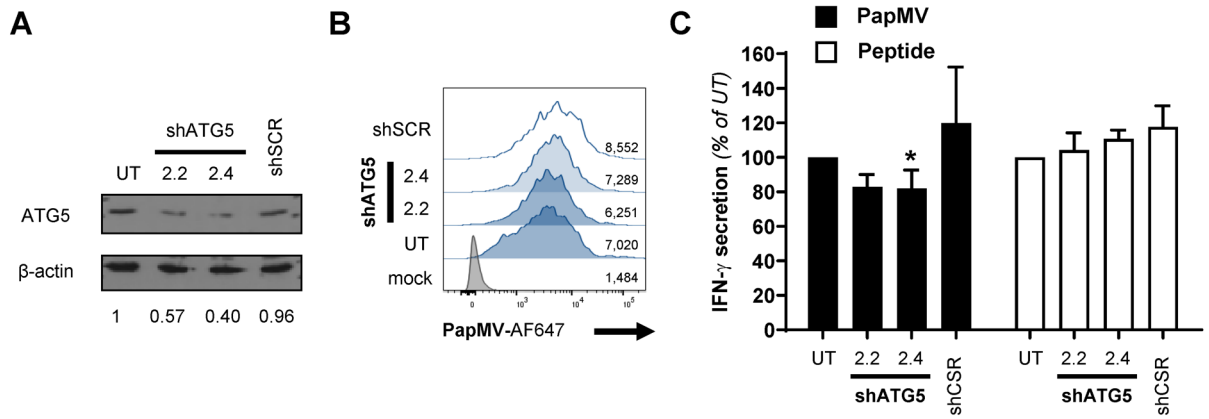


Figure 13. – (Figure 5[ml]): ATG5 knockdown reduced PapMV VLP mediated MHC class I antigen cross-presentation

EBV-B cells were transduced with lentivirus expressing mAmetrine and shRNA targeting ATG5 mRNA (clones 2.2 and 2.4) or scramble shRNA (shSCR). After expansion of transduced cells, mAmetrine$^+$ cells were sorted by flow cytometry. **A** ATG5 knockdown was evaluated by western blot. Cells were collected, protein extracted and resolved by SDS-PAGE using a 10% acrylamide gel. ATG5 and β-actin were revealed by specific antibodies. Scanned images of the blot were cropped between 50 kDa and 75 kDa for ATG5 and 37 kDa and 50 kDa for the β-actin loading control and are representative of two independent experiments. Numbers represent densitometry of ATG5/β-actin relative to untransduced cells (UT) for the blot presented. **B** PapMV-AF647 (10 µg/mL) was added for 3 hours and internalization was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV-AF647 internalization in EBV-B cells and are representative of three independent experiments. For each experiment, PapMV-AF647 uptake was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate PapMV-AF647 MFI from the representative experiment showed. **C** PapMV-gp100 (50 µg/mL) or gp100 peptide (1 µM) was added to pretreated cells without washing and cells were incubated for 6 hours at 37^{o}C. They were then washed and co-cultured with gp100-specific CD8$^+$ T lymphocytes for 16–18 hours at a 1:1 ratio. Supernatants were collected and IFN-γ secretion quantified by ELISA to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. Results are presented as mean ± SEM, % of IFN-γ secretion compared to untreated (UT) cells. Data were pooled from three independent experiments. In each experiment, IFN-γ secretion was measured in two technical replicates for each condition. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. *$p < 0.05$ significantly lower than peptide control transduced with the same shRNA.

Supplementary Figures

Possamaï et al.

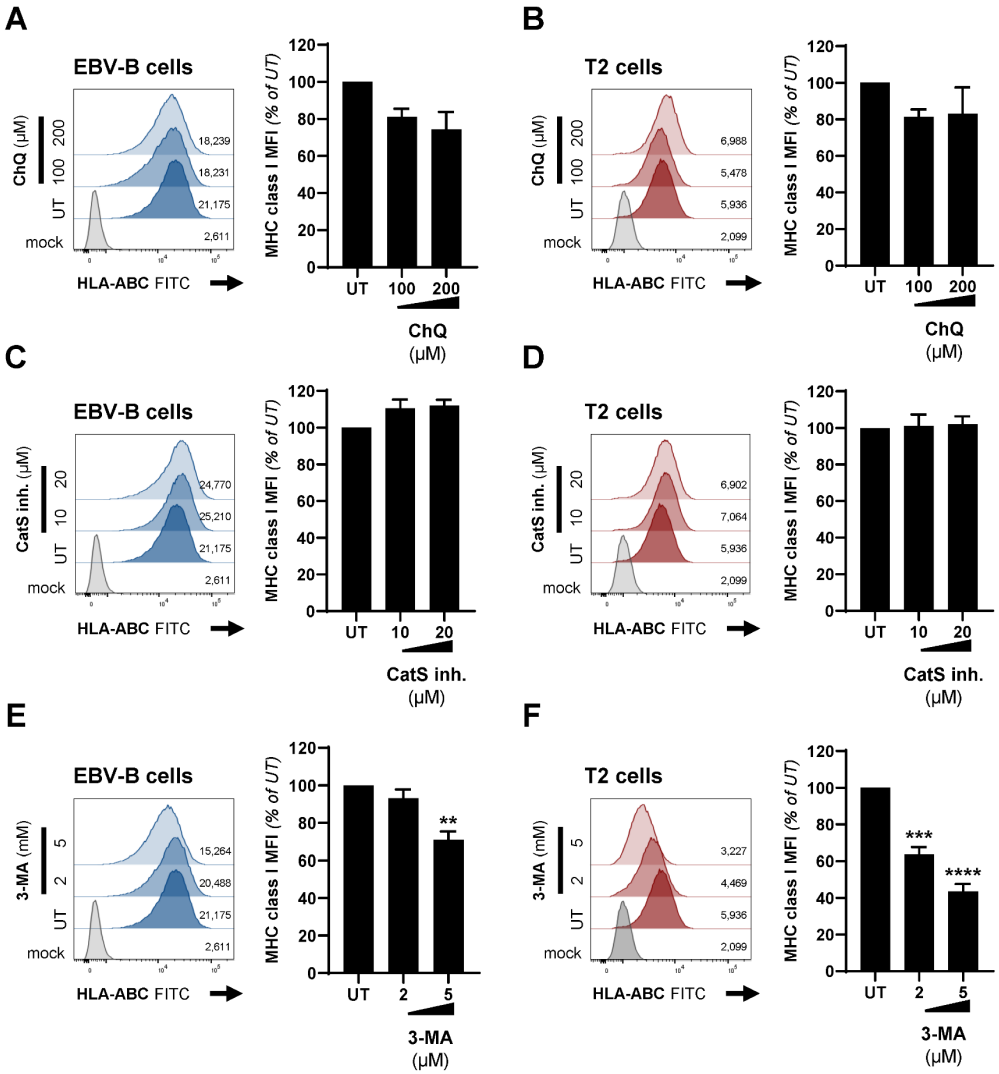


Figure 14. – (Supplementary Figure S1[ml]): Chloroquine and cathepsin S inhibitor treatments do not alter MHC class I surface expression in EBV-B or T2 cells but 3-MA does at high concentrations

EBV-B (**A, C, E**) or T2 cells (**B, D, F**) were treated for 1 hour with chloroquine (ChQ) (**A-B**), cathepsin S inhibitor (CatS inh.) (**C-D**) or 3-methyladenine (3-MA) (**E-F**) at indicated concentrations. Treated cells were labeled with anti-HLA-ABC antibody and MHC-I expression was assessed by flow cytometry. Histograms represent surface MHC-I molecule expression from one representative experiment of three independent experiments. For each experiment, HLA-ABC surface expression was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate HLA-ABC MFI from the representative experiment showed. MFI were quantified and normalized relative to the untreated (UT) control. Data are pooled from three independent experiments and are presented

as mean ± SEM. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ significantly lower than UT control.

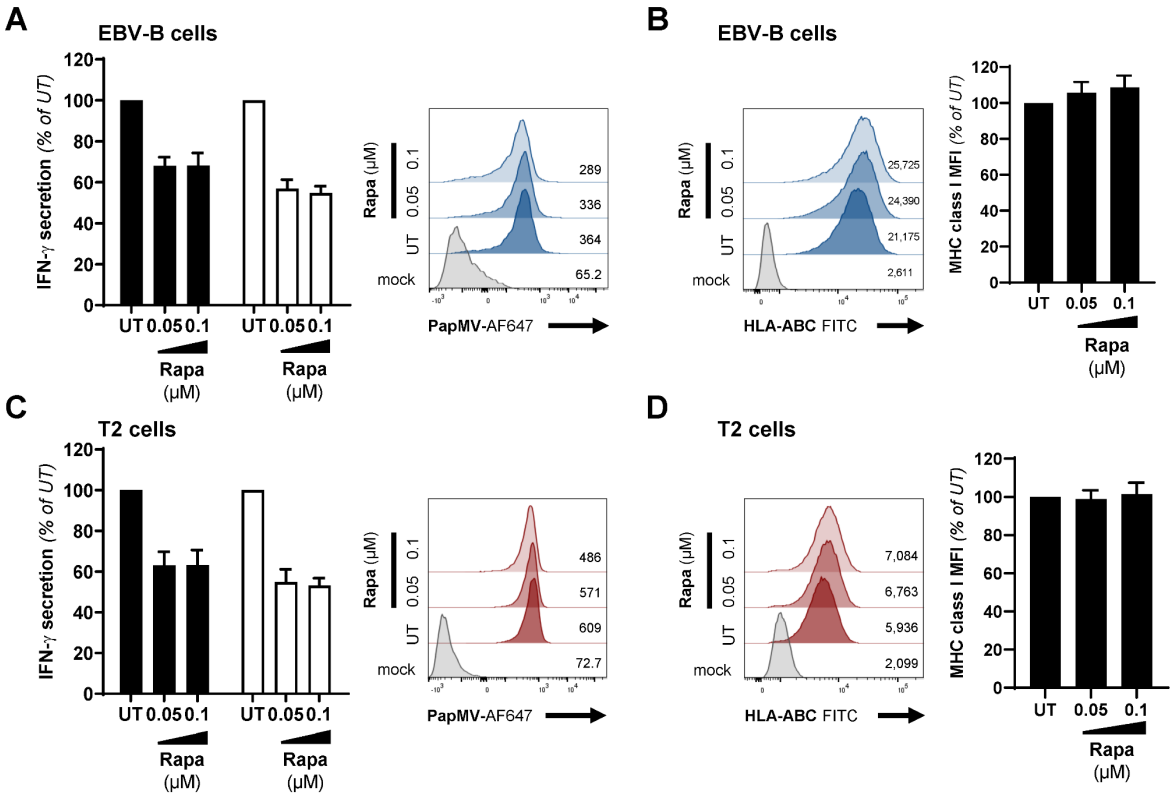


Figure 15. – (Supplementary Figure S2[ml]): Rapamycin alters antigen presentation in EBV-B and T2 cells

A, C EBV-B (**A**) and T2 (**C**) cells were pretreated for 1 hour with rapamycin (Rapa) at indicated concentrations and PapMV-gp100 (50 µg/mL) or gp100 peptide (1 µM) was added to pretreated cells without washing. Cells were incubated for 6 hours at 37°C and after extensive washing, were co-cultured with gp100-specific $CD8^+$ T lymphocytes for 16-18 hours at a 1:1 ratio. Supernatants were collected and IFN-γ secretion was quantified by ELISA to evaluate MHC-I antigen cross-presentation. Results are presented as mean ± SEM, % of IFN-γ secretion of untreated (UT) cells. Data were pooled from six (**A**) or eight (**C**) independent experiments. For each experiment, IFN-γ secretion was measured in two technical replicates for each condition. For PapMV endocytosis controls, PapMV Alexa Fluor 647 (PapMV-AF647, 10 µg/mL) was added to pretreated EBV-B (**A**) and T2 (**C**) cells and cells were incubated for 3 hours. PapMV-AF647 uptake was assessed by flow cytometry. Histograms represent PapMV-AF647 endocytosis and are representative of three (**A, C**) independent experiments. For each experiment, PapMV-AF647 uptake was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate PapMV-AF647 MFI from the representative experiment showed. **B, D** After rapamycin pretreatment EBV-B (**B**) or T2 (**D**) cells were labeled with anti-HLA-ABC antibody and MHC-I expression was assessed by flow cytometry. Histograms represent surface MHC-I molecule expression from one representative experiment of three independent experiments. For each experiment, HLA-ABC surface expression was assessed in one technical replicate for each condition. Numbers indicate HLA-ABC MFI from the

representative experiment showed. MFI were quantified and normalized relative to the UT control. Data are pooled from three independent experiments and are presented as mean ± SEM. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using two-tailed unpaired Student's t-test (**A, C)** or a one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (**B**, **D**). Statistical significance was defined at $p < 0.05$.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-89833) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC RGPIN-2016-05376). R.L. and L.A.H. are recipients of scholarships from the Fonds de la recherche du Québec – santé (FRQ-S). D.P. and L.A.H received Canderel scholarships from the Institut du cancer de Montréal. We thank the Imagerie Cellulaire core facility of CRCHUM for their help with confocal microscopy experiments. We are grateful to the Institut du cancer de Montréal for their support. We thank Gabriel Pagé for a critical review of the manuscript.

Author Contributions

D.P. and L.A.H. contributed equally, they performed all experiments and analyzed data. P.T. provided technical support and performed experiments. A.B.P. and E.G. provided ATG5 shRNAs and technical support. K.H. and M.J.H. provided technical support for confocal microscopy experiments. D.L. designed, produced, and provided PapMV VLPs. M.J.H, E.G. and D.L. provided intellectual support. L.A.H. and R.L. designed the study. D.P., L.A.H. and R.L. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript. R.L. supervised the study.

Competing Interests

D.L. is the founder and a shareholder of Folia Biotech. Inc., a Canadian Biotechnology Company with the mandate to commercialize the PapMV VLP Technology. The other authors declare no commercial or financial conflicts of interest.

References

1 Bachmann, M. F. & Jennings, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 787-796, doi:10.1038/nri2868 (2010).

2 Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G. & Bachmann, M. F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* **34**, 123-132, doi:10.1016/j.smim.2017.08.014 (2017).

3 Mohsen, M. O., Speiser, D. E., Knuth, A. & Bachmann, M. F. Virus-like particles for vaccination against cancer. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **12**, e1579, doi:10.1002/wnan.1579 (2020).

4 Pushko, P., Pumpens, P. & Grens, E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology* **56**, 141-165, doi:10.1159/000346773 (2013).

5 Hanafi, L. A. *et al.* Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. *Vaccine* **28**, 5617-5626, doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.024 (2010).

6 Lebel, M.-È., Chartrand, K., Leclerc, D. & Lamarre, A. Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines* **3**, 620-637 (2015).

7 Carignan, D. *et al.* Activation of innate immunity in primary human cells using a plant virus derived nanoparticle TLR7/8 agonist. *Nanomedicine* **14**, 2317-2327, doi:10.1016/j.nano.2017.10.015 (2018).

8 Leclerc, D. *et al.* Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. *J. Virol.* **81**, 1319-1326, doi:10.1128/JVI.01720-06 (2007).

9 Moffat, J. M., Cheong, W. S., Villadangos, J. A., Mintern, J. D. & Netter, H. J. Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine* **31**, 2310-2316, doi:10.1016/j.vaccine.2013.02.042 (2013).

10 Di Bonito, P. *et al.* Anti-tumor CD8+ T cell immunity elicited by HIV-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology* **395**, 45-55, doi:10.1016/j.virol.2009.09.012 (2009).

11 Mohsen, M. O. *et al.* Vaccination with nanoparticles combined with micro-adjuvants protects against cancer. *J Immunother Cancer* **7**, 114, doi:10.1186/s40425-019-0587-z (2019).

12 Win, S. J., Ward, V. K., Dunbar, P. R., Young, S. L. & Baird, M. A. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 681-688, doi:10.1038/icb.2010.161 (2011).

13 Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. & Rock, K. L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-165, doi:10.1016/j.immuni.2004.07.004 (2004).

14 Di Pucchio, T. *et al.* Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* **9**, 551-557, doi:10.1038/ni.1602 (2008).

15 Zehner, M. & Burgdorf, S. Regulation of antigen transport into the cytosol for cross-presentation by ubiquitination of the mannose receptor. *Mol. Immunol.* **55**, 146-148, doi:10.1016/j.molimm.2012.10.010 (2013).

16 Menager, J. *et al.* Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS One* **9**, e89897, doi:10.1371/journal.pone.0089897 (2014).

17 Blander, J. M. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 717-753, doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055523 (2018).

18 Basha, G. *et al.* MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* **3**, e3247, doi:10.1371/journal.pone.0003247 (2008).

19 Fiegl, D. *et al.* Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J. Immunol.* **190**, 2791-2806, doi:10.4049/jimmunol.1202741 (2013).

20 Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 722-737, doi:10.1038/nri3532 (2013).

21 Puleston, D. J. & Simon, A. K. Autophagy in the immune system. *Immunology* **141**, 1-8, doi:10.1111/imm.12165 (2014).

22 Van Kaer, L., Parekh, V. V., Postoak, J. L. & Wu, L. Role of autophagy in MHC class I-restricted antigen presentation. *Mol. Immunol.* **113**, 2-5, doi:10.1016/j.molimm.2017.10.021 (2019).

23 Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 349-364, doi:10.1038/s41580-018-0003-4 (2018).

24 Wu, C., Aichinger, M., Nedjic, J. & Klein, L. Thymic epithelial cells use macroautophagy to turn their inside out for CD4 T cell tolerance. *Autophagy* **9**, 931-932, doi:10.4161/auto.24374 (2013).

25 Aichinger, M., Wu, C., Nedjic, J. & Klein, L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.* **210**, 287-300, doi:10.1084/jem.20122149 (2013).

26 English, L., Chemali, M. & Desjardins, M. Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. *Autophagy* **5**, 1026-1029, doi:10.4161/auto.5.7.9163 (2009).

27 English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* **10**, 480-487, doi:10.1038/ni.1720 (2009).

28 Budida, R. *et al.* Herpes simplex virus 1 interferes with autophagy of murine dendritic cells and impairs their ability to stimulate CD8(+) T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **47**, 1819-1834, doi:10.1002/eji.201646908 (2017).

29 Tey, S. K. & Khanna, R. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* **120**, 994-1004, doi:10.1182/blood-2012-01-402404 (2012).

30 Salter, R. D., Howell, D. N. & Cresswell, P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**, 235-246, doi:10.1007/BF00375376 (1985).

31 Gromme, M. & Neefjes, J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol. Immunol.* **39**, 181-202, doi:10.1016/s0161-5890(02)00101-3 (2002).

32 Gromme, M. *et al.* Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10326-10331, doi:10.1073/pnas.96.18.10326 (1999).

33 McCoy, K. L. & Schwartz, R. H. The role of intracellular acidification in antigen processing. *Immunol. Rev.* **106**, 129-147, doi:10.1111/j.1600-065x.1988.tb00777.x (1988).

34 Rock, K. L., Farfan-Arribas, D. J. & Shen, L. Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J. Immunol.* **184**, 9-15, doi:10.4049/jimmunol.0903399 (2010).

35 Ressing, M. E., Luteijn, R. D., Horst, D. & Wiertz, E. J. Viral interference with antigen presentation: trapping TAP. *Mol. Immunol.* **55**, 139-142, doi:10.1016/j.molimm.2012.10.009 (2013).

36 Hansen, S. G. *et al.* Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* **328**, 102-106, doi:10.1126/science.1185350 (2010).

37 Croft, N. P. *et al.* Stage-specific inhibition of MHC class I presentation by the Epstein-Barr virus BNLF2a protein during virus lytic cycle. *PLoS Pathog.* **5**, e1000490, doi:10.1371/journal.ppat.1000490 (2009).

38 Oliveira, C. C. & van Hall, T. Importance of TAP-independent processing pathways. *Mol. Immunol.* **55**, 113-116, doi:10.1016/j.molimm.2012.10.005 (2013).

39 Oliveira, C. C. & van Hall, T. Alternative Antigen Processing for MHC Class I: Multiple Roads Lead to Rome. *Front. Immunol.* **6**, 298, doi:10.3389/fimmu.2015.00298 (2015).

40 de la Salle, H. *et al.* Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J. Immunol.* **158**, 4555-4563 (1997).

41 Bhattacharjee, S. *et al.* Transcriptional and epigenetic modulation of autophagy promotes EBV oncoprotein EBNA3C induced B-cell survival. *Cell Death Dis.* **9**, 605, doi:10.1038/s41419-018-0668-9 (2018).

42 Dasari, V. *et al.* Autophagy and proteasome interconnect to coordinate cross-presentation through MHC class I pathway in B cells. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 964-974, doi:10.1038/icb.2016.59 (2016).

43 Shang, L. *et al.* Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4788-4793, doi:10.1073/pnas.1100844108 (2011).

44 Zou, L. *et al.* The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15801-15806, doi:10.1073/pnas.0905684106 (2009).

45 Makarkov, A. I. *et al.* Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages. *NPJ Vaccines* **4**, 17, doi:10.1038/s41541-019-0111-y (2019).

46 Longatti, A. *et al.* TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **197**, 659-675, doi:10.1083/jcb.201111079 (2012).

47 Chen, L. & Jondal, M. Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 952-960, doi:10.1002/eji.200324359 (2004).

48 Pallet, N. *et al.* A comprehensive characterization of membrane vesicles released by autophagic human endothelial cells. *Proteomics* **13**, 1108-1120, doi:10.1002/pmic.201200531 (2013).

49 Fader, C. M. & Colombo, M. I. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* **2**, 122-125, doi:10.4161/auto.2.2.2350 (2006).

50 Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. CD40-stimulated B Lymphocytes Pulsed with Tumor Antigens Are Effective Antigen-presenting Cells That Can Generate Specific T Cells. *Cancer Res.* **63**, 2836-2843 (2003).

51 Matheoud, D. *et al.* Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* **14**, 15-25, doi:10.1016/j.chom.2013.06.003 (2013).

Chapitre 3 – Manuscrit II

CD40L-stimulated human B lymphocytes are polarized toward antigen-presenting cell functions after exposure to the combination of IL-4 and IL-21

Manuscrit **soumis à *The Journal of Immunology*** (octobre 2020)

Contribution des auteurs :

D. Possamaï est responsable de l'ensemble des travaux de recherche. G. Pagé a fourni une contribution technique lors de la réalisation des essais de reconnaissance (Figure 6). R. Panes et É. Gagnon ont fourni un support technique pour les expériences d'évaluation de la formation de synapses immunologiques (Figure supplémentaire S3 du manuscrit). D. Possamaï et R. Lapointe sont responsables du design expérimental et de la rédaction du manuscrit. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

CD40L-stimulated B lymphocytes are polarized toward antigen-presenting cell functions after exposure to IL-4 and IL-21

David Possamaï[1,2], Gabriel Pagé[1,2], Rébecca Panes[3,4], Étienne Gagnon[3,4] and Réjean Lapointe[1,2,*]

[1]Axe Cancer, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), and Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC, H2X 0A9, Canada.

[2]Faculté de Médecine, Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

[3]Axe de Recherche en Immunobiologie du Cancer, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

[4]Faculté de Médecine, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

[*]Corresponding author: Réjean Lapointe.

Running title: IL-4 and IL-21 exposure create antigen-presenting B cells.

Abstract

B lymphocytes have multiple functions central to humoral immunity, including antigen (Ag) presentation to T cells, cytokine secretion and differentiation into antibody-secreting plasma cells (ASC). *In vitro* expansion of human B lymphocytes by continuous interleukin (IL)-4 stimulation and engagement of their CD40 receptor by CD40 ligand (CD40L) has allowed the use of these IL-4-CD40-B cells in research for the induction of Ag-specific immune responses. However, *in vivo*, follicular helper T cells also influence B cell activity through the secretion of IL-21. The impact of both cytokines on multiple B cell functions is not clearly defined. To further understand these cytokines in CD40-B cell biology, we stimulated CD40-B cells with IL-4, IL-21 or both (Combo) and characterized the proliferation response and B cell subsets. We demonstrate that IL-4- and Combo-CD40-B cells were mostly activated mature B cells, whereas IL-21 stimulation polarized B cells to functional ASC. We show that Combo-CD40-B cells expressed secondary lymphoid organ homing molecules and had a secretory phenotype similar to IL-4-CD40-B cells. Furthermore, we show that both IL-4- and Combo-CD40-B cells expressed molecules associated with favorable Ag-presenting cell (APC) functions with higher co-stimulatory molecules and lower negative immune checkpoint ligand levels, and were as efficient in promoting Ag-specific T cell activation and proliferation when compared to IL-21-CD40-B cells. Thus, *in vitro* stimulation of human B lymphocytes with CD40L and IL-21 polarize to ASC, while IL-4 or Combo generates cells with strong APC functions, providing a useful tool for research and clinical applications such as cancer immunotherapy.

Keywords

B lymphocytes; CD40; Interleukin-4; Interleukin-21; CD40-B cells; Antigen-presenting cells; T lymphocyte activation; Antibody production.

Introduction

B lymphocytes play a central role in humoral immunity due to their differentiation into immunoglobulin (Ig)-secreting plasma cells (PC)[1, 2]. They also contribute to the immune response by antibody (Ab)-independent mechanisms[2, 3] and act as antigen (Ag)-presenting cells (APC) for T cells[4-7]. Through cytokine secretion, B cells influence the development of lymphoid tissues, shape effector and memory T cell responses[8-10], and can negatively regulate immune responses[9, 11-14].

Classical B cell immune reactions occur in germinal centers (GC) in secondary lymphoid organs (SLO). In mature GC, B cells that underwent class-switch recombination[15] organize and cycle between the dark zone (DZ) and light zone (LZ) by expressing C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and CXCR5, respectively[16]. In the DZ, B cells proliferate and undergo somatic hypermutations. LZ B cells are subjected to affinity-based selection of their mutated B cell receptors for improved binding to immunizing Ag, with the help of T follicular helper (T_{FH}) cells and follicular dendritic cells[16, 17]. Activated T_{FH} cells express CD40 ligand (CD40L) and help GC B cells via CD40 signaling, which is crucial for B cell survival and maintenance of the GC reaction[2].

T_{FH} cells also secrete cytokines such as interleukin (IL)-4 and IL-21 which influence B lymphocyte phenotype and activity[17]. IL-4 activates mainly signal transducer and activator of transcription (STAT)6 whereas IL-21 predominantly signals via STAT3, thus enabling the regulation of different gene subsets[18]. IL-4 has an anti-apoptotic effect on B cells through the induction of B-cell lymphoma-extra large (BCL-xL)[19] and upregulation of glycolytic metabolic processes[20]. IL-4 with CD40 signaling promotes isotype switching to IgG and IgE[21-24]. In mouse models, IL-21 regulates the GC response by maintaining expressions of transcription factors B-cell lymphoma-6 (BCL-6) and AP-4 in GC B cells, which are critical for GC persistence, function, and output[25-28]. As a potent inducer of B cell proliferation[29, 30], IL-21 regulates Ig production and isotype switching[31-33]. IL-21 induces the secretion of IgG, IgM, IgA but is a negative regulator of IgE responses in human B cells[32, 34-38]. Moreover, IL-21 promotes the expression of transcriptional repressor B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1), which inhibits the expression of BCL-6 and paired box 5 (PAX-5), and drives the differentiation of B cells into Ab-secreting PC (ASC) both *in vitro* and *in vivo*[30, 32, 33, 39-42].

Human B-cell lines established by continuous *in vitro* stimulation by the CD40 pathway and IL-4 (IL-4-CD40-B cells)[43, 44], have been used for the induction of an Ag-specific immune responses and are highly efficient APC for Ag-specific T cell activation[45]. We have demonstrated that Ag-unspecific IL-4-CD40-B cells pulsed with melanoma lysates efficiently process and present exogenous Ag by major histocompatibility complex (MHC) class II and activate both Ag-specific memory $CD4^+$ T cells[46] and naive $CD4^+$ T cells[47]. Ag-pulsed, *ex vivo*-generated IL-4-CD40-B cells present Ag to T cells by MHC class I or class II, possess potent immunostimulatory properties and are capable of priming $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells both *in vitro* and *in vivo*[48-53]. *In vitro*-expanded IL-4-CD40-B cells are also a potential alternative to dendritic cells (DC) for research and clinical applications such as cancer immunotherapy, circumventing the difficulties in DC generation[5, 45]. Furthermore, *ex vivo*-generated human IL-4-CD40-B cells express adhesion molecules and chemokine receptors for homing to SLO and can migrate toward their respective ligands *in vitro,* suggesting that they could migrate to SLO and interact with T cells *in vivo*[54, 55]. However, these *in vitro* studies use only CD40L and IL-4[43, 56], whereas *in vivo,* T_{FH} cells help B cells by expressing CD40L, IL-4 and IL-21. The IL-21 receptor (IL-21R) is upregulated in B cells following CD40 stimulation *in vitro*[30, 57]. As IL-21 can also induce B cell proliferation, we hypothesized that stimulating peripheral blood B lymphocytes with CD40L and both IL-4 and IL-21 would generate fast proliferating B cells with strong APC functions capable of inducing T cell activation.

In this report, we characterized B cells stimulated with CD40L and the combination of IL-4 and IL-21 (Combo-CD40-B cells). We demonstrate that Combo-CD40-B cells are mostly activated mature B cell subsets that secrete cytokines/chemokines and express molecules associated with strong APC functions. We further show that Combo-CD40-B cells are as efficient as IL-4-CD40-B cells in presenting Ag and promoting T cell activation and proliferation *in vitro,* and are more potent than IL-21-CD40-B cells which are mainly composed of ASC. These results provide further insights into CD40-B cell biology and show for the first time that the stimulation with CD40L, IL-4 and IL-21 generates highly proliferating B cells with efficient APC functions.

Material and Methods

Isolation of Human CD14$^+$ Monocytes and B Lymphocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation from healthy donors (male and female aged 22 to 39 years old) as previously described[58, 59]. All donors gave informed written consent before collection of the samples per the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the institutional Ethics Committee (REB number 2011-3681). After the last wash, cells were resuspended at 1×10^8 cells/mL in isolation medium comprised of Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (D-PBS; Wisent) supplemented with 2% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1 mM EDTA (Invitrogen). Total monocytes were isolated from PBMC by immunomagnetic positive selection using EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit II (STEMCELL™ Technologies) following the kit's instructions. Total B lymphocytes were subsequently purified from CD14$^+$ monocyte-depleted PBMC by immunomagnetic negative selection using EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit (STEMCELL™ Technologies) following the kit's instructions. Cells enriched by this method were ≥98% CD19$^+$ as determined by flow cytometry.

Generation of CD40-activated B Lymphocytes and Monocyte-derived Dendritic Cells

Purified B lymphocytes were resuspended at 1×10^6 cells/mL in I7.5% HS medium comprised of Iscove's modified Dulbecco's medium (I, Wisent), 7.5% (v/v) heat-inactivated (HI) human AB serum (HS, Sigma-Aldrich), 2 mM GlutaMAX (Gibco), 100 IU/mL-100 µg/mL penicillin-streptomycin (Wisent) and 10 µg/mL gentamicin sulfate (Wisent), supplemented with 5% (v/v) of Human UltraCD40L™ (Multimeric Biotherapeutics, Inc.), 50 ng/mL recombinant IL-4 and/or IL-21 (both from PeproTech) and cultured in 24-well plates for 3 days. On day 3, cells were re-stimulated by adding 300 µL of I7.5% HS medium supplemented with CD40L and cytokines as mentioned above. Transmitted light images were captured on days 1 and 3 of culture using the EVOS FL imaging system (ThermoFisher Scientific) with a 4X phase objective. From days 4 to 12, cells were monitored and once the density reached 2×10^6 cells/mL, B cells were diluted to 1×10^6 cells/mL in I7.5% HS medium supplemented with CD40L and cytokines as mentioned above. Purified CD14$^+$ monocytes were resuspended at 1×10^6 cells/mL in Roswell Park Memorial

Institute-1640 (RPMI-1640, Wisent) supplemented with 5% (v/v) HI human AB serum, 2 mM GlutaMAX, 100 IU/mL-100 µg/mL penicillin-streptomycin, 10 µg/mL gentamicin sulfate and 25 mM HEPES (Wisent), 80 ng/mL of recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, PeproTech) and 40 ng/mL of recombinant IL-4 and cultured in 6-well plates for 6 days. Every other day, half of the medium was replaced with fresh medium supplemented with cytokines at final concentrations mentioned above. On day 6, monocyte-derived DC (MoDC) were matured by replacing half of medium with fresh medium supplemented with 5% (v/v) of Human UltraCD40L™ and cultured for another 2 days[60]. CD40-B cells were collected on day 9 for co-culture experiments whereas MoDC were collected on day 8 for analysis or co-culture experiments.

Flow Cytometry Analysis

Cell surface and intracellular stainings were performed as described previously[58, 59, 61, 62] using Abs (BD Biosciences) listed in Supplementary Table 1. Dead cells were stained with the LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Flow cytometry data were acquired using a BD LSRFortessa™ instrument (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo™ Software version 10.6.2 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR). The full gating strategy and representative dot plots for each marker are presented in Supplementary Figure S2.

Cell Proliferation Assays

To assess proliferative responses of cultured cells, B cells were isolated as described above and labeled with CellTrace™ Violet (CTV; Invitrogen) following the kit's instructions. Briefly, purified B cells were resuspended at 1×10^6 cells/mL in a solution of 5 µM of CTV in D-PBS and incubated at 37°C for 20 minutes protected from light. Labeling was quenched and cells were washed with I7.5% HS culture medium. Then 2×10^5 purified CTV stained B cells were cultured as described above in duplicate in 96-well round-bottom microwell plates. At day 6 of culture, cells were collected and stained with LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Flow cytometry data were acquired and analyzed as described above. Briefly, each proliferation peak was assigned a division number i (undivided cells; i = 0) and the number of cells N in each peak was measured (N(i) = number of events in division i). For each condition, a division index was

calculated as the total number of divisions $\sum \frac{i \times N_i}{2^i}$ to the number of cells at the start of culture $\sum \frac{N_i}{2^i}$:

$$Division\ index = \frac{\sum \frac{i \times N_i}{2^i}}{\sum \frac{N_i}{2^i}}$$

The division index is the average number of cell divisions that a cell in the original population has undergone.

Immunoglobulin Quantification in Cell Supernatants

IgA, IgM and total IgG concentrations from culture supernatants were determined using standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (all from Invitrogen) as per the manufacturer's instructions. Baselines from commercial human AB serum (Sigma-Aldrich) were inside the accepted ranges of reference values for normal human sera for clinical diagnostic purposes (total IgG, 7.0-16.0 g/L; total IgA, 0.7-4.0 g/L; IgM, 0.4-2.3 g/L).

Human Cytokine and Chemokine Quantification in Cell Supernatants

Secreted soluble cytokines/chemokines (Supplementary Table 2) were measured from cryopreserved supernatants of IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cell cultures collected on days 6, 9 and 12 using V-plex Ultra-Sensitive kit (Meso Scale Diagnostics). Quantification of secreted cytokines and chemokines was performed as per the kit's instructions. Electroluminescent data were collected with the MESO QuickPlex SQ120 (Meso Scale Diagnostics) and analyzed with a four-parameter logistic curve fit using the DISCOVERY WORKBENCH software 4.0 (Meso Scale Diagnostics).

Recognition Assays

APC (CD40-B cells or MoDC) were cultured as described above and recognition assays were performed as described previously[46, 62]. Briefly, APC were collected, washed in D-PBS, resuspended at 1×10^6 cells/mL in their respective cytokine-supplemented media and pulsed for 6 hours at 37°C with g209-2M peptide (IMDQVPFSV) or an irrelevant peptide (both human

leukocyte antigen (HLA)-A*0201 specific and from JPT Peptide Technologies GmbH) at indicated concentrations. Cells were extensively washed in D-PBS and resuspended at 1×10^6 cells/mL in R10% HS medium comprised of RPMI-1640 supplemented with 10% (v/v) HI human AB serum, 2 mM GlutaMAX, 100 IU/mL-100 µg/mL penicillin--streptomycin, 10 µg/mL gentamicin sulfate and 25 mM HEPES. Melanoma glycoprotein (gp)100-specific $CD8^+$ T cell clone (L2D8 g209 T cells) was kindly provided by Mark Dudley (National Cancer Institute; NIH, Bethesda, MD). L2D8 g209 T cells are specific to native (ITDQVPFSV) and modified (g209-2M; IMDQVPFSV) versions of gp100 HLA-A*0201-restricted epitope (positions 209-217). Resting L2D8 g209 T cells were collected and resuspended at 1×10^6 cells/mL in R10% HS. For co-culture assays, 2.5×10^4 APC and 2.5×10^4 T cells (ratio 1:1) were seeded in duplicate in 96-well round-bottom microwell plates and cells were incubated for 16 to 20 hours at 37°C. Interferon (IFN)-γ secretion in culture supernatants was measured by standard ELISA as described previously[62]. Supernatants from T cells only and T cells stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL; Sigma-Aldrich)/Ionomycin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) were used as controls and the limit of detection for IFN-γ concentration was set to 15.6 pg/mL. Cells were collected and stained with LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit and for surface markers CD3, CD8 and 4-1BB, OX40 or intracellular IFN-γ, tumor necrosis factor (TNF)-α (Abs listed in Supplementary Table 1) as described previously[58, 59, 61, 62]. Cells were analyzed by flow cytometry.

ELISPOT

IFN-γ enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) was performed as described previously[62]. Briefly, APC were pulsed for 6 hours at 37 °C with 1 µM of Cytomegalovirus, Epstein Barr virus and influenza virus peptide pool (CEF; Mabtech Inc) or irrelevant peptide pool. Extensively washed autologous APC were resuspended at 1×10^6 cells/mL in R10% HS, and 5×10^4 cells were added to wells containing 5×10^4 T cells in R10% HS medium. Cells were incubated for 16–20 hours at 37 °C in a CO_2 incubator. Cells were discarded and ELISPOT plates were processed as per the Human Interferon gamma ELISPOT Kit's instructions (Abcam). Spot forming units (SFU) were counted with the ImmunoSpot Series 3B Analyzer (Cellular Technology Ltd.) and ImmunoSpot® software v5.0. Medium only, T cells only and T cells stimulated with PMA (50 ng/mL)/Ionomycin (1 µg/mL) were used as controls.

Mixed Lymphocyte Reaction and T Cell Proliferation Assay

Mixed lymphocyte reactions (MLR) were performed as described previously[46, 63]. Briefly, APC were collected, washed, resuspended at 1×10^6 cells/mL in R10% HS and irradiated at 15 Gy. On the same day, allogeneic T cells were isolated from PBMC by negative selection using EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL™ Technologies) following the kit's instructions. To assess proliferative responses of cultured cells, enriched T cells were labeled with CTV as described above for B cells. Then, 1×10^5 allogeneic-enriched T cells were co-cultured for 6 days with irradiated APC in 96-well flat-bottom tissue culture plates at an APC:T cell ratio of 1:4 and 1:1. T cells only and T cells stimulated with plate-bound anti-CD3 monoclonal Ab (clone OKT3, 1 µg/mL; eBioscience™), soluble anti-CD28 monoclonal Ab (clone CD28.2, 1 µg/mL; BD Biosciences) and recombinant human IL-2 (300 UI/mL; Novartis Pharmaceuticals PROLEUKIN®) were used as controls. On day 6, T cell proliferation was monitored by flow cytometry. Division indexes were calculated as mentioned above.

Statistical Analysis

When comparing multiple treatments at a single time point, statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference). When comparing multiple treatments at several time points, statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. Statistical significance was defined at $p < 0.05$. Phenotypic analysis was performed with 10 healthy donors. All *in vitro* assays were repeated at least three times. Data were analyzed using Prism - GraphPad Software v8.4.2 (San Diego, CA, USA).

Results

Culture of primary B cells with CD40L and IL-4 and/or IL-21 induces strong proliferation and distinct B cell subsets

To study the impact of IL-21 vs. IL-4 or the combination of both cytokines on B cell biology, we evaluated the proliferation of human B lymphocytes enriched from PBMC and stimulated with CD40L and either IL-4 (IL-4-CD40-B) or IL-21 (IL-21-CD40-B) or both cytokines (Combo-CD40-B) (Figure 1A). After one day, we observed small cell clumps in all conditions (Figure 1B), which grew significantly bigger after three days in culture, suggesting cell proliferation. IL-21- and Combo-CD40-B cells also formed irregularly shaped clumps compared to the round morphology of IL-4-CD40-B cell clumps (Figure 1B). CD40L alone or cytokines alone did not induce proliferation (Figure 1C). IL-21- and Combo-CD40-B cells both showed stronger proliferation profiles than IL-4-CD40-B cells as shown by higher division indexes (Figure 1C). Stimulation with higher cytokine concentrations showed no significant differences in cell proliferation, confirming that differences were not due to suboptimal cytokine concentrations (Supplementary Figure S1A-B). Our results demonstrate that IL-21 alone or in combination with IL-4 significantly increased B cell proliferation at early time points.

To characterize B cell phenotypes associated with unstimulated, IL-4-, IL-21- or Combo-CD40-B, we examined B cell subsets every 3 days for up to day 12 of culture (Figure 1A) using the mature B cell (Bm)1-Bm5 nomenclature[64, 65] based on surface markers CD38 vs. IgD. Freshly isolated unstimulated B lymphocytes were a heterogenous population mostly composed of resting naive Bm1/2 cells ($CD38^{-/low}IgD^{+}$) and early (e) memory eBm5/Bm5 cells ($CD38^{-/low}IgD^{-}$). Pre-GC B cells ($CD38^{high}IgD^{+}$) and Bm3/4 cells ($CD38^{high}IgD^{-}$) corresponding to GC B cells (centroblasts/centrocytes) and plasmablasts (PB)/PC were only detected at very low frequencies (Figure 1D-E). Over the 12-day culture, the frequency of Bm1/2 cells decreased in all three conditions while the number of cells displaying mature phenotypes (eBm5/Bm5 and/or Bm3/4) increased (Figure 1D-E). The frequency of Bm1/2 cells was similar in IL-21- and Combo-CD40-B cells and was significantly lower than IL-4-CD40-B cells. The decrease in Bm1/2 subset was associated with an increase in eBm5/Bm5 cells in both IL-4 and Combo conditions. In comparison,

the number of eBm5/Bm5 cells in IL-21-CD40-B lymphocytes increased up to day 6 then dropped at day 9 (Figure 1E, top right panel). At day 6, nearly 13% of IL-21-CD40-B cells displayed a Bm3/4 phenotype, whereas ≤2% of Bm3/4 cells were identified in IL-4- and Combo-CD40-B cells. This subset increased over the next 6 days of culture. At day 9, ~33% Bm3/4 IL-21-CD40-B cells were identified compared to ~19% and ≤1% in Combo- and IL-4-CD40-B cells, respectively (Figure 1E, bottom left panel). Similarly, a slight increase of pre-GC B cells was observed in IL-21- and Combo-CD40-B cells but not in IL-4-CD40-B cells (Figure 1E, bottom right panel). These fluctuations in B cell subsets induced by IL-4, IL-21 and Combo were also observed using the CD27 vs. IgD classification system[65, 66] (Supplementary Figure S1C-D).

These results demonstrate that induction of different B cell subsets was dependent on the cytokine used. IL-21 drives B cells toward more mature phenotypes whereas IL-4 alone has a mild impact on CD40-B cell subsets. These data showed that Combo-CD40-B cells were heterogenous and mostly composed of activated/mature cells.

IL-21 signaling induces distinct memory B cell subsets and drives the generation of antibody-secreting cells

For B cell classification of peripheral blood B cells, the CD38 vs. IgD nomenclature[64] combines different types of memory (Me) B cells in eBm5/Bm5 subsets and regroups GC B cells and PB/PC into the Bm3/4 subset. Since these subsets were induced in IL-21- and Combo-CD40-B cells, we aimed to resolve more precisely these subsets.

Me B cells were gated on live $CD19^+CD27^+$ cells and subpopulations were identified based on surface expressions of IgM vs. IgD (Supplementary Figure S2A). Unstimulated B lymphocytes were composed of ~51% of $IgM^{low/+}IgD^+$ natural Me, ~38% of IgM^-IgD^- switched post-GC Me, and ~11% of IgM^+ post-GC Me B cells (Figure 2A-B). While IL-4 did not significantly change the proportion of all Me B cell subsets compared to unstimulated B cells, IL-21 and Combo induced differentiation of natural Me B cells into both IgM^+ and IgM^-IgD^- switched post-GC Me B cells (Figure 2A-B). Thus, under our conditions, IL-21 signaling induced the switch from surface IgM/IgD to other Ig.

Since our classification could not distinguish conventional $CD27^+$ switched Me cells and activated $CD27^+$ PB/PC, we examined if our culture conditions could induce functional Ab-secreting PB ($IgD^-CD27^{high}CD38^{high}$) and terminally differentiated PC ($IgD^-CD27^{high}CD38^{high}CD138^+$) as indicated by generations of Bm3/4 cells and $CD27^+IgM^-IgD^-$ cells in IL-21- and Combo-CD40-B cells (Supplementary Figure S2A, bottom panel).

PB or PC were not generated in IL-4-CD40-B cells (Figure 2 C-D). However, from days 3 to 12, we detected an increase of $IgD^-CD27^{high}CD38^{high}$ cells among IL-21- and Combo-CD40-B cells indicating the differentiation of B lymphocytes toward a PB/PC phenotype. At day 9, frequency of $IgD^-CD27^{high}CD38^{high}$ PB/PC was significantly higher with IL-21 stimulation than with Combo (~6% vs. ~31%, respectively) (Figure 2 C-D). Among these cells, frequencies of $CD138^+$ cells were also significantly higher in IL-21-CD40-B cells (~22%) compared to Combo-CD40-B cells (5%) (Figure 2 C-D). To validate these results, we evaluated the concentration of secreted IgA, IgM and IgG in day 12 cell culture supernatants. IL-21-CD40-B cells secreted significantly higher concentrations of IgM, total IgA and IgG than Combo-CD40-B cells. In contrast, IL-4-CD40-B cells produced only low amounts of IgM and IgG (Figure 2E).

Taken together, IL-21 demonstrates a potent role in inducing Ig switch and in driving PB/PC differentiation *in vitro*. IL-4 had only a dim impact on Me B cell compartments and did not induce differentiation of PB or mature PC. Its added presence in Combo seems to dampen the IL-21 effect on B cells.

Activation molecules and SLO homing molecules are differently regulated by IL-4-, IL-21-, and Combo-CD40-B cells

We evaluated the modulation of activation molecules and expressions of chemokine receptors and adhesion molecules by IL-4-, IL-21-, and Combo-CD40-B cells. Since MoDC are regarded as traditional APC, CD40L-matured MoDC were produced as reference (Figure 3A).

The expression of CD21 and the surrogate marker of early activation CD69 was evaluated as those molecules are classically modulated following B cell activation. As expected, CD21 and CD69 were not detected on MoDC (Figure 3B). CD21 was expressed by ≥85% of unstimulated B cells, indicating a resting state. Upon stimulation, the frequency of $CD21^+$CD40-B cells decreased

gradually overtime. We measured a significantly lower frequency of $CD21^{+}$IL-4-CD40-B cells (~6% on day 9) compared to IL-21- and Combo-CD40-B cells (~43% vs. ~31%, respectively) (Figure 3B). CD69 was detected within 3 days as nearly 84% of IL-4-CD40-B cells expressed this marker by day 3. In comparison, activation with IL-21 (~53%) or Combo (~63%) was less prominent (Figure 3B). Whereas 65% of IL-4-CD40-B cells retained CD69 expression for up to day 12, its expression was transient and rapidly downregulated close to baseline levels by day 6 for IL-21- and Combo-CD40-B cells (Figure 3B).

Because expression of the IL-2R α-chain (CD25) by B cells has been linked to a mature phenotype with better proliferative and APC capacities[67, 68], we evaluated CD25 expression by CD40-B cells. CD25 induction was detected in all three groups within 3 days as ≥50% of CD40-B cells were $CD25^{+}$ but IL-21- and Combo-CD40-B cells displayed the highest frequency of $CD25^{+}$ cells on day 6 (~77% vs. ~92% respectively). However, CD25 expression was transient and CD25-expressing B cells were reduced to ~10% by day 12 for IL-4- and Combo-CD40-B cells whereas nearly 34% of IL-21-CD40-B cells retained CD25 expression (Figure 3B).

To investigate the capacity of CD40-B cells to migrate to SLO for T cell activation, we characterized the expression of SLO homing molecule C-C chemokine receptor type 7 (CCR7), CXCR4, CXCR5 and CD62L. Most B cells expressed CXCR4 (~72%), CXCR5 (~95%) and CD62L (~56%) but only 10% of enriched B cells were $CCR7^{+}$ (Figure 3C). Upon activation, the frequency of $CD62L^{+}$IL-4-CD40-B cells remained constant for 12 days whereas CD62L expression was induced in nearly 90% of IL-21- and Combo-CD40-B cells within 3 days and remained stable. IL-4-CD40-B cells gradually downregulated CXCR5 whereas IL-21-CD40-B cells mildly downregulated CXCR5 expression as nearly 15% and 65% of $CXCR5^{+}$ CD40-B cells were detected on day 12. Interestingly, the frequency of $CXCR5^{+}$Combo-CD40-B cells (≥ 80%) was stable up to day 9 but was significantly decreased by day 12 (~38%) (Figure 3C, bottom panel). Although $CCR7^{+}$ CD40-B cells decreased overtime for all groups, a significantly higher frequency of $CCR7^{+}$IL-4-CD40-B cells was detected compared to IL-21- or Combo groups. Nearly 30% of MoDC expressed CCR7 but lacked the expression of CD62L, CXCR4 and CXCR5 (Figure 3C). CXCR4 expression was abruptly downregulated by Combo- and IL-4-CD40-B cells whereas ≥40% IL-21-CD40-B cells retained its expression from days 3 to 12 (Figure 3C, bottom left panel).

These results may be explained by the generation of Bm3/4 cells (GC B cells and PB/PC) in IL-21-CD40-B cells as CXCR4 and CXCR5 orchestrate B cell migration from the DZ and LZ respectively, in GC. CXCR4 also directs PB/PC toward specific niches in SLO and the bone marrow[69, 70].

Our results suggest that CD40-B cells could migrate into SLO with IL-21- and Combo-CD40-B cells showing a higher propensity than IL-4-CD40-B based on CD62L and CXCR5 expression. The expression kinetics of these receptors suggests that their migratory properties are stronger at early time points.

CD40-B cells secrete multiple cytokines and chemokines

Under appropriate conditions, B cells can differentiate into effector B cell subsets 1 and 2 (Be1 and Be2 cells), which secrete T_H1- and T_H2-associated cytokines, respectively[10, 71]. Since phenotypic differences were distinct by day 6 of culture, we evaluated the secretion of chemokines and cytokines by multiplex assay in IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cell culture supernatants collected on days 6, 9 and 12.

T_H1 cytokines IFN-γ, TNF-α, IL-2 and IL-12p70, and T_H2 cytokines IL-10 and IL-13 were detected in both IL-4- and Combo-CD40-B cell supernatants (Figure 4A-B). IFN-γ, IL-12p70, IL-10 and IL-13 were secreted at similar levels by both cell types on days 6 to 12 (Figure 4A-B). TNF-α was detected at higher concentrations in the supernatant of IL-4-CD40-B cells at day 12 (Figure 4A). IL-4 secretion was also detected but was out of the kit's range compared to IL-5, which was not detected in all three conditions (data not shown). Pro-inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 were also secreted by both IL-4- and Combo-CD40-B cells with a ~10-fold higher secretion of IL-6 by IL-4-CD40-B cells than Combo-CD40-B cells on day 9 (Figure 4A-B). T_H1 or T_H2 cytokine secretion by IL-21-CD40-B cells was either low (IL-2, IL-6, IL-10, IL-13 and TNF-α) or undetectable (IFN-γ and IL-1β) (Figure 4A-B).

IL-21 or Combo induced a higher production of chemokines CCL3 (C-C motif chemokine) and CCL4 compared to IL-4 (Figure 4C, top panel). Similar CCL3 levels were in IL-21- and Combo-CD40-B cell supernatants. Although not significant, CCL4 secretion was higher in IL-21-CD40-B cells (Figure 4C, top panel). CXCL10 secretion was induced by all conditions but was

higher in Combo-CD40-B cell supernatant whereas similar C-X-C motif chemokine 8 (CXCL8) levels were detected (Figure 4C, bottom panel). Interestingly, IL-21 appeared to promote secretion of IL-7 and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion but not GM-CSF compared to IL-4 or Combo stimulation (Figure 4D).

Thus, *in vitro* stimulation of CD40-B cells with IL-4 or Combo seems to induce both Be1 and Be2 cells, while IL-21 favored secretion of chemokines and VEGF. Our results suggest that Combo-CD40-B cells could influence T cell chemotaxis, differentiation and activation.

IL-4 and Combo induce the expression of markers associated with antigen-presentation and T cell stimulation

To evaluate if IL-21- and Combo-CD40-B cells could act as potent APC, we evaluated the expression of co-stimulatory and co-inhibitory ligands by IL-4-, IL-21- or Combo-CD40-B cells and CD40L-matured MoDC.

From days 0 to 12, ≥95% of IL-4- and Combo-CD40-B cells stably expressed MHC class I and II. However, higher geometric mean fluorescence intensity (MFI) ratios indicated more MHC molecules were expressed on Combo-CD40-B cells compared to IL-4-CD40-B cells. Although the frequency of MoDC expressing HLA-DR was similar to IL-4- and Combo-CD40-B cells, we detected a significantly lower number of HLA-ABC$^+$ MoDC than Combo-CD40-B cells. Also, HLA-DR$^+$ IL-21-CD40-B cells gradually decreased down to ~79% by day 12 and MFI ratios also indicated that the number of MHC class II molecules on the cell surface was lower compared to IL-4-CD40-B cells (Figure 5A, right panel).

Upon activation, CD83 and CD86 were expressed by ≥75% of IL-4- and Combo-CD40-B cells by day 3. CD86 expression remained stable overtime in both conditions and was similarly expressed by MoDC (Figure 5B, bottom panel). While CD83 expression was transient and downregulated in Combo-CD40-B cells, MFI ratios suggest that expression was still higher than in IL-4-CD40-B cells. On day 12, ~40% of CD83$^+$Combo-CD40-B cells were detected which was similar to the frequency of CD83$^+$MoDC (Figure 5B, middle panel). CD80 expression was detected in ≥30% of IL-4- and Combo-CD40B cells from days 3 to 12. Compared to Combo-CD40-B cells, the number of CD80$^+$ MoDC was significantly higher (Figure5B, top panel). CD80, CD83 and CD86 expressions

on IL-21-CD40-B cells were detected within 3 days at nearly the same levels as IL-4- or Combo-CD40-B cells but was also transient (Figure 5B).

We also examined ligands engaging T cell co-stimulation TNF receptor (TNFR) family members such as OX40, 4-1BB and CD27. Both CD70 and OX40 ligand (OX40L) were detected upon stimulation of B cells. The frequency and MFI of $CD70^+$ were significantly higher in Combo-CD40-B cells than in IL-4-CD40-B cells from days 6 to 9, but were similar on day 12 (Figure 5C, top panel). OX40L expression was similar for IL-4- and Combo-CD40-B up to day 6, but then decreased in the Combo group, whereas it remained stably expressed in IL-4-CD40-B cells (Figure 5C, middle panel). Although CD70 and OX40L were upregulated by IL-21-CD40-B cells, their expressions were transient and rapidly downregulated (Figure 5C, top/middle panels). 4-1BB ligand (4-1BBL) was barely expressed by any CD40-B cells while CD70, 4-1BBL and OX40L were not detected on MoDC (Figure 5C).

Finally, we assessed the expression of inhibitory ligands programmed death-ligand 1 (PD-L1), PD-L2 and Galectin-9 (Gal-9). PD-L1 expression was detected in nearly 14% of unstimulated B cells which decreased to ~3% by day 6 upon CD40L and IL-4 or Combo stimulation. In comparison, PD-L1 expression was detected in nearly 8% of IL-21-CD40-B cells from days 6 to 12. Similarly, ~11% of MoDC were $PD\text{-}L1^+$ (Figure 5D, left panel). Remarkably, PD-L2 and Gal-9 were not induced in any B cell groups compared to MoDC whose expression was detected in 20% and 80% of the population, respectively (Figure 5D, middle/right panel).

Together these results demonstrate that IL-4 and Combo stimulations induce the expression of molecules associated with efficient Ag presentation and T cell stimulatory capacity.

IL-4- and Combo-activated CD40-B cells are efficient APC that promote T cell activation and proliferation

To assess if IL-21- or Combo-CD40-B cells could be potent APC similar to IL-4-CD40-B cells or MoDC, we assessed the capacity of IL-21- and Combo-CD40-B cells to present Ag by MHC class I and activate Ag-specific T cells (Figure 6A).

Co-culture of g209-2M-specific T cells with APC showed enhanced peptide recognition in co-cultures with Combo-CD40-B cells. Nearly 75% of T cells upregulated 4-1BB when co-cultured with Combo-CD40-B cells pulsed with 0.001 µM of peptide compared to ~60% with IL-4-CD40-B cells and MoDC. Co-culture with IL-4-, Combo-CD40-B cells or MoDC pulsed with higher peptide concentrations led to complete T cell activation as ≥90% of 4-1BB$^+$ T cells were detected. Notably, g209-2M peptide-pulsed IL-21-CD40-B cells were less efficient at promoting T cell activation at all peptide concentrations (Figure 6B). Similarly, the frequency of IFN-γ secreting T cells was higher when co-cultured with Combo-CD40-B cells (~80%) compared to IL-4-CD40-B cells or MoDC (both at ~48%) pulsed with g209-2M peptide at non-saturating peptide concentration (0.001 µM; Figure 6C). At this concentration, IL-21-CD40-B cells were less efficient and induced IFN-γ production in ~30% of T cells. However, at saturating peptide concentrations (0.01-10 µM), no significant differences were measured for all co-culture conditions suggesting that the peptide-MHC-I-T cell receptor complex stimulation was strong enough to activate T cells (Figure 6C). Of note, nearly 70% of T cells were TNF-α$^+$ when co-cultured with IL-4- or Combo-CD40-B pulsed with g209-2M peptide at 0.0001 µM compared to 50% for T cells co-cultured with IL-21-CD40-B cells or MoDC pulsed at the same concentration. At higher peptide concentrations, no significant differences in the frequency of TNF-α$^+$ T cells were found (Supplementary Figure S3).

We quantified IFN-γ secretion in the supernatant for a more sensitive assessment of T cell activation at saturating peptide concentrations. Contrary to our flow cytometry data, no significant differences in IFN-γ concentrations were measured when APC were pulsed with g209-2M peptide at 0.001 µM. However, when pulsed with 0.01 and 0.001 µM, we measured a higher IFN-γ secretion by T cells co-cultured with Combo-CD40-B cells than those co-cultured with IL-4-CD40-B cells or MoDC (Figure 6D). We also detected similar IFN-γ secretion levels when T cells were stimulated with IL-4-CD40-B cells or MoDC pulsed with g209-2M peptide at 0.01-1 µM, suggesting the same efficiency at stimulating T cells. Notably, g209-2M peptide-pulsed IL-21-CD40-B cells weakly stimulated g209-2M-specific CD8$^+$ T cell clone as shown by significantly lower IFN-γ at all peptide concentrations tested (Figure 6D). We hypothesized that these differences in APC functions were due to a differential capacity to form an immune synapse between APC and T cells. Therefore, we evaluated the synapse formation between 1µM g209-2M

peptide pulsed-APC and g209-2M-specific T cells. No significant differences were observed in the frequency of synapse formation between Il-4-, IL-21- or Combo-CD40-B cells. Although MoDC appeared to form a lower number of immune synapses with T cells than CD40-B cells, no significant differences were observed (Supplementary Figure S3B). Our data demonstrate that Combo-CD40-B cells are efficient APC and can trigger a strong Ag-specific T cell activation, which is probably due to better cell-cell interactions and release of soluble factors as opposed to the quality of immunological synapse formation.

We next addressed whether Combo-CD40-B cells could activate memory T cells present at low frequencies in a T cell population. MoDC and CD40-B were pulsed with a pool of MHC-I restricted T cells epitopes from Cytomegalovirus, Epstein Barr virus and Influenza virus (CEF) and co-cultured with enriched autologous $CD3^+$ T cells. The activation of CEF-specific T cells was evaluated by ELISPOT detection of IFN-γ secretion, which showed that the number of IFN-γ spot forming units (SFU) and size were not significantly different when T cells were co-cultured with CEF-pulsed Combo- or IL-4-CD40-B cells. However, the number and size of SFU were higher when T cells were co-cultured with IL-4 or Combo-CD40-B cells than with IL-21-CD40-B cells or MoDC indicating a higher IFN-γ secretion resulting from stronger stimuli (Figure 6E) as shown in Figure 6D. These results show that Combo-CD40-B cells are as efficient as IL-4-CD40-B cells in activating CEF-specific memory $CD8^+$ T cells present at low frequencies in a heterogenous T cell population.

Finally, to evaluate the efficiency of Combo-CD40-B cells to promote T cell proliferation, we performed an allogeneic T-cell stimulation in a mixed lymphocyte reaction (MLR). Compared to IL-21-CD40-B cells, IL-4- or Combo-CD40-B cells were efficient in allogeneic T-cell stimulation at both ratios and gave similar division indexes. MoDC were as efficient as IL-4- or Combo-CD40-B cells in activating T cells at 1:4 ratio but not at a 1:1 ratio (Figure 6F). These results suggest that Combo-CD40-B cells are efficient APC capable of inducing T cell proliferation.

Altogether, our results demonstrate that the stimulation of human B cells with CD40L, and the combination of IL-4 and IL-21 generate potent APC capable of promoting T cell activation and proliferation *in vitro*.

Discussion

CD40-B cells have been used to study B cell activation, differentiation and function, particularly to induce Ag-specific immune responses[45-53]. Among the several studies featuring culture protocols for B cells[5, 72, 73], to our knowledge, none has evaluated the capacity of IL-21 or the combination of IL-4 and IL-21 to induce potent APC functions of B cells. In the present study, we demonstrated that *ex vivo* IL-21-stimulated CD40-B cells differentiate toward ASC with reduced Ag presentation capabilities, whereas CD40-activated human B lymphocytes cultured with both IL-4 and IL-21 are highly proliferative professional APC that are as efficient as IL-4-CD40-B cells in stimulating $CD8^+$ T cells cultured *in vitro*.

Previous studies reported that IL-21 is a potent inducer of B cell proliferation[30, 32, 35, 41, 74]. Similarly, we showed that IL-21- and Combo-CD40-B cells had significantly stronger proliferation than IL-4-CD40-B cells. Su et al., also showed that human IL-21- and Combo-CD40-B cells had a robust expansion compared to IL-4-CD40-B cells[50]. The combination of both IL-21 and IL-4 also increase cell division of murine CD40-B cells[75]. Thus, stimulating CD40-B cells with both IL-4 and IL-21 is an efficient method to rapidly expand human B lymphocytes to high numbers.

Moreover, the stimulation of B cells with CD40L and IL-4 and/or IL-21 generate distinct B cell phenotypes. We showed that IL-4 did not drastically affect B cell phenotypes compared to unstimulated B cells whereas IL-21 gradually polarized CD40-B cells toward terminally differentiated $CD138^+$ Ab-secreting PC. Combo-CD40-B cells were less prone to differentiate into ASC than IL-21-CD40-B cells, suggesting that IL-4 signaling antagonize the IL-21-mediated induction of PB/PC. In contrast to our results, Franke et al., concluded that the stimulation of PBMC with an anti-CD40 Ab and both IL-4 and IL-21 generates ASC[76]. This discrepancy may be explained by technical differences to generate CD40-B cells such as their stimulation of PBMC vs. enriched B cells, and the source of CD40L. Su et al., reported that although CD40-B cells cultured with IL-2, IL-4, IL-21 and BAFF did not differentiate to PC up to day 12, they abruptly differentiated in $CD27^{high}CD38^{high}CD138^+$ PC on days 14 to 16 that translated into reduced Ag-presentation functions compared to day 8 CD40-B cells[50]. Characterizing Combo-CD40-B cells beyond day 12 would allow us to evaluate if a similar late differentiation to ASC occurs with our

culture method. IL-21 is known to regulate the GC response by maintaining expressions of transcription factors BCL-6[25-28] but also induces BLIMP-1, which inhibits BCL-6 and drives B cell differentiation into ASC *in vitro* and *in vivo*[30, 32, 33, 39-42]. The added presence of IL-4 may keep Combo-CD40-B cells in a "GC-like" proliferative state and dampen or delay the induction of the PC transcriptional program. Our hypothesis is supported by two studies who showed that when used in combination, IL-4 and IL-21 cooperate to induce BCL-6 in murine CD40-B cells[75, 77]. Deciphering kinetics of induction of key B cell transcription factors such as BCL-6 and BLIMP-1 would provide a description of events leading to the observed B cell phenotypes in our study. Also, it has been suggested that T_{FH} cells may have a different temporal expression of IL-4 vs. IL-21 over the course of the immune response, with IL-21 secreted first[23, 78]. It remains to be studied if stimulating Combo-CD40-B cells sequentially instead of simultaneously with both cytokines could influence their rate of proliferation, their phenotypes and functions.

For vaccination purposes, B cells need to reach SLO to present Ag to cognate T cells and elicit their activation and expansion. Similar to studies from von Bergwelt-Baildon and colleagues[54, 79, 80], we showed that IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells differently expressed SLO homing molecules CD62L, CCR7, CXCR4 and CXCR5 whereas MoDC expressed only CCR7. Expression kinetics of these receptors suggest that Combo-CD40-B cells may have higher SLO homing properties than IL-4-CD40-B cells which would make them a better vaccine platform compared to IL-4-CD40-B cells and MoDC. Although we did not evaluate the migratory capacity of CD40-B cells, previous studies showed that these molecules mediate the migration of human and murine IL-4-CD40-B cells toward their respective ligands *in vitro* and promote their homing to SLO in mice[54, 79, 80]. Gonzalez et al., further demonstrated that vaccination of mice with peptide-pulsed IL-4-CD40-B cells induced an efficient antitumoral response of cytotoxic T cells (CTL)[80]. We hypothesize that Ag-pulsed Combo-CD40-B cells could home to SLO, present Ag to CTL and trigger a cellular response against an immunizing Ag. We speculate that Combo-CD40-B cells may be an alternative source of APC and be used as an efficient vaccine platform through cell therapy, instead of DC, in immunotherapies such as cancer vaccines.

As potent APC, IL-4-CD40-B cells have been used for the induction of Ag-specific T cell immune responses[45-53]. In this study, we demonstrated that Combo-CD40-B, but not

IL-21-CD40-B cells, secreted chemokines, cytokines and displayed a phenotype associated with strong Ag-presentation functions similar to IL-4-CD40-B cells. Due to technical limitations, chemokine and cytokine secretion by MoDC was not quantified. Cytokines and chemokines produced by B cells can shape effector T cell responses[10, 71] and induce the migration of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells *in vitro*[54], respectively. Although it remains to be studied, we hypothesize that Combo-CD40-B cells may attract T cells, present Ag and provide co-stimulation signals via the secretion of pro-inflammatory cytokines that could modulate or polarize T cell responses.

Moreover, in contrast to MoDC, IL-4- and Combo-CD40-B cells harbored co-stimulation molecules CD70 and OX40L implicated in the latter stage of T cells co-stimulation by APC[81, 82]. Several studies showed that vaccination with murine Ag-loaded CD40-B cells induces a specific T cell response *in vivo* comparable to that of DC[49, 79, 80, 83]. Specifically, a study reported that genetically modified murine B cells co-expressing CD40L and CD70 or OX40L had enhanced Ag-presentation functions[83] and vaccination by cell transfer with these cells was more efficient in inducing CTL antitumor response than DC[83]. Similarly, murine CD40-B cells transfected with OX40L, 4-1BBL and IL-12p70 mRNA induced a stronger proliferation and activation of CTL and were as efficient as DC to induce cytotoxic response of $CD8^+$ T cells *in vitro* but not *in vivo*[84]. Furthermore, it has been previously shown that IL-4-CD40-B cells from cancer patients can be expanded and be as potent APC as IL-4-CD40-B cells derived from healthy donors[55]. Therefore, we hypothesize Combo-CD40-B cell-based vaccines may be used instead of IL-4-CD40-B cells and be as efficient as DC-based vaccines to prime a CTL response, but be more efficient in sustaining T cell activation by providing co-stimulation signals via CD27 and OX40 engagement. Our data support this hypothesis as we showed that Combo-CD40-B cells were as efficient as IL-4-CD40-B cells and MoDC in presenting Ag and activating Ag-specific $CD8^+$ T cells *in vitro*. One limitation of our study is that we focused on $CD8^+$ T cell activation. We have previously shown that human IL-4-CD40-B cells can be pulsed with tumor lysates for process and presentation of Ag on MHC-II, which resulted in the activation and expansion of tumor Ag-specific memory $CD4^+$ T cells from the blood of cancer patients[46]. Although our data suggests that Combo-CD40-B cells have potential to stimulate $CD4^+$ T cells as efficiently as $CD8^+$ T cells, it requires further work on MHC-II mediated Ag presentation.

To our knowledge, our study is the first to describe that human B cells cultured with CD40L and both IL-4 and IL-21 generates highly proliferative cells that are potent APC. On the contrary, stimulation of CD40-B cells with IL-21 polarizes B cells toward Ab secretion. Both these cells could be used for biotechnology applications. The production of large amounts Ag-specific Abs could be achieved by stimulating Ag-specific CD40-B cells with IL-21. As potent APC, CD40-B cells are an attractive alternative to MoDC as APC in the design of immunotherapies such as cancer vaccines[5]. Although further work is required to fully characterize Combo-CD40-B cell functions, we propose that the stimulation of B cells with CD40L, IL-4 and IL-21 offers a mean to overcome difficulties of IL-4-CD40-B cell and MoDC cultures. Combo-CD40-B cells are an alternative source of APC that could be used to develop B cell-based biotechnologies.

Figures

Possamaï et al., manuscript II (mII)

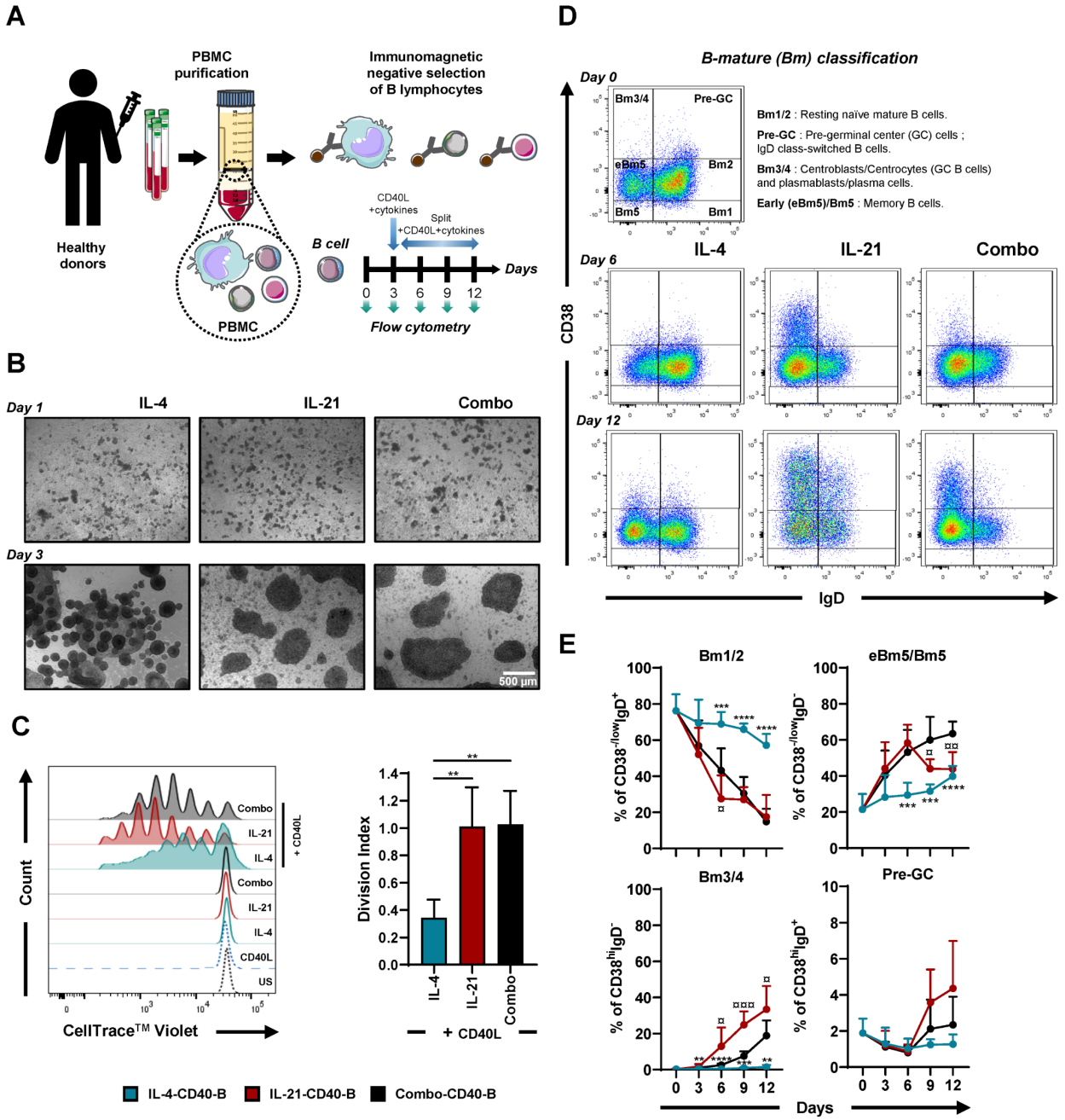


Figure 16. – (Figure 1[mII]): Primary human B cells stimulated with CD40L and IL-4 and/or IL-21 induce strong proliferation but generate distinct B cell subsets

A. Schematic illustration of B lymphocyte enrichment from PBMC and *in vitro* generation of CD40-B cells for phenotypic characterization. **B.** All three groups of CD40-B cells form free floating clumps in the cell culture medium. Transmitted light images captured on days 1 and 3 of culture using the EVOS FL imaging system with a 4X phase objective. **C.** B cell proliferation was assessed

by evaluating CTV dilution by flow cytometry after 6 days of culture with indicated stimulations or unstimulated (US), as shown in the representative histogram. Division indexes were calculated as mentioned in Material and Methods. Results are represented as mean and standard deviation (SD) from three independent experiments for a total of six independent healthy donors. Statistical significance was calculated using a one-way ANOVA with post hoc Tukey HSD, **p <0.01. **D.** Representative dot plots of B cell subsets found in unstimulated B lymphocytes (day 0) and in IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells at day 6 and 12 of culture based on the Bm classification (CD38 vs. IgD) **E.** Kinetics of CD40-B cells differentiation status for each Bm population. Results are represented as mean (SD) from three independent experiments for a total of 10 independent healthy donors. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4 or ¤Combo vs. IL-21. */¤p <0.05, **/¤¤p <0.01, ***/¤¤¤p <0.001 and ****p <0.0001.

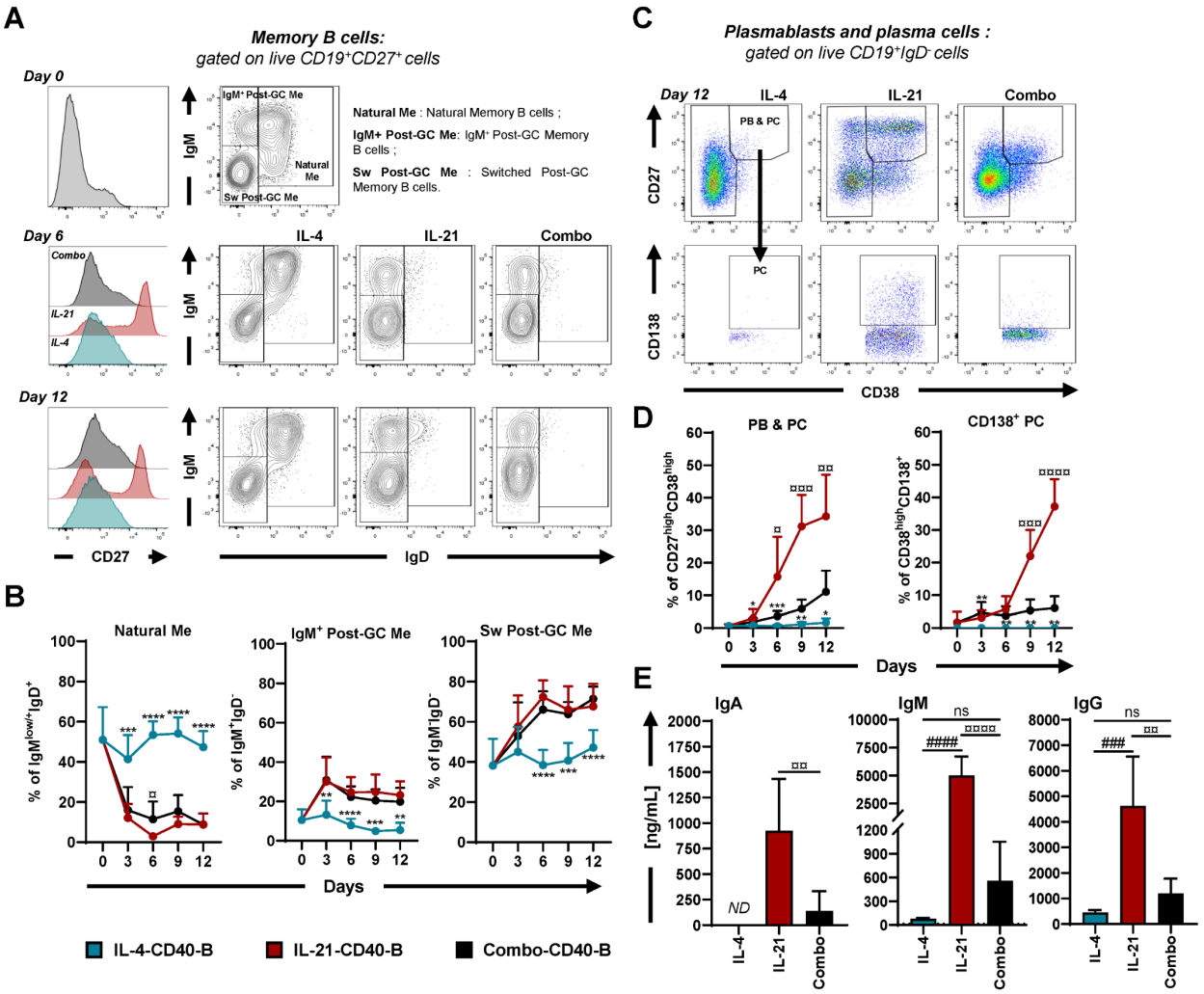


Figure 17. – (Figure 2[mll]): Distinct memory B cell subsets and antibody-secreting cells are induced by stimulation with CD40L and IL-4 and/or IL-21

A. Representative dot plots of $CD19^+CD27^+$ memory B cell subsets based of the expression of IgM vs. IgD among unstimulated B lymphocytes (day 0) and in IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells at days 6 and 12 of culture. **B.** Kinetics of $CD19^+CD27^+$ memory CD40-B cell differentiation status for each subset. **C.** Representative dot plots of the induction of PB ($CD27^{high}CD38^{high}$) and mature PC ($CD27^{high}CD38^{high}CD138^+$) gated on $CD19^+IgD^-$ B cells at day 12. **D.** Kinetics of PB/PC induction. **E.** CD40-B cells were washed and cultured for 24 hours (from day 11 to day 12) in cytokine supplemented serum-free media. Supernatants were harvested and secreted IgM, total IgG and IgA were quantified by ELISA. Human AB serum was used as a control. **A-E.** Results are represented as mean (SD) from three independent experiments for a total of 10 (**A-D**) or five (**E**) independent healthy donors. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA (**B, D**) or a one-way ANOVA (**E**) with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4, ¤Combo vs. IL-21 or #IL-21 vs. IL-4. */¤p <0.05, **/¤¤p <0.01, ***/¤¤¤/###p <0.001 and ****/¤¤¤¤/####p <0.0001.

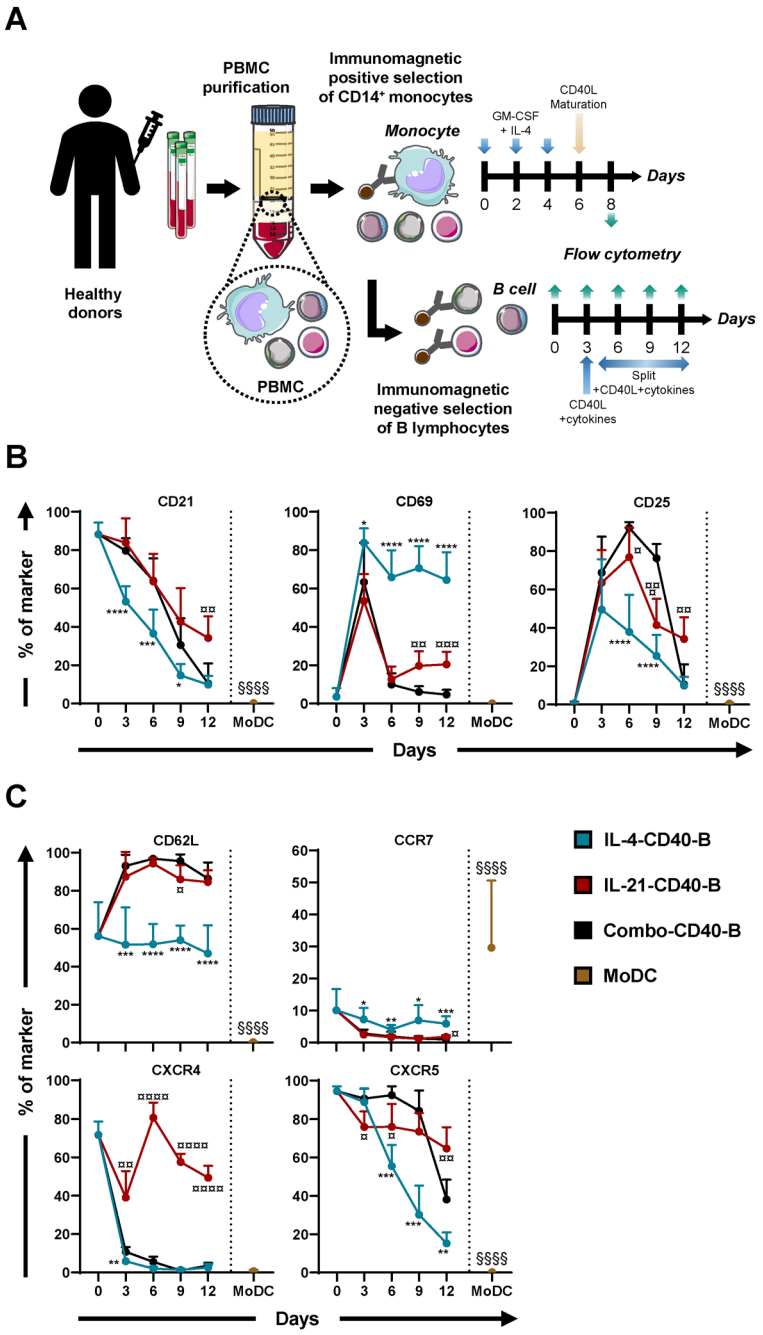


Figure 18. – (Figure 3[mII]): Activation molecules and SLO homing molecules are differently regulated by IL-4-, IL-21- and Combo-stimulated CD40-B cells

A. Schematic illustration of the isolation of CD14⁺ monocytes from healthy donor PBMC followed by enrichment of B lymphocytes from CD14-depleted PBMC. The general protocol for the culture of CD40-B cells and the generation of CD40L-matured MoDC for phenotypic characterization or subsequent co-culture experiments is also represented. **B-C.** Kinetics of expression of (**B**) molecules known to be modulated by activation (CD21, CD25 and CD69) and (**C**) SLO homing

molecules (CD62L, CCR7, CXCR4 and CXCR5). CD40L-matured MoDC were analyzed on day 8. Results are represented as mean (SD) from three independent experiments for a total of 10 independent healthy donors (except for CXCR4 and CXCR5 where CD40-B cells from six independent healthy donors were analyzed). Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4, ¤Combo vs. IL-21 or §Combo vs. MoDC. */¤p <0.05, **/¤¤p <0.01, ***/¤¤¤p <0.001 and ****/¤¤¤¤/§§§§p <0.0001.

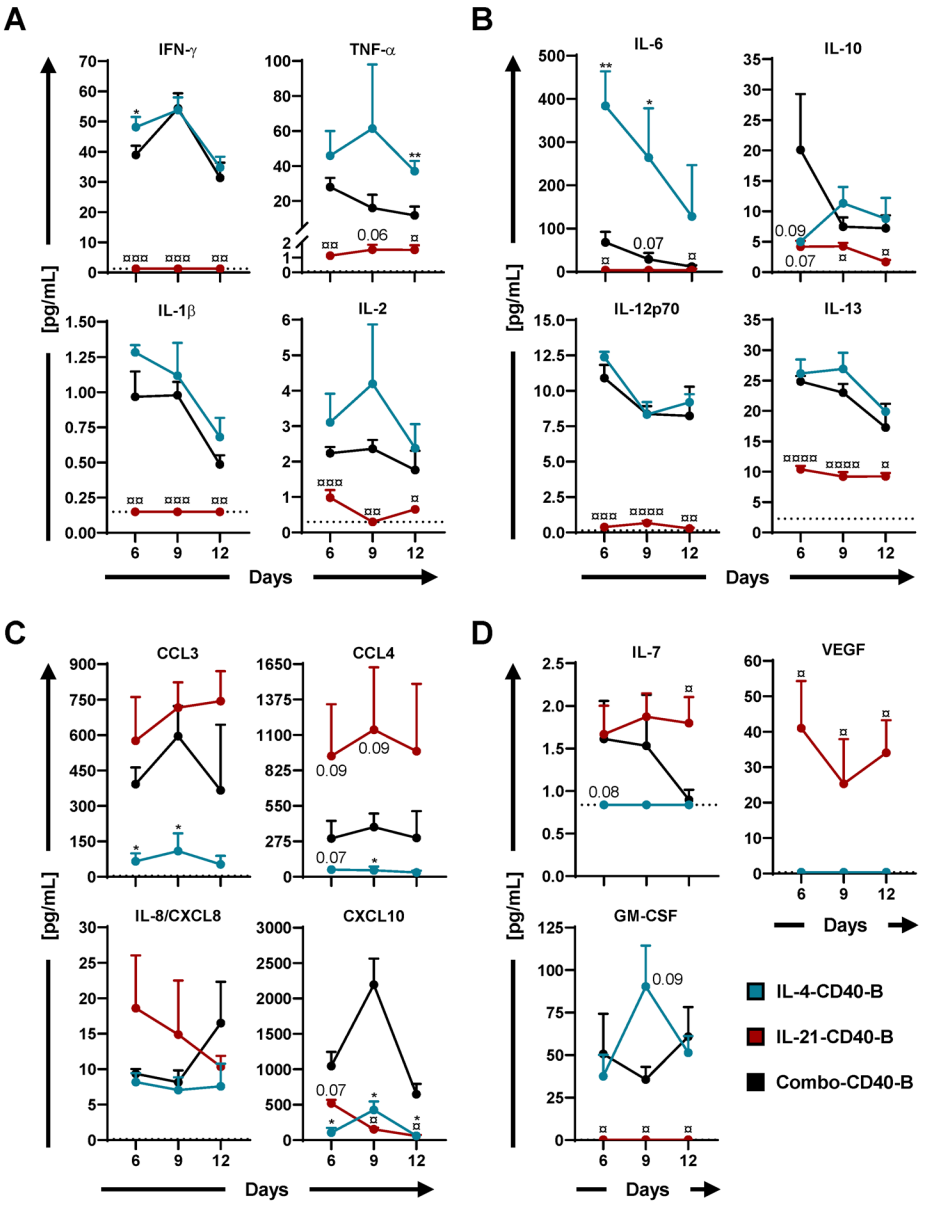


Figure 19. – (Figure 4[mII]): IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells differentially secrete multiple cytokines and chemokines

A-D. B cells were initially seeded, cultured with CD40L and IL-4, IL-21 or Combo to days 6, 9 and 12. On these days, IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells were collected, washed and resuspended at 1 × 10^6 cells/mL in their respective media before seeding 1 × 10^6 cells/well to new plates. CD40-B cells were cultured for 18 to 20 hours. Culture supernatants were collected and frozen. Cytokines and chemokines were quantified by a multiplex assay using the V-plex Ultra-Sensitive kit (Meso Scale Diagnostics). Human AB serum and plasma of known cytokine and chemokine concentrations were used as a control. For each soluble molecule, concentrations are represented as mean (SD) from four independent healthy donors. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way

ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4 or ¤Combo vs. IL-21. */¤p <0.05, **/¤¤p <0.01, ¤¤¤p <0.001 and ¤¤¤¤p <0.0001.

Possamaï et al.

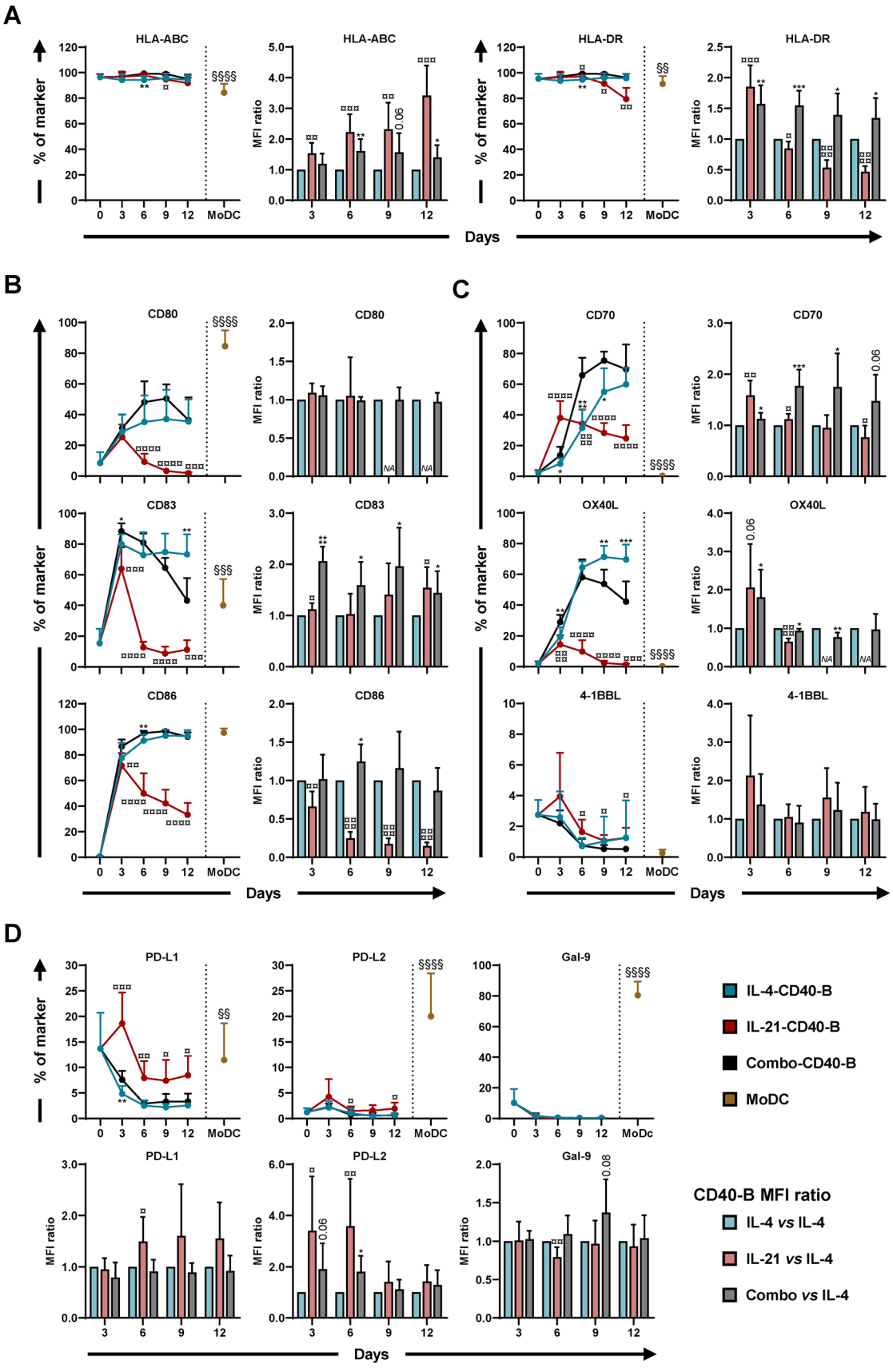


Figure 20. – (Figure 5^{mII}): IL-4 and Combo stimulation induce the expression of markers associated with antigen-presentation and T cell stimulation

A-D. Kinetics of expression of (**A**) MHC class I and II molecules, (**B**) CD83 and CD28 co-stimulatory ligands CD80/CD86, (**C**) TNFR ligands CD70, OX40L and 4-1BBL, and (**D**) inhibitory ligands PD-L1, PD-L2 and Gal-9. CD40L-matured MoDC were analyzed on day 8. From days 3 to 12, the geometric mean fluorescence intensity (MFI) of each marker was determined for all CD40-B cell groups. To pool data from independent experiments, MFI data for each marker are represented as a ratio with the MFI of each marker expressed by IL-4-CD40-B cells set as reference. Results are represented as mean (SD) from three independent experiments for a total of 10 independent healthy donors. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4, ¤Combo vs. IL-21 or §Combo vs. MoDC. */¤p <0.05, **/¤¤/§§p <0.01, ***/¤¤¤/§§§p <0.001 and ****/¤¤¤¤/§§§§p <0.0001.

Possamaï et al.

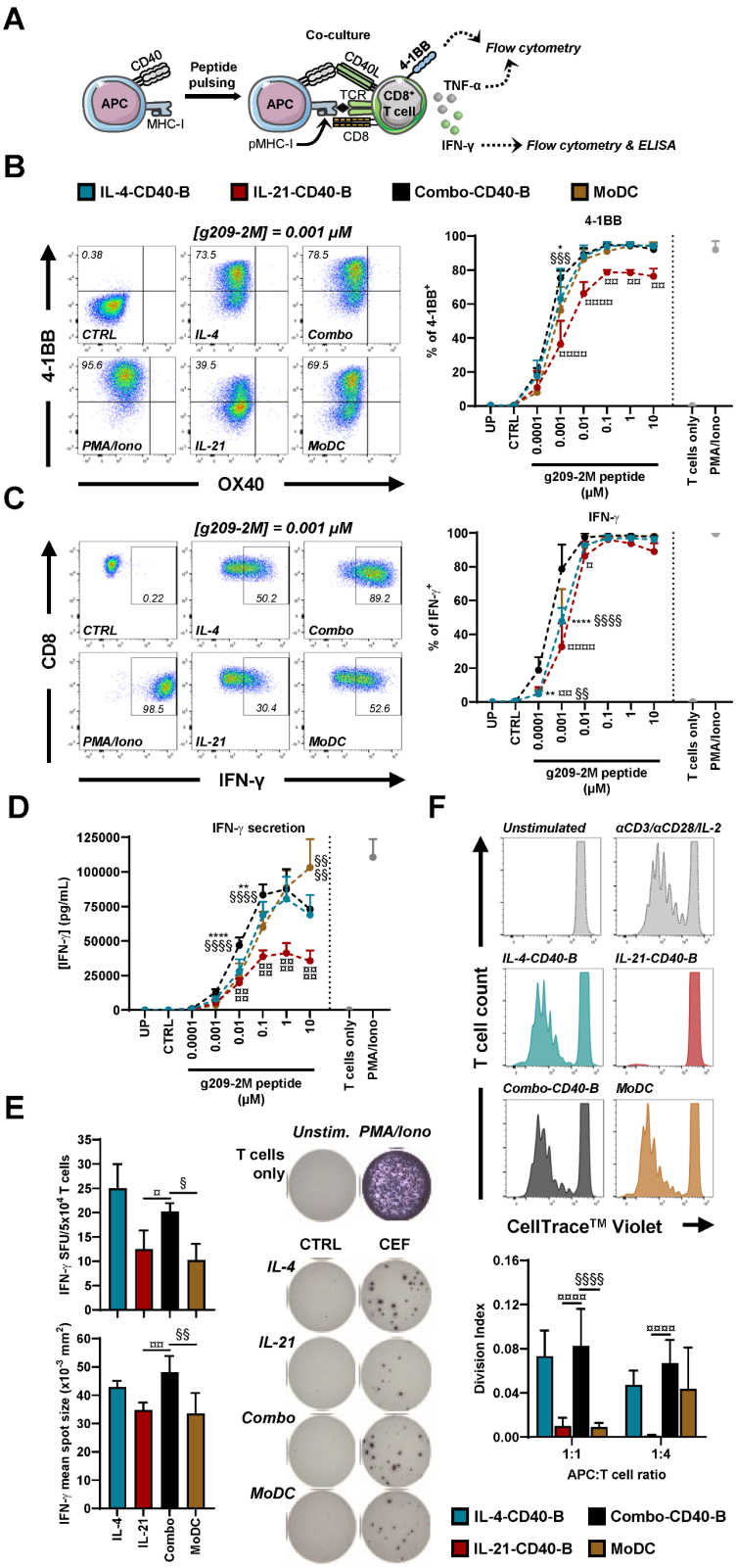


Figure 21. – (Figure 6^{mII}): IL-4- and Combo-activated CD40-B cells are efficient APC that promote T cell activation and proliferation

A. Schematic illustration of the general protocol for recognition assays between CD40-B cells or CD40L-matured MoDC and antigen-specific $CD8^+$ T cells as detailed in Material and Methods. **B-C.** Representative dot plots of the expression of (**B**) 4-1BB or (**C**) IFN-γ by $CD8^+$ T cells co-cultured with IL-4-, IL-21-, Combo-CD40-B cells or MoDC pulsed with 0.001 µM of g209-2M peptide are shown in the left panel. A dose-response curve to all peptide concentrations evaluated is shown in the right panel. T cells only or T cells stimulated with PMA/Ionomycin were used as controls. **D.** IFN-γ secretion was quantified in co-culture supernatants by ELISA to evaluate MHC class I antigen presentation by IL-4-, IL-21-, Combo-CD40-B cells or MoDC pulsed with indicated peptide concentrations. **E.** Representative ELISPOT well images containing 5×10^4 T cells co-cultured with autologous CEF-loaded IL-4-, IL-21-, Combo-CD40-B cells or MoDC. The number of IFN-γ^+ T cells (spot forming units, SFU) and the mean spot size is presented on the left panel. **F.** Representative histograms of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction (MLR) for the APC:T cell ratio 1:4. T cell proliferation was assessed by evaluating CTV dilution by flow cytometry after 6 days of culture with indicated stimulator cells or controls. Division indexes were calculated as mentioned in Material and Methods. **B-F**. All results are represented as mean (SD) from at least three independent experiments. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a (**E**) one-way or (**B-D, F**) two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4, ¤Combo vs. IL-21 or §Combo vs. MoDC. */¤/§p <0.05, **/¤¤/§§p <0.01, ***/¤¤¤/§§§p <0.001 and ****/¤¤¤¤/§§§§p <0.0001.

Supplementary Material and Methods

Synapse Assays

Resting g209-2M (gp100)-specific T cells (L2D8 g209 T cells) were collected and stained with CTV as described above. APC (CD40-B cells or MoDC) were cultured as previously described and collected on day 9 for CD40-B cells and day 8 for MoDC. APC were stained with CellTrace™ Far Red (CTFR; Invitrogen) following the same protocol as for CTV staining. After the final wash, APC were resuspended at a density of 1×10^6 cells/mL in their respective cytokine supplemented media and pulsed with 1 µM of g209-2M peptide or an irrelevant peptide (both HLA-A*0201 specific and from JPT Peptide Technologies GmbH). T cells were resuspended at a density of 1×10^6 cells/mL in R10% HS supplemented with 300 IU/mL of recombinant IL-2. APC and T cells were incubated for 6 hours at 37°C in a CO_2 incubator. APC and T cells were washed extensively, counted and resuspended at 1×10^6 cells/mL in Ringer solution (155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM D-glucose, 1 mM MgCl, 2 mM $CaCl_2$ and 5 mM HEPES at pH 7.4). To evaluate immune synapse formation, 1×10^5 APC and 1×10^5 T cells (ratio 1:1) were transferred into a 5 mL round-bottom polystyrene tube and cells were analyzed immediately or incubated at 37°C in a water bath. Cells were analyzed every 5 minutes up to 30 minutes and flow cytometry data were acquired using a BD LSRFortessa™ instrument (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo™ Software version 10.6.2. The formation of an immune synapse was determined as a $CTFR^+CTV^+$ event.

Supplementary Figures and Tables

Possamaï et al.

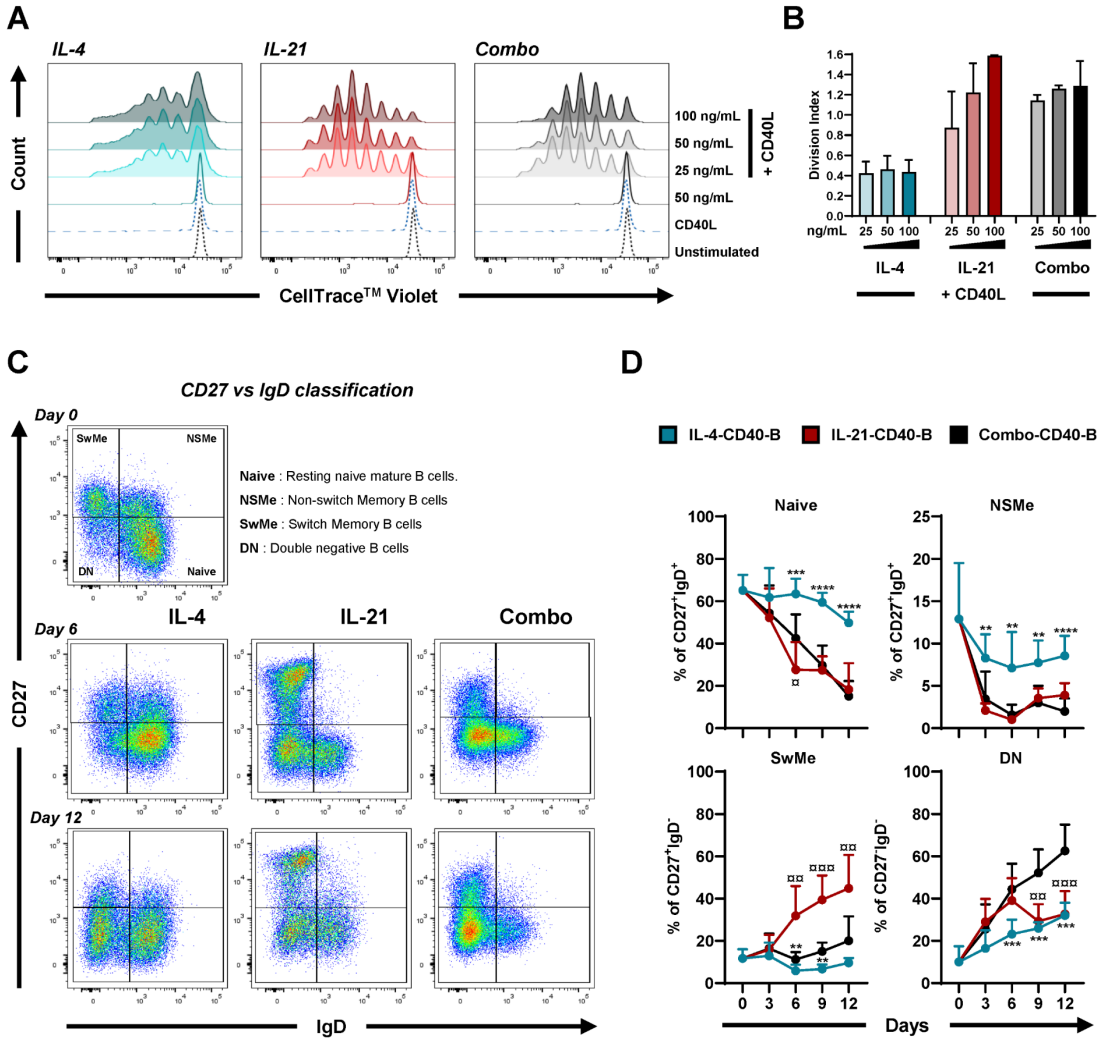


Figure 22. – (Supplementary Figure S1[mII]): Proliferation of CD40-B cells in response to different concentrations of IL-4, IL-21 or Combo, and CD27 vs. IgD classification of B cell phenotypes

A. B cell proliferation was assessed by evaluating CTV dilution by flow cytometry after 6 days of culture with indicated stimulations as shown in the representative histogram. **B.** Division indexes were calculated as mentioned in Material and Methods. Results are represented as mean (SD) from two independent healthy donors. **C.** Representative dot plots of B cell subsets found in unstimulated B lymphocytes (day 0) or in IL-4-, IL-21- and Combo-CD40-B cells at days 6 and 12 of culture based on the CD27 vs. IgD classification. **D.** Kinetics of CD40-B cell differentiation status for each population. Results are represented as mean (SD) from three independent experiments for a total of 10 independent healthy donors. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a repeated measure two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. *Combo vs. IL-4 or ¤Combo vs. IL-21. ¤p <0.01, **/¤¤p <0.01 and ***/¤¤¤p <0.001 and ****p <0.0001.

Possamaï et al.

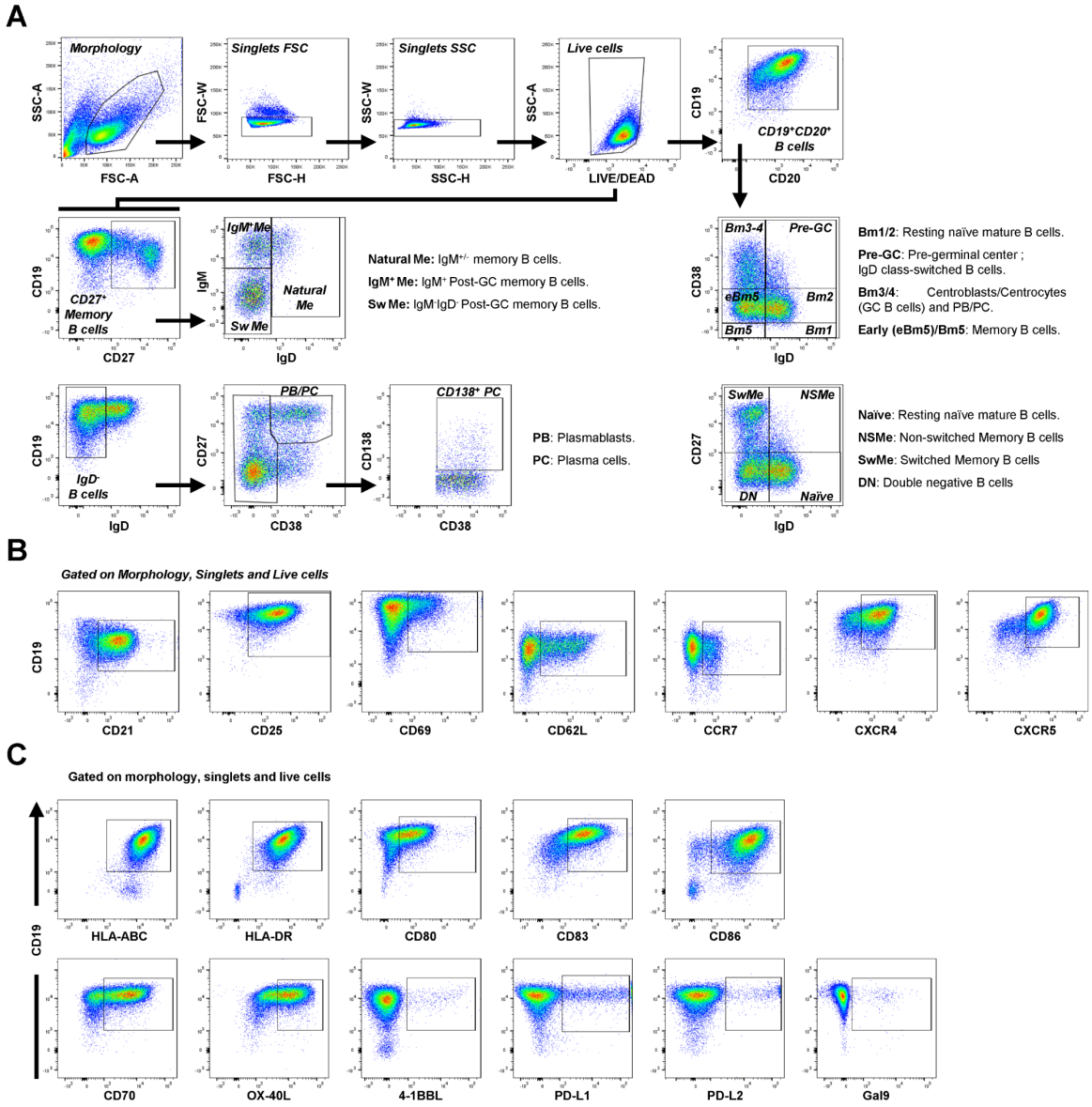


Figure 23. – (Supplementary Figure S2[mll]): Gating strategies used for flow cytometry data analysis

A. Gating strategy used to characterize B cell phenotypes. The Bm (CD38 vs. IgD) and the CD27 vs. IgD classifications were used to identify most human B cell subsets. Me B cells were defined as $CD19^{+}CD27^{+}$ and surface expression IgM vs. IgD characterized their different subpopulations. PB and PC were identified based on the markers $CD19^{+}IgD^{-}$ and the high expression of both CD27 and CD38. The expression of CD138 was used to identify mature plasma cells. **B-C.** Gating strategy used to characterize the expression kinetics of (**B**) surface makers modulated by B cell activation and secondary lymphoid organ homing receptors and (**C**) MHC class I and II molecules, co-stimulatory and inhibitory ligands.

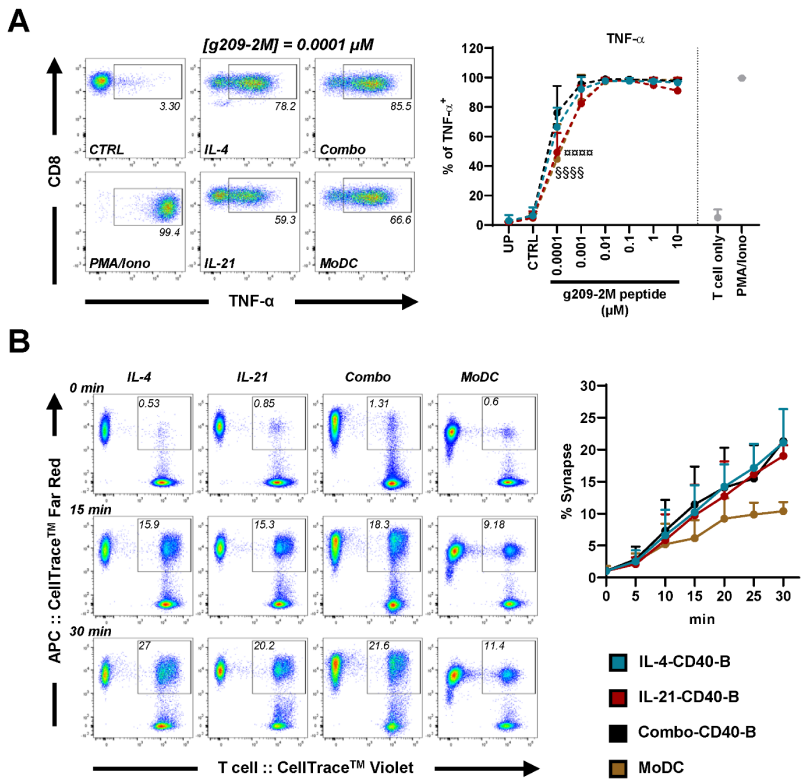


Figure 24. – (Supplementary Figure S3[mII]): IL-4- and Combo-CD40-B cells are efficient APC that promote T cell activation but not due to a higher frequency of synapse formation with T cells

A. Representative dot plots of the expression of TNF-α by $CD8^+$ T cells co-cultured with IL-4-, IL-21-, Combo-CD40-B cells or MoDC pulsed with 0.0001 µM of g209-2M peptide are shown on the left panel. A dose-response curve to all peptide concentrations evaluated is shown on the right panel. Results are represented as mean (SD) from at least three independent experiments. Statistical significance of normally distributed data (Shapiro-Wilk test) was calculated using a two-way ANOVA with post hoc Tukey HSD. ¤Combo vs. IL-21 or §Combo vs. MoDC. ¤¤¤¤/§§§§p <0.0001. **B.** Synapse formation between g209-2M-specific T cells and g209-2M peptide-loaded CD40-B cells or MoDC at 0, 15 and 30 minutes of co-culture shown by representative dot plots (left panel). Cells were stained and processed as described in Supplementary Material and Methods. A synapse between an APC and a T cell was defined as a $CTFR^+CTV^+$ event. On the right, the graph depicts cumulative data as mean (SD) from three independent experiments.

Antibodies	Fluorochromes	Antibodies	Fluorochromes
CD3	APC-R700	CD83	BV650
CD8	Brilliant Blue™(BB) 515	CD86	APC-R700
CD5	Brilliant Ultraviolet™ (BUV) 737	CD138	PE
CD10	PerCP-Cy5.5	CCR7	PE-Cy7
CD11b	Brilliant Violet™ (BV) 605	CXCR4	BUV395
CD11c	BB700	CXCR5	BB515
CD14	BB700	Galectin-9	eFluor660
CD19	BV421	HLA-A, B, C	FITC
CD19	PerCP-Cy5.5	HLA-DR	BUV395
CD20	BUV395	IFN-γ	PE-CF594
CD21	BUV737	OX40	PE
CD24	PE-Cy7	OX40L	BV421
CD25	PerCP-Cy5.5	PD-L1	PE-Cy7
CD27	BB515	PD-L2	BV786
CD38	BV711	sIgD	PE-CF594
CD43	APC	sIgM	BV786
CD62L	APC	TNF-α	APC
CD69	BV786	4-1BB	BV421
CD70	PE-CF594	4-1BBL	PE
CD80	APC-H7		

Tableau 1. – (Supplementary Table 1[mII]): Antibodies used for flow cytometry analysis

Cytokines	Chemokines
IL-1β; IL-2	CXCL8
IL-4; IL-5; IL-13	CXCL10
IL-6; IL-7	CCL3
IL-10; IL-12p70; IL-17	CCL4
IFN-γ; GM-CSF; TNF-α	VEGF

Tableau 2. – (Supplementary Table 2[mll]): Soluble cytokines/chemokines quantified by multiplex assay

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPIN-2016-05376), and by the Quebec Cell, Tissue and Gene Therapy Network – ThéCell (a thematic network supported by Le Fonds de recherche du Québec – Santé [FRQS]). D.P. and G.P. received Canderel scholarships from the Institut du cancer de Montréal. G.P. is a recipient of scholarships from Le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and from the Roses of Hope Foundation. We thank Jacqueline Chung for manuscript editing.

Author Contributions

D.P. performed all experiments and analyzed data. G.P. made substantial technical contributions to acquisition of *in vitro* T cell assay data (Figure 6). R.P. and E.G. made substantial technical contributions to acquisition of immune synapse data (Supplementary Figure S3). D.P and R.L. designed experiments and wrote the manuscript. R.L. supervised the entire study. All authors have read and revised the manuscript and agreed to the published version of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no competing interests.

References

1. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 160-171 (2015).

2. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **177**, 524-540 (2019).

3. Getahun A, Cambier JC. Non-Antibody-Secreting Functions of B Cells and Their Contribution to Autoimmune Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 337-356 (2019).

4. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **56**, 77-83 (2008).

5. Wennhold K, Shimabukuro-Vornhagen A, von Bergwelt-Baildon M. B Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Transfus. Med. Hemother.* **46**, 36-46 (2019).

6. Arroyo EN, Pepper M. B cells are sufficient to prime the dominant CD4+ Tfh response to Plasmodium infection. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).

7. Hong S, Zhang Z, Liu H, Tian M, Zhu X, Zhang Z, et al. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4(+) T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity* **49**, 695-708 e694 (2018).

8. Fillatreau S. B cells and their cytokine activities implications in human diseases. *Clin. Immunol.* **186**, 26-31 (2018).

9. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 441-451 (2015).

10. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 475-482 (2000).

11. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* **127**, 772-779 (2017).

12. Pioli PD. Plasma Cells, the Next Generation: Beyond Antibody Secretion. *Front. Immunol.* **10**, 2768 (2019).

13. Hausser-Kinzel S, Weber MS. The Role of B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. *Front. Immunol.* **10**, 201 (2019).

14. Fillatreau S. Regulatory functions of B cells and regulatory plasma cells. *Biomed J* **42**, 233-242 (2019).

15. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, et al. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* **51**, 337-350 e337 (2019).

16. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137-148 (2015).

17. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132-1148 (2019).

18. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gammac Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. *Immunity* **50**, 832-850 (2019).

19. Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **277**, 27169-27175 (2002).

20. Dufort FJ, Bleiman BF, Gumina MR, Blair D, Wagner DJ, Roberts MF, et al. Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. *J. Immunol.* **179**, 4953-4957 (2007).

21. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385-393 (2009).

22. Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front. Immunol.* **5**, 65 (2014).

23. Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, Licona-Limon P, Esplugues E, Flavell R, et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat. Immunol.* **17**, 1197-1205 (2016).

24. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J. Immunol.* **147**, 8-13 (1991).

25. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* **207**, 365-378 (2010).

26. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* **207**, 353-363 (2010).

27. Chou C, Verbaro DJ, Tonc E, Holmgren M, Cella M, Colonna M, et al. The Transcription Factor AP4 Mediates Resolution of Chronic Viral Infection through Amplification of Germinal Center B Cell Responses. *Immunity* **45**, 570-582 (2016).

28. Tangye SG, Ma CS. Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).

29. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57-63 (2000).

30. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J. Immunol.* **177**, 5236-5247 (2006).

31. Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J. Exp. Med.* **207**, 155-171 (2010).

32. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* **175**, 7867-7879 (2005).

33. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **298**, 1630-1634 (2002).

34. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J. Immunol.* **172**, 5154-5157 (2004).

35. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J. Immunol.* **179**, 8180-8190 (2007).

36. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol.* **181**, 1767-1779 (2008).

37. Avery DT, Ma CS, Bryant VL, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, et al. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood* **112**, 1784-1793 (2008).

38. Yang Z, Wu CM, Targ S, Allen CDC. IL-21 is a broad negative regulator of IgE class switch recombination in mouse and human B cells. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).

39. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, et al. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J. Immunol.* **180**, 4805-4815 (2008).

40. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* **173**, 5361-5371 (2004).

41. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol. Rev.* **223**, 60-86 (2008).

42. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J. Immunol.* **190**, 1827-1836 (2013).

43. Banchereau J, de Paoli P, Valle A, Garcia E, Rousset F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* **251**, 70-72 (1991).

44. Banchereau J, Rousset F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* **353**, 678-679 (1991).

45. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, et al. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **100**, 2757-2765 (1997).

46. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B Lymphocytes Pulsed with Tumor Antigens Are Effective Antigen-presenting Cells That Can Generate Specific T Cells. *Cancer Res.* **63**, 2836-2843 (2003).

47. von Bergwelt-Baildon M, Schultze JL, Maecker B, Menezes I, Nadler LM. Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. Cancer Res 2003;63:2836-43. *Cancer Res.* **64**, 4055-4056; author reply 4056-4057 (2004).

48. von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, Butler MO, et al. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* **99**, 3319-3325 (2002).

49. Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin JF, Boulet S, Lapointe R, Labrecque N. CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naive CD8+ T cells to generate effector but not memory T cells. *PLoS One* **7**, e30139 (2012).

50. Su KY, Watanabe A, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. *J. Immunol.* **197**, 4163-4176 (2016).

51. Doucet JD, Forget MA, Grange C, Rouxel RN, Arbour N, von Messling V, et al. Endogenously expressed matrix protein M1 and nucleoprotein of influenza A are efficiently presented by class I and class II major histocompatibility complexes. *J. Gen. Virol.* **92**, 1162-1171 (2011).

52. Shen SN, Xu Z, Qian XP, Ding YT, Yu LX, Liu BR. RNA-electroporated CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against HepG2 cells. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* **17**, 404-411 (2008).

53. Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA, Vonderheide RH. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* **103**, 2046-2054 (2004).

54. von Bergwelt-Baildon M, Shimabukuro-Vornhagen A, Popov A, Klein-Gonzalez N, Fiore F, Debey S, et al. CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood* **107**, 2786-2789 (2006).

55. Kondo E, Gryschok L, Klein-Gonzalez N, Rademacher S, Weihrauch MR, Liebig T, et al. CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. *Clin. Exp. Immunol.* **155**, 249-256 (2009).

56. Garcia-Marquez MA, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Kochanek M, Weber T, Wennhold K, et al. A multimerized form of recombinant human CD40 ligand supports long-term activation and proliferation of B cells. *Cytotherapy* **16**, 1537-1544 (2014).

57. Dam EM, Maier AC, Hocking AM, Carlin J, Ng B, Buckner JH. Increased Binding of Specificity Protein 1 to the IL21R Promoter in B Cells Results in Enhanced B Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **9**, 1978 (2018).

58. Grange C, Letourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Martin J, Liberman M, et al. Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *J. Immunol. Methods* **372**, 119-126 (2011).

59. Monette A, Morou A, Al-Banna NA, Rousseau L, Lattouf JB, Rahmati S, et al. Failed immune responses across multiple pathologies share pan-tumor and circulating lymphocytic targets. *J. Clin. Invest.* **129**, 2463-2479 (2019).

60. Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3291-3298 (2000).

61. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, Gannon PO, Forget MA, Routy JP, et al. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J. Immunol.* **183**, 7752-7760 (2009).

62. Pelletier S, Tanguay S, Lee S, Gunaratnam L, Arbour N, Lapointe R. TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1207-1218 (2009).

63. Lapointe R, Royal RE, Reeves ME, Altomare I, Robbins PF, Hwu P. Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100. *J. Immunol.* **167**, 4758-4764 (2001).

64. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J. Exp. Med.* **180**, 329-339 (1994).

65. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front. Immunol.* **10**, 2458 (2019).

66. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, et al. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2073-2079 (1997).

67. Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology* **117**, 548-557 (2006).

68. Amu S, Brisslert M. Phenotype and function of CD25-expressing B lymphocytes isolated from human umbilical cord blood. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 481948 (2011).

69. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* **20**, 707-718 (2004).

70. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells. *Immunol. Rev.* **194**, 48-60 (2003).

71. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J. Immunol.* **174**, 6781-6790 (2005).

72. Neron S, Nadeau PJ, Darveau A, Leblanc JF. Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **59**, 25-40 (2011).

73. Van Belle K, Herman J, Boon L, Waer M, Sprangers B, Louat T. Comparative In Vitro Immune Stimulation Analysis of Primary Human B Cells and B Cell Lines. *J Immunol Res* **2016**, 5281823 (2016).

74. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J. Immunol.* **179**, 5886-5896 (2007).

75. Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separably program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 826-839 (2019).

76. Franke F, Kirchenbaum GA, Kuerten S, Lehmann PV. IL-21 in Conjunction with Anti-CD40 and IL-4 Constitutes a Potent Polyclonal B Cell Stimulator for Monitoring Antigen-Specific Memory B Cells. *Cells* **9**, 433 (2020).

77. Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 925-932 (2017).

78. Gonzalez DG, Cote CM, Patel JR, Smith CB, Zhang Y, Nickerson KM, et al. Nonredundant Roles of IL-21 and IL-4 in the Phased Initiation of Germinal Center B Cells and Subsequent Self-Renewal Transitions. *J. Immunol.* **201**, 3569-3579 (2018).

79. Wennhold K, Weber TM, Klein-Gonzalez N, Thelen M, Garcia-Marquez M, Chakupurakal G, et al. CD40-activated B cells induce anti-tumor immunity in vivo. *Oncotarget* **8**, 27740-27753 (2017).

80. Gonzalez NK, Wennhold K, Balkow S, Kondo E, Bolck B, Weber T, et al. In vitro and in vivo imaging of initial B-T-cell interactions in the setting of B-cell based cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **4**, e1038684 (2015).

81. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 265-273 (2003).

82. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.* **229**, 5-11 (2009).

83. Shin CA, Cho HW, Shin AR, Sohn HJ, Cho HI, Kim TG. Co-expression of CD40L with CD70 or OX40L increases B-cell viability and antitumor efficacy. *Oncotarget* **7**, 46173-46186 (2016).

84. Lee J, Dollins CM, Boczkowski D, Sullenger BA, Nair S. Activated B cells modified by electroporation of multiple mRNAs encoding immune stimulatory molecules are comparable to mature dendritic cells in inducing in vitro antigen-specific T-cell responses. *Immunology* **125**, 229-240 (2008).

Chapitre 4 – Discussion et perspectives

Les lymphocytes B sont des cellules aux fonctions diverses qui présentent un fort potentiel biotechnologique. Leur stimulation *in vitro* appropriée permet de les polariser afin qu'ils sécrètent des Ab ou présentent des Ag. Cette dernière fonction est d'un intérêt particulier, car les lymphocytes B peuvent être utilisés comme APC pour activer les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques et donc induire une réponse cellulaire antivirale ou antitumorale. La vaccination est une méthode qui permet d'activer le système immunitaire pour protéger l'organisme contre des maladies infectieuses. L'induction d'une réponse à la fois humorale et cellulaire est essentielle afin de contrôler les infections virales. En immunothérapie du cancer, l'activation des CTL est fondamentale à l'élimination des cellules tumorales. En conséquence, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de la fonction de présentation d'Ag des lymphocytes B afin d'induire une réponse cellulaire.

Tout d'abord, nos travaux ont porté sur l'étude de la voie de présentation croisée par laquelle un épitope fusionné à la VLP de PapMV, une plateforme vaccinale, est présenté par les lymphocytes B. Ce projet a permis d'identifier une nouvelle voie de présentation croisée vacuolaire qui dépend de l'induction de l'autophagie. Nos recherches ont ensuite porté sur l'optimisation de la culture *in vitro* des lymphocytes B humains afin d'accroître leur expansion, tout en induisant leur fonction de présentation d'Ag. Les résultats obtenus ont approfondi nos connaissances de la biologie des cellules CD40-B et ont démontré que l'optimisation du protocole de culture permet de générer des lymphocytes B prolifératifs étant des APC efficaces capables d'activer les CTL *in vitro*. Ces travaux renforcent le potentiel biotechnologique des cellules CD40-B et suggèrent qu'elles pourraient être utilisées afin d'améliorer les techniques d'immunothérapie du cancer comme le transfert adoptif ou bien servir de plateforme vaccinale remplaçant les DC.

Au cours des sections suivantes, je résumerai les résultats présentés dans les chapitres précédents en les mettant en contexte avec la littérature. De plus, je proposerai des expériences pour approfondir ces résultats et je discuterai des perspectives envisagées à moyen et long terme dans un contexte d'immunothérapie du cancer.

La présentation croisée d'un épitope inséré dans la VLP de PapMV par les lymphocytes B.

La description des mécanismes de la voie de présentation croisée vacuolaire

Retour sur les résultats

Nous avons caractérisé plus en détail le mécanisme par lequel un épitope inséré dans la VLP de PapMV est présenté par les lymphocytes B. Une étude précédente au sein du laboratoire ayant démontré une voie de présentation croisée indépendante du protéasome dans les lymphocytes B (362), nos travaux se sont concentrés sur la description des mécanismes moléculaires de la voie de présentation croisée de type vacuolaire (**Figure 6**). Les expériences ont été réalisées à la fois dans les cellules EBV-B, mais également dans la lignée lymphoblastique hybride B-T T2 qui n'exprime pas le transporteur TAP. Nous avons tout d'abord observé que l'apprêtement de l'épitope était un processus actif qui était inhibé par l'incubation des cellules à 4°C. Grâce à la lignée cellulaire T2, nous avons démontré que la présentation de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV s'effectuait efficacement en l'absence de TAP (**Figure 9**). Ces résultats ont suggéré que l'apprêtement de l'Ag s'effectuait dans le compartiment vacuolaire comme les endosomes et ne requérait pas la translocation de l'Ag dans le cytosol pour sa dégradation par le protéasome ni le transport des peptides dans le RE ou les endosomes par TAP.

D'autres études ont décrit des voies de présentation croisées semblables, indépendantes de la dégradation par le protéasome et de TAP. Dans un modèle murin $TAP^{-/-}$, l'engagement du TLR-9 augmente l'efficacité de la présentation croisée par la voie vacuolaire de la forme soluble de l'OVA (396). Dans les BMDC, un peptide couplé à la protéine chaperonne HSP90 est apprêté par une voie de présentation croisée indépendante de TAP, mais dépend de la dégradation par la cathepsine S et de l'acidification des lysosomes (394). *In vivo*, l'épitope p33 inséré dans la VLP de LCMV est présenté par une voie de présentation indépendante de TAP par les DC $CD8^-$ murines dérivées de la peau (548). Récemment, deux études ont démontré que les MoDC immatures humaines apprêtent des peptides longs dérivés d'Ag du mélanome (gp100, MART-1 et MAGE-A3) par une voie vacuolaire (390, 397). Tung-Huau et al., ont rapporté que les MoDC et des Mϕ

dérivés de monocytes humains et purifiés à partir d'ascites de la cavité péritonéale de patients atteints de cancer, apprêtent l'Ag long MART-1 exclusivement par une voie vacuolaire indépendante du protéasome, mais qui dépend des cathepsines (398).

Nos résultats ont renforcé notre hypothèse selon laquelle l'épitope inséré dans la VLP de PapMV est apprêté par une voie vacuolaire. L'inhibition de l'acidification des lysosomes par la chloroquine altère la présentation des épitopes, suggérant ainsi une dégradation endosomale de la VLP. De plus, l'inhibition de la cathepsine S dans les cellules EBV-B et T2 réduit la présentation croisée de l'épitope (**Figure 10**). Cette protéase participe à la dégradation de la chaîne Ii dans la voie présentation d'Ag par le CMH-II (350), mais est aussi associée à la voie de présentation croisée vacuolaire(391). Ainsi, les résultats présentés dans le **Chapitre 2** ont confirmé que les lymphocytes B apprêtent la VLP de PapMV par une voie de présentation croisée vacuolaire. Toutefois, le mécanisme décrit est incomplet. Dans les prochaines sections, je critiquerai les modèles d'études utilisés puis je proposerai des expériences et formulerai des hypothèses afin de répondre aux questions restées en suspens.

Justification et critique des modèles utilisés

L'ensemble des expériences ont été réalisées en utilisant les cellules EBV-B. Nous avons choisi de travailler avec ces cellules au lieu des lymphocytes B humains stimulés par le CD40 et l'IL-4 (IL-4-CD40-B), car ces derniers se sont révélés être plus sensibles que les cellules EBV-B aux différents inhibiteurs pharmacologiques utilisés. Leur survie étant impactée, la réalisation de cette étude dans les lymphocytes B primaires était donc plus difficile à réaliser. Étant donné leur facilité de culture, les cellules EBV-B étaient un modèle intéressant très similaire aux cellules IL-4-CD40-B qui nous a permis d'obtenir à faible coût, un très grand nombre de cellules résistantes et donc de disposer de matériel biologique suffisant afin étudier la voie de présentation vacuolaire et l'induction de l'autophagie. Cependant, à la suite des résultats présentés dans le **Chapitre 3**, réaliser ces expériences dans les lymphocytes B primaires stimulés par le CD40, IL-4 et l'IL-21 permettrait de valider nos résultats dans un modèle physiologique.

Nous avons également réalisé la plupart des expériences dans la lignée T2 qui est déficiente en TAP. Cette lignée a permis de démontrer que la présentation croisée de l'épitope

inséré dans la VLP de PapMV s'effectuait efficacement en l'absence de ce transporteur suggérant ainsi une présentation croisée de type vacuolaire (**Figure 9**). Toutefois, il serait judicieux de confirmer directement dans les lymphocytes B que la voie de la présentation croisée des épitopes est indépendante de TAP. Une avenue possible serait l'inhibition de ce transporteur par la transfection d'un acide nucléique (plasmide ADN ou ARNm) codant pour la protéine ICP47 (*infected cell protein 47*) dérivée du virus HSV-1 (390, 397). Lors d'une infection par ce virus, cette protéine bloque spécifiquement TAP et empêche la présentation des épitopes viraux aux CTL. Par cette méthode, il serait ainsi possible de démontrer que la présentation de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV est indépendante de TAP directement dans les cellules EBV-B.

Comme décrit dans la section **La voie de présentation d'antigènes par le CMH de classe I**, TAP joue à la fois le rôle de transporteur et de protéine d'ancrage pour le complexe de chargement peptidique permettant ainsi le chargement de peptides sur les CMH-I nouvellement synthétisés dans le RE. L'association avec un peptide est une étape de contrôle qualité cruciale pour les CMH-I, car elle permet leur repliement final adéquat et leur départ du RE pour rejoindre la surface cellulaire. Ma et al., ont démontré qu'en l'absence de TAP, certains CHM-I comme HLA-A*0101 restent non-chargés et sont incapables de quitter le RE. Dans leur modèle, les MoDC immatures humaines apprêtent l'Ag long de MAGE-A3 par une voie de présentation croisée purement vacuolaire qui ne requiert pas le transport des épitopes par TAP. Toutefois, cette voie de présentation dépend indirectement de TAP, car il participe au chargement des molécules HLA-A*0101 dans le RE, ce qui leur permet de le quitter et de rejoindre le compartiment vacuolaire où l'échange avec l'épitope de MAGE-A3 s'effectue (390). En revanche, le CMH-I HLA-A*0201 peut quitter le RE même en absence de TAP, car il est capable de s'associer avec des peptides d'adressage hydrophobes présents dans le microenvironnement du réticulum, ce qui complète le point de contrôle et leur permet d'être dirigés du RE vers le compartiment vacuolaire (390, 397). Dans nos travaux, nous avons étudié la présentation croisée de l'épitope $gp100_{209\text{-}217}$ inséré dans la VLP de PapMV et présenté spécifiquement par HLA-A*0201 (362). Ainsi, bien que nous rapportions une présentation vacuolaire indépendante de TAP, il est envisageable que l'étude de la présentation d'un épitope inséré dans la VLP de PapMV spécifique d'un autre CMH-I, comme HLA-A*0101, puisse dépendre indirectement de l'expression de TAP.

Perspectives

Le mécanisme d'entrée de la VLP de PapMV dans les lymphocytes B

La présentation croisée d'un Ag nécessite tout d'abord son entrée dans la cellule. Les résultats obtenus par cytométrie en flux et microscopie confocale ont démontré que les lymphocytes B internalisent la VLP de PapMV et cette dernière se retrouve dans des vésicules (**Figures 10-12**). De façon similaire, l'équipe du Dr Alain Lamarre a rapporté qu'*in vivo,* tous les types d'APC murines (DC, Mϕ et lymphocytes B) étaient capables d'internaliser la VLP de PapMV fusionnée à l'Ag p33 du LCMV. L'analyse par microscopie confocale des DC $CD11c^+$ purifiées de souris immunisées par la VLP a démontré qu'elle se retrouvait dans le cytoplasme, principalement au niveau de structures vésiculaires. De plus, elle induisait l'activation et la maturation des DC spléniques (535). D'autres études ont également observé une entrée des VLP de PapMV dans les différentes APC murines (532) et humaines dont les lymphocytes B, et leur localisation dans les endosomes tardifs ou les phagosomes (533).

Dans notre étude, le mécanisme d'entrée de la VLP de PapMV dans les lymphocytes B n'a pas été étudié. Les lymphocytes B sont capables d'internaliser des Ag par différents mécanismes, le plus caractérisé étant l'entrée des Ag par endocytose qui dépend de la clathrine lorsqu'ils sont liés au BCR (46, 47). Il est possible d'exclure ce mode d'entrée puisque nous n'avons pas utilisé des lymphocytes B ayant une spécificité pour la protéine de surface constituant la VLP de PapMV ou l'épitope inséré. Les lymphocytes B sont capables d'acquérir des Ag par des mécanismes différents selon la taille des Ag et leur liaison à des récepteurs de surface. Classiquement, ils peuvent internaliser des Ag par endocytose ou micro/macropinocytose. Par exemple, ils internalisent et apprêtent des Ag protéiques volumineux comme l'anatoxine tétanique (~150 kDa) et l'hémocyanine de patelle (~390 kDa) (284). Récemment, il a été démontré que les lymphocytes B humains peuvent internaliser des Ag particulaires par phagocytose qu'ils soient à liés au BCR ou non (549, 550). Afin d'étudier le mécanisme d'entrée dans les lymphocytes B, il serait envisageable d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques (**Tableau 3**) ou avoir recours à des ARNi pour inhiber les différents mécanismes d'entrée. Par exemple, il se serait possible de cibler l'ARNm codant pour la chaîne lourde de la clathrine afin de bloquer l'internalisation par l'endocytose qui dépend de cette protéine (551).

Inhibiteurs	Cible et *mécanisme*	Référence
5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA)	**Macropinocytose** *Bloque l'échangeur membranaire de Na^+/H^+*	(552)
Jasplakinolide (J) et (-)-blebbistatin (B)	**Macropinocytose/Phagocytose** *Inhibent le remodelage du cytosquelette d'actine : stabilise les filaments (J) et inhibe la myosine II (B)*	(552)
Cytochalasine D	**Phagocytose** *Inhibe le remodelage du cytosquelette d'actine*	(550)
PitStop® 2	**Endocytose qui dépend de la clathrine** *Inhibe l'interaction entre la clathrine et des protéines adaptatrices*	(552)
Dynasore ou Dyngo® 4a	**Endocytose qui dépend de la clathrine** *Inhibe les protéines dynamines I et II*	(553)
Filipin et Nystatin	**Endocytose qui dépend de la cavéoline** *Interagit avec le cholestérol membranaire*	(554)

Tableau 3. – Inhibiteurs proposés pour l'étude de l'entrée de la VLP de PapMV

Par ailleurs, l'utilisation de particules ou de sondes fluorescentes dont les mécanismes d'entrée sont caractérisés permettrait d'observer leur colocalisation avec la VLP de PapMV fluorescente par microscopie confocale. Par exemple, les lymphocytes B humains sont capables de phagocyter des billes de latex de plus de 1 µm de diamètre (549, 550). Des billes de faible diamètre (≤30 nm) ou des sondes fluorescentes comme l'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin,* BSA) BSA-Alexa Fluor™ 488 ou le DQ™ Red BSA pourraient être utilisées pour étudier l'entrée par pinocytose (552). Par ailleurs, les travaux de von Bergwelt-Baildon et al., ont rapporté que les cellules CD40-B internalisent la sonde fluorescente *Lucifer yellow* de façon similaire aux MoDC immatures, mais ils sont fortement moins efficaces pour internaliser la sonde fluorescente *70 kDa fluorescein-dextran* dont l'endocytose dépend de l'interaction avec le récepteur du mannose (284). Cette voie d'endocytose peut donc être exclue. Récemment, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, il a été démontré que l'entrée du virus de la mosaïque du pois à vache dans les cellules HeLa et la lignée de Mϕ murins RAW264.7 s'effectuait selon un mécanisme indépendant de la clathrine qui utilisait une combinaison de macropinocytose et d'endocytose qui dépend des cavéoles (554). Les lymphocytes B pourraient avoir recours à un mécanisme similaire pour internaliser la VLP de PapMV.

Il est également probable que l'entrée des VLP de PapMV dans les lymphocytes B soit facilitée par l'interaction avec des récepteurs. Lebel et al., ont démontré que la molécule du complément C3b est impliquée dans l'opsonisation de la VLP de PapMV. Le traitement des souris avec le facteur du venin de cobra inhibe la génération du C3b ce qui conduit à une diminution de l'internalisation de la VLP par les APC dont les lymphocytes B (532). Les lymphocytes B expriment les récepteurs du complément CD35/CR1 et CD21/CR2 qui reconnaissent les différents fragments de la molécule du complément C3 (555). Il a été rapporté que l'engagement de ce récepteur peut déclencher l'endocytose ou la phagocytose (556-558). Après avoir validé l'expression de ces récepteurs par les cellules EBV-B, il serait possible de réaliser des expériences de cytométrie en flux ou de microscopie confocale afin d'évaluer l'entrée de la VLP de PapMV en présence ou absence des molécules du complément C3. Si ces récepteurs sont impliqués, leur inhibition par des Ab bloquants devrait réduire l'internalisation de la VLP.

Par ailleurs, l'ensemble des expériences proposées pourrait être réalisé à l'aide du système d'analyse IncuCyte® qui offre la possibilité d'effectuer des observations de microscopie à fluorescence en temps réel sur cellules vivantes en culture. Ce système permettrait également d'évaluer l'impact des inhibiteurs pharmacologiques proposés, à la fois sur la viabilité des lymphocytes B que sur l'internalisation de la VLP de PapMV. Grâce aux expériences proposées, il sera possible de définir le mécanisme d'entrée de la VLP de PapMV dans les lymphocytes B.

Les protéases impliquées dans la dégradation de la VLP de PapMV

Nous avons démontré que l'inhibition de la cathepsine S dans les cellules EBV-B et T2 diminue la présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV, mais celle-ci n'est pas totalement abrogée (**Figure 10C-D**). De plus, l'inhibition de cette protéase dans les MoDC n'a pas d'impact significatif sur la présentation croisée de l'épitope gp100 (**Figure 25**). Ces résultats suggèrent que d'autres protéases soient impliquées dans la dégradation de la VLP de PapMV et la présentation croisée de l'épitope inséré.

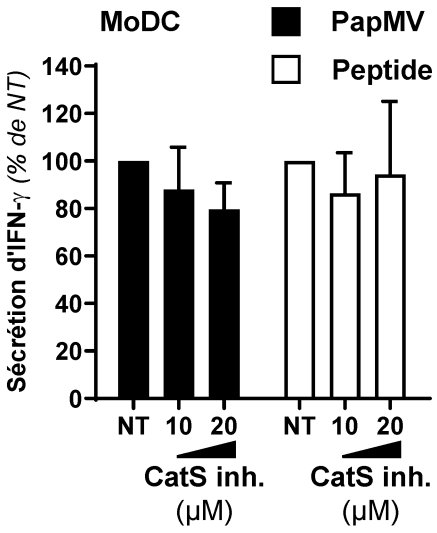


Figure 25. – Inhibition de la cathepsine S dans les MoDC

Les monocytes ont été enrichis par sélection positive $CD14^+$ à partir de PBMC $HLA\text{-}A^*0201^+$. Les MoDC ont été générées par stimulation avec l'IL-4 (40 ng/mL) et le GM-CSF (80 ng/mL) pendant 6 jours. Les MoDC ont été prétraitées pendant 1 heure avec un inhibiteur de la cathepsine S (CatS inh.) aux concentrations indiquées. PapMV-gp100 (25 µg/mL) ou le peptide gp100 (1 µM) a été ajouté aux MoDC prétraitées sans lavage préalable, et les cellules ont été incubées pendant 6 heures à 37°C. Les MoDC ont ensuite été lavées puis co-cultivées avec des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques de gp100 pendant 16 à 18 heures à un ratio de 1:1. Les surnageants ont été récoltés puis la sécrétion d'IFN-γ a été quantifiée par ELISA pour évaluer la présentation croisée de gp100 par CMH-I. Les résultats représentent la moyenne ± SEM, % de la sécrétion d'IFN-γ des MoDC non traitées (NT) et ont été compilés de trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience, la sécrétion d'IFN-γ a été mesurée dans deux réplicats techniques pour chaque condition.

Puisque nous postulons que la présentation croisée s'effectue par une voie purement vacuolaire, les protéases participant à la dégradation sont probablement vacuolaires. Il est donc peu probable que des protéases/peptidases cytosoliques (ex. la leucine aminopeptidase) ou résidentes du RE (ex. ERAP1/2) impliquées dans la présentation classique par CHM-I jouent un rôle (329, 334). Dans les DC myéloïdes humaines et différentes populations de DC murines, l'aminopeptidase IRAP a été identifiée comme une protéase endosomale importante dans la présentation croisée par CMH-I capable de générer des peptides de 8-9 résidus d'acides aminés. De plus, elle semble être colocalisée avec la GTPase Rab14 et les molécules du CMH-I (378, 559). Bien que le rôle d'IRAP ait été décrit dans la voie de présentation croisée qui dépend du protéasome (378), elle pourrait aussi participer à l'apprêtement vacuolaire de la VLP de PapMV. Afin de tester cette hypothèse, des essais de reconnaissance similaires à ceux effectués dans le **Chapitre 2** pourraient être réalisés en prétraitant les lymphocytes B avec un inhibiteur spécifique d'IRAP ou en inhibant son expression par ARNi. Étant donné que cette protéase joue un rôle dans de nombreux processus physiologiques, plusieurs inhibiteurs ont été développés et sont commercialement disponibles, comme le composé HFI-419 (560).

Par ailleurs, les lymphocytes B expriment de nombreuses autres protéases lysosomales dont différentes cathepsines qui pourraient participer à la dégradation de la VLP de PapMV. Certaines protéases sont notamment impliquées dans la dégradation des Ag exogènes dans la voie de présentation par CMH-II qui requiert également un apprêtement endosomal des Ag (272, 561). Dans les DC murines, il a été démontré que la chaîne Ii (CD74) interagit avec les CMH-I dans le RE et les dirige vers le compartiment endolysosomal pour leur chargement avec des peptides exogènes (562). Il est donc probable que des protéases classiquement associées à la dégradation des Ag dans la voie de présentation par CMH-II participent aussi à la dégradation endosomale de la VLP de PapMV lors de la présentation croisée vacuolaire, comme c'est le cas pour la cathepsine S (391). De même, la réductase lysosomale GILT semble impliquée dans la dénaturation des Ag à la fois dans la voie de présentation par CMH-II (563) et la voie de présentation croisée cytosolique (382). Dans les lymphocytes B murins, GILT semble également jouer un rôle dans la régulation de l'activité de la cathepsine S dont le site actif de cette protéase à cystéine peut être sous forme réduite (actif) ou oxydée (inactif). Cette régulation semble permettre d'éviter une protéolyse excessive des Ag, qui entraînerait la perte d'épitopes, et favorise ainsi la présentation d'Ag par CMH-II (564). Si cette enzyme joue un rôle dans la présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV, l'inhibition de son expression par ARNi dans les lymphocytes mènera à l'observation d'une diminution de la présentation de l'épitope lors des essais de reconnaissance.

L'expression des différentes protéases semble varier selon le stade de développement et le statut d'activation des lymphocytes B (561). Par exemple, il a été démontré que les cellules EBV-B dégradent la protéine basique de la myéline grâce à l'activité d'EAP (*asparagine endopeptidase*) tandis que les lymphocytes B humains primaires dégradent cet Ag par la cathepsine G (565). Il serait ainsi judicieux de caractériser le profil d'expression des protéases lysosomales dans les cellules EBV-B par qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) et *western blot*. Une étude par spectrométrie de masse des endosomes/lysosomes purifiés des cellules EBV-B serait aussi un moyen d'identifier les protéases lysosomales exprimées par ces cellules. Une fois les protéases identifiées, il sera possible de réaliser des essais de reconnaissance, similaires à ceux effectués dans le **Chapitre 2**, en prétraitant les cellules EBV-B

avec des inhibiteurs pharmacologiques inhibant des activités protéases spécifiques. Par exemple, le PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), la pepstatin ou le E-64 inhibent respectivement les protéases à sérine, à acide aspartique et à cystéine. Cette stratégie en entonnoir permettra d'identifier des candidats et de valider leur implication dans la dégradation de la VLP de PapMV en les inhibant de façon sélective grâce à des inhibiteurs pharmacologiques. Puisque les inhibiteurs peuvent avoir des effets non spécifiques, il sera crucial de valider les candidats identifiés en induisant une perte de fonction par ARNi ou par édition génétique des lymphocytes B grâce au système CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats-caspace 9*) (566, 567).

Ces expériences futures permettront ainsi d'identifier les acteurs jouant un rôle dans la dégradation vacuolaire de la VLP de PapMV dans les lymphocytes B.

Le chargement des épitopes sur les molécules du CMH de classe I

L'induction de la réponse des CTL nécessite la présentation des peptides préalablement chargés sur les CMH-I. Classiquement, les peptides produits par le protéasome sont transportés par TAP et chargés sur les CMH-I dans le RE. Dans la voie de présentation croisée cytosolique, les peptides résultant de la dégradation du protéasome peuvent retourner dans les endosomes d'où ils proviennent par le transporteur TAP et être chargés sur les CMH-I endosomaux (307, 330, 568). La présentation croisée vacuolaire des épitopes insérés dans la VLP de PapMV ne requiert ni la dégradation par le protéasome (362) ni le transport dans le RE ou les endosomes par TAP (**Figure 9**). Il est donc probable que le chargement des CMH-I s'effectue dans le compartiment vacuolaire. Toutefois, l'origine des CMH-I reste à déterminer.

Dans les BMDC, l'engagement des TLR stimule le routage des CMH-I présents dans un compartiment de recyclage endosomal Rab11a^{+} vers les phagosomes selon un mécanisme qui dépend de SNAP23 (*synaptosomal-associated protein 23*) (377). Des études dans les DC murines ont identifié les GTPases Rab3b/Rab3c (569) ou Rab22a (570) comme étant impliquées dans la présentation croisée par leur rôle dans la régulation de la distribution intracellulaire des CMH-I incluant leur recyclage, et leur transport au niveau des phagosomes (569, 570). Par ailleurs, les pDC humaines présentent très rapidement des Ag viraux par une voie de présentation croisée

vacuolaire qui requiert le chargement des épitopes sur les CMH-I dans les endosomes de recyclage (393). Afin de déterminer si l'épitope dérivé de la dégradation de la VLP de PapMV est chargé sur les CMH-I dans les endosomes de recyclage, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Il est tout d'abord possible d'inhiber le recyclage des CMH-I par le traitement à la primaquine, une base faible s'accumulant dans les endosomes et empêchant le recyclage des membranes à la surface (393, 397, 571). Il a aussi été rapporté que l'incubation des cellules à une température de 20^{o}C interfère avec la sécrétion classique et le recyclage des CMH-I (390, 397). Il serait donc envisageable d'incuber les cellules EBV-B à 20^{o}C lors de leur chargement avec la VLP de PapMV tout en s'assurant que l'entrée de la VLP n'est pas diminuée à cette température.

D'autres études ont quant à elles rapporté que les CMH-I proviennent du RE et sont dirigés vers le compartiment vacuolaire par différents mécanismes. Dans les DC murines, la GTPase Rab39a est essentielle à la présentation croisée, car elle régule le transport vésiculaire des CMH-I non chargés par un peptide du RE vers les phagosomes (572). D'autres protéines ont été impliquées dans le transport des CMH-I comme la chaîne Ii (CD74) qui se lie au CMH-I dans le RE et facilite leur transport vers les endosomes (562) ou encore la protéine Sec22b qui semble jouer un rôle dans le transport des molécules, dont les CMH-I, du compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) vers les phagosomes (374, 573). Enfin, Ma et al., ont démontré que la présentation croisée vacuolaire des épitopes gp100, MART-1 et MAGE-A3 dans les MoDC humaines immatures et les cellules T2 dépend du chargement des peptides sur des CMH-I nouvellement synthétisés chargés avec des peptides de faible affinité, qui atteignent le compartiment vacuolaire par une voie de sécrétion alternative. Bien que le mécanisme précis ne soit pas caractérisé, il semble indépendant des protéines Sec22b et CD74 (390, 397). Dans le but d'évaluer si les CMH-I proviennent du RE, il serait possible de réaliser des essais de reconnaissance en prétraitant les lymphocytes B avec le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (397) ou avec la brefeldin A pour interférer avec le transport des molécules provenant du RE et de l'appareil de Golgi (390, 572). Étant donné la sensibilité des lymphocytes B aux inhibiteurs pharmacologiques, il sera important de vérifier l'impact de ces composés sur la viabilité cellulaire. De plus, l'implication des protéines Sec22b et CD74 dans notre modèle d'étude pourrait être étudiée par

la transfection des cellules EBV-B avec des ARNi inhibant leurs expressions ou bien par leur édition génétique par CRISPR-Cas9.

La microscopie confocale à fluorescence pourrait également être utilisée pour élucider les mécanismes de chargement des CMH-I dans notre modèle d'étude. Il sera possible d'évaluer la colocalisation entre les molécules de CMH-I, la VLP de PapMV couplée au fluorochrome Alexa Fluor™ 647 (PapMV-AF647) (**Figure 11**) ainsi que les différentes GTPases Rab identifiées précédemment ou caractéristiques des différents compartiments endosomaux (574). Une fois un candidat identifié, la perte de son expression par ARNi ou CRISPR-Cas9 permettra de valider son rôle dans la présentation croisée vacuolaire de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV.

Ces perspectives permettront ainsi de caractériser le mécanisme par lequel l'épitope est chargé sur les CMH-I.

L'implication de l'autophagie dans la présentation croisée vacuolaire

Dans le **Chapitre 2**, nous avons formulé l'hypothèse que l'autophagie est induite dans les lymphocytes B et favorise la présentation de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV. Tout d'abord, nous avons évalué si l'incubation avec la VLP de PapMV induisait l'autophagie. Plusieurs techniques expérimentales sont disponibles pour étudier ce processus (411). Dans nos travaux, nous avons évalué l'induction de l'autophagie par microscopie confocale à fluorescence en visualisant la formation de vésicules $LC3^+$ dans les cellules EBV-B exprimant la protéine de fusion LC3-GFP, ainsi que par la génération de LC3-II par *western blot*. Nous avons démontré que l'incubation avec la VLP de PapMV augmente le nombre de vésicules $LC3^+$ dans les cellules EBV-B (**Figure 11C-D**). De plus, il semble qu'il y ait une corrélation positive entre le nombre de vésicules PapMV-$AF647^+$ et le nombre de vésicules $LC3^+$, ce qui suggère que l'induction de l'autophagie est proportionnelle à la quantité de VLP internalisées (**Figure 11F**). Ces observations se traduisent par une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I observé par *western blot* qui semble aussi dépendre de la concentration de la VLP de PapMV utilisée lors de l'incubation (**Figure 11A-B**).

Plusieurs études ont démontré que l'autophagie est impliquée dans la voie de présentation classique par CMH-I et la voie de présentation croisée cytosolique mais les mécanismes décrits sont très variés (418). Par exemple, lors de la phase tardive de l'infection de

Mϕ par le virus HSV-1, la dégradation de la glycoprotéine B dans les autolysosomes précède la prise en charge des polypeptides par le protéasome cytosolique (419, 420). L'autophagie participe à la présentation croisée vacuolaire de la protéine pUL138 du HCMV et les peptides dérivés sont chargés sur les CMH-I au sein des compartiments endosomaux dans les MoDC humaines et les cellules T2 infectés (422). Dasari et al., ont rapporté que les cellules EBV-B présentent l'Ag soluble pp65 du HCMV par une voie de présentation croisée qui dépend du protéasome, mais pas de TAP et qui implique l'autophagie. De plus, les peptides sont chargés sur les CMH-I dans les autophagosomes (364). À la suite de nos résultats, le mécanisme d'induction de l'autophagie par la VLP de PapMV dans les cellules EBV-B reste à déterminer.

L'induction de l'autophagie et l'engagement des TLR

La VLP de PapMV est constituée de la protéine de surface de PapMV qui s'autoassemble autour d'un ARN simple brin (528-530). La VLP de PapMV internalisée par les cellules immunitaires rejoint les endosomes où l'ARN est libéré et active le TLR-7 chez la souris (531, 532, 575) et les TLR-7/8 chez l'Homme (533). Afin de démontrer l'implication des TLR endosomaux dans l'induction de la sécrétion d'IFN-α par les PBMC humaines incubées avec la VLP de PapMV, Carignan et al., ont traité ces cellules avec la chloroquine. Ils ont rapporté que cet inhibiteur abolit la sécrétion d'IFN-α induite par la VLP ou le R837, un agoniste du TLR-7 (533). Puisque la chloroquine bloque également l'acidification des lysosomes, il est probable que le phénotype observé résulte aussi de l'inhibition du processus d'autophagie induit par la VLP dans ces cellules. De façon similaire, le virus de la mosaïque du pois à vache active les monocytes humains selon un mécanisme qui implique l'acidification des endosomes et l'engagement des TLR-7/8 (576).

Plusieurs études ont rapporté un lien entre l'activation des TLR, dont le TLR-7, et l'induction de l'autophagie (577-580). Delgado et al., ont démontré que le TLR-7 est le TLR le plus efficace pour induire l'autophagie dans une lignée murine de Mϕ et dépend de la signalisation par la protéine MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) (579). L'autophagie est également un moyen de diriger les Ag riches en ARN vers les compartiments endosomaux contenant le TLR-7 dans le pDC murines et humaines (581, 582). Dans modèle murin de lupus érythémateux, il a été suggéré que l'induction de l'autophagie dans les lymphocytes B permet la translocation des Ag contenants de l'ARN dans les compartiments riches en TLR-7 ce qui mène au

développement de l'auto-immunité (583, 584). Par ailleurs, dans les cellules immunitaires innées, les cathepsines comme la cathepsine S, sont impliquées dans la protéolyse limitée des ectodomaines des TLR-3, TLR-7 et TLR-9 permettant leur activation (585, 586). Les TLR-7/8, et plus particulièrement le TLR-7, étant exprimés par les lymphocytes B humains (587), il est probable que leur engagement par l'ARN de la VLP de PapMV induise l'autophagie. L'autophagie pourrait aussi permettre de transporter les TLR-7/8 au niveau du compartiment vacuolaire riche en cathepsines et en VLP de PapMV. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions évaluer l'induction de l'autophagie par la VLP de PapMV dans des cellules EBV-B traitées avec un antagoniste des TLR-7/8 ou déficientes en ces TLR ou en protéines nécessaires à leur signalisation comme MyD88. De plus, il serait possible d'évaluer s'il y a une colocalisation entre PapMV-AF647 et les TLR endosomaux par microscopie confocale à fluorescence.

La localisation des VLP de PapMV dans les autophagosomes

Lors des expériences de microscopie confocale à fluorescence nous avons observé la présence de la VLP au sein de vésicules dans les cellules EBV-B exprimant la protéine de fusion LC3-GFP (**Figure 11C**). Ces expériences ont été réalisées après une incubation de trois heures avec la VLP ou la rapamycine qui induit l'autophagie (**Figure 7**). Nous avons seulement constaté une colocalisation partielle entre les vésicules contenant la VLP et les autophagosomes (LC3-GFP^{+}). Il est possible que la durée d'incubation de trois heures ne soit pas optimale pour observer une colocalisation plus importante entre ces structures. Nous pourrions réitérer ces expériences de microscopie à différents temps pour évaluer s'il se produit une colocalisation à un autre moment.

Les cellules EBV-B étant des cellules en suspension, nous avons eu recours à une cytocentrifugeuse pour les déposer sur une lame de verre et les aplanir. Cette méthode induit une forte mortalité cellulaire et produit de nombreux débris. Lors des expériences futures, l'adhérence des cellules EBV-B sera induite par leur incubation sur une lamelle de verre traitée à la poly-D-lysine. Cette méthode permet l'adhérence et l'étalement des cellules en suspension alors qu'elles se trouvent en culture dans leur milieu et dans l'incubateur. Grâce à cette stratégie, il serait envisageable de réaliser des expériences de microscopie en temps réel grâce au système d'analyse IncuCyte®. Bien que la résolution soit inférieure à la microscopie confocale, cette technique permettrait d'évaluer facilement la durée nécessaire pour observer une colocalisation

apparente entre la VLP et les autophagosomes, ainsi que de mesurer la cinétique d'induction de l'autophagie. La validation des résultats pourra ensuite être effectuée par microscopie confocale.

Le rôle de l'autophagie

Malgré les évidences limitées apportées par la microscopie permettant de positionner les VLP de PapMV dans les autophagosomes, les essais de reconnaissance dans lesquels les voies de l'autophagie ont été inhibées par des inhibiteurs pharmacologiques ont permis de démontrer une modulation de la présentation croisée des épitopes insérés dans les VLP (**Figures 10A-B et 12A-B**).

Tout d'abord, nous avons observé que l'inhibition de l'induction de l'autophagie par le 3-methyladénine (3-MA), un inhibiteur de PI3K de classe III (588) réduisait significativement la présentation de l'épitope. Cependant, le 3-MA a des effets non spécifiques sur les cellules. Nous avons effectué des expériences de cytométrie en flux pour nous assurer que la diminution de la présentation observée était due à l'inhibition de l'apprêtement de la VLP et non pas au blocage de son entrée dans les cellules (**Figure 12**) ou à la diminution de l'expression des CMH-I à la surface (**Figure 14E-F**). Contrairement aux cellules T2 où le 3-MA semble diminuer l'internalisation de la VLP et réduit significativement l'expression des CMH-I, ce composé n'a pas d'impact significatif sur l'entrée de la VLP dans les cellules EBV-B et leur expression des CMH-I à la concentration de 2 mM (**Figures 12 et 14E-F**). Toutefois, l'expression des CMH-I à la surface des cellules EBV-B est significativement diminuée lorsqu'elles sont traitées avec le 3-MA à la dose de 5 mM (**Figure 14E**). Ces observations semblent expliquer l'inhibition de la présentation croisée plus forte dans les essais de reconnaissance utilisant les cellules T2 prétraitées avec le 3-MA (**Figure 12**). Par ailleurs, l'étude de l'implication de l'autophagie dans la voie de présentation vacuolaire de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV dans les MoDC s'est révélée infructueuse du fait de l'impact important des inhibiteurs sur la présentation de l'épitope minimal gp100 contrôle (**Figure 26A-B**).

Nous avons également évalué si l'induction de l'autophagie favorisait une meilleure présentation croisée des épitopes insérés dans la VLP de PapMV. L'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine ou la privation en nutriments induit l'autophagie (402). Malheureusement, le traitement des cellules EBV-B et T2 avec la rapamycine n'a pas permis d'observer une augmentation de la présentation antigénique. Contrairement à notre hypothèse, nous avons

constaté une diminution de la présentation croisée tant de l'épitope gp100 inséré dans les VLP que du peptide gp100 contrôle. Ce résultat ne s'explique pas par l'impact de la rapamycine sur l'entrée de la VLP ni sur l'expression des CMH-I à la surface des cellules (**Figure 15**). Des études complémentaires sont requises pour caractériser l'impact de la rapamycine sur la biologie des lymphocytes B. Dans les MoDC, le traitement à la rapamycine diminue la présentation du peptide gp100 contrôle, mais ne semble pas avoir d'effet sur la présentation croisée lorsqu'il est inséré dans la VLP de PapMV (**Figure 26C**).

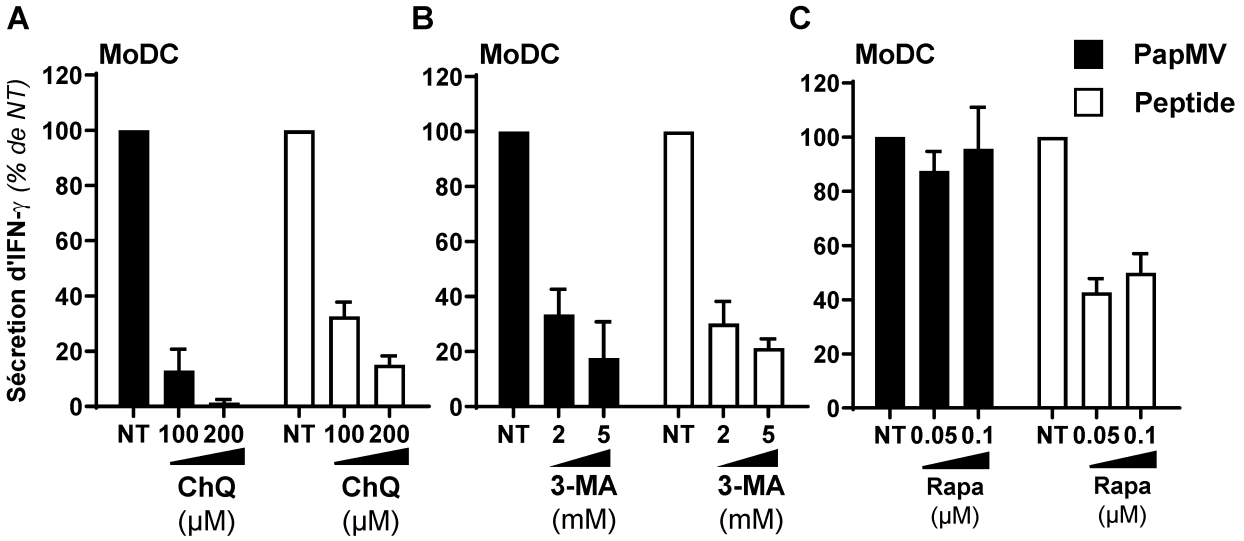


Figure 26. – Modulation de l'autophagie dans les MoDC

Les MoDC ont été générées comme décrit dans la **Figure 25** puis ont été prétraitées pendant 1 heure avec la chloroquine (ChQ) (**A**), le 3-méthyladénine (3-MA) (**B**) ou la rapamycine (Rapa) (**C**) aux concentrations indiquées. PapMV-gp100 (25 µg/mL [**A**] ou 50 µg/mL [**B, C**]) ou le peptide gp100 (1 µM) a été ajouté aux MoDC prétraitées sans lavage préalable, et les cellules ont été incubées pendant 6 heures à 37°C. Les MoDC ont été lavées puis co-cultivées avec des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques de gp100 pendant 16 à 18 heures à un ratio de 1:1. Les surnageants ont été récoltés puis la sécrétion d'IFN-γ a été quantifiée par ELISA pour évaluer la présentation croisée de gp100 par CMH-I. Les résultats représentent la moyenne ± SEM, % de la sécrétion d'IFN-γ des MoDC non traitées (NT) et ont été compilés de trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience, la sécrétion d'IFN-γ a été mesurée dans deux réplicats techniques pour chaque condition.

La privation en nutriments comme autre inducteur de l'autophagie s'est révélée tout aussi infructueuse. Nous avons incubé les cellules EBV-B dans une solution saline (*Hank's Balanced Salt*

Solution, HBSS) pendant trois heures lors du chargement avec la VLP de PapMV. Nous avons confirmé par *western blot* que la privation menait à induction de l'autophagie (**Figure 27A**) et nous avons mesuré une augmentation de la présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV par les cellules EBV-B (**Figure 27B**). Toutefois, l'évaluation de l'entrée de la VLP dans les cellules EBV-B en condition de privation révèle qu'elles internalisent une quantité plus importante de nanoparticules (**Figure 27C**). Ainsi, il est impossible d'établir un lien direct entre l'induction puissante de l'autophagie et l'augmentation de la présentation de l'épitope, car il est probable que le phénotype observé soit simplement le résultat de l'entrée et de l'apprêtement d'un nombre plus important de VLP de PapMV.

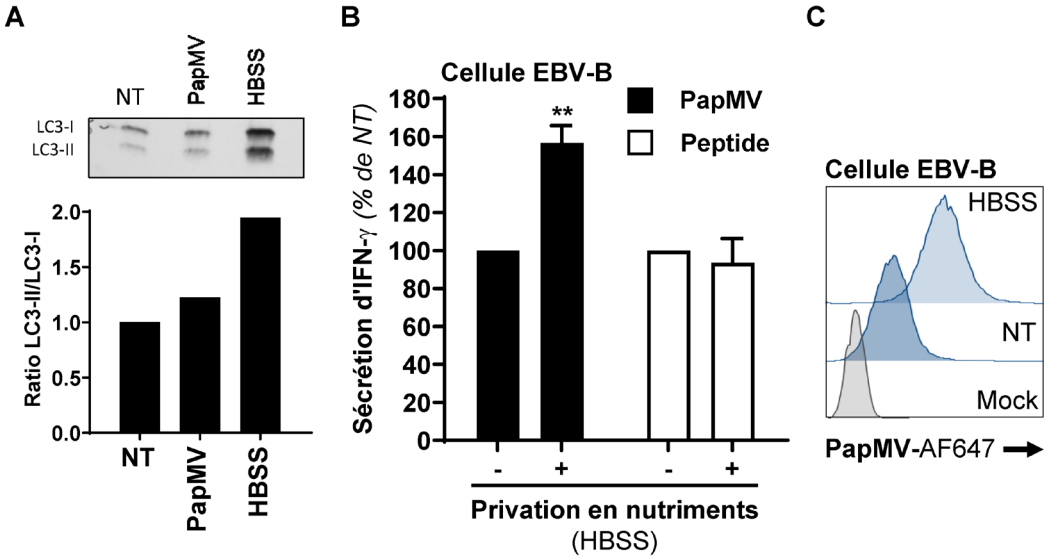


Figure 27. – Induction de l'autophagie par la privation en nutriments des cellules EBV-B

A Les cellules EBV-B ont été privées de nutriments par l'incubation en HBSS ou chargées avec la VLP de PapMV (50 ng/mL) pendant 3 heures. Les cellules ont été récoltées; les protéines ont été extraites puis séparées par SDS-PAGE puis LC3 a été révélée par *western blot*. Les résultats représentent la moyenne ± SEM du ratio de densitométrie des bandes LC3-II/LC3-I (n = 1). **B** Les cellules EBV-B ont été chargées à 37°C pendant 3 heures avec PapMV-gp100 (50 µg/mL) ou le peptide gp100 (1 µM) dans leur milieu de culture complet ou en HBSS. Elles ont été lavées puis cultivées pendant 3 heures dans leur milieu de culture complet avec PapMV-gp100 (50 µg/mL) ou le peptide gp100 (1 µM). Après deux lavages, elles ont été co-cultivées avec des lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques de gp100 pendant 16 à 18 heures à un ratio de 1:1. Les surnageants ont été récoltés et la sécrétion d'IFN-γ a été quantifiée par ELISA pour évaluer la présentation croisée de gp100 par CMH-I. Les résultats représentent la moyenne ± SEM, % de la sécrétion d'IFN-γ des cellules EBV-B non traitées (NT) et ont été compilés de huit expériences indépendantes. Pour chaque expérience, la sécrétion d'IFN-γ a été mesurée dans deux réplicats techniques pour

chaque condition. Un test de Student non apparié bilatéral a été réalisé (significatif si $p < 0.05$). **$p < 0.01$ par rapport au contrôle avec le peptide. **C** Les cellules EBV-B cultivées dans leur milieu complet ou en HBSS ont été incubées pendant 3 heures avec PapMV-Alexa Fluor 647 (10 µg/mL). Les histogrammes représentent l'internalisation de la VLP dans les cellules EBV-B obtenus par cytométrie en flux et sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Enfin, la protéine ATG5 étant essentielle à l'induction de l'autophagie (**Figure 7**), nous avons diminué son expression dans les cellules EBV-B par shRNA. Bien que l'inhibition de son expression soit partielle, nous avons obtenu une diminution significative de la présentation croisée (**Figure 13**). Afin d'améliorer l'inhibition de l'expression d'ATG5, nous avons évalué d'autres séquences de shRNA ainsi qu'un siRNA commercial. Malgré les tentatives multiples, les infections des cellules EBV-B avec les shRNA se sont soldées par la mort des cellules tandis que le siRNA n'a pas mené à une diminution de l'expression d'ATG5. Il serait judicieux de réitérer ces expériences en ciblant d'autres protéines impliquées dans la cascade d'induction de l'autophagie comme ATG7 ou ATG12. Nous pourrions également infecter les cellules EBV-B avec une combinaison de lentivirus codant pour des shRNA ciblant ATG5 et ATG7 ou ATG12 afin d'améliorer l'inhibition de l'autophagie dans les cellules EBV-B (364).

Ainsi, l'ensemble de nos résultats nous permet de conclure que l'induction de l'autophagie est impliquée dans la présentation croisée vacuolaire de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV. Bien que Dasari et al., aient démontré un rôle de l'autophagie dans la présentation croisée effectuée par les cellules EBV-B humaines, la voie de présentation décrite est indépendante de TAP, mais dépend du protéasome (364). Selon nos connaissances, les résultats présentés dans le **Chapitre 2** sont la première démonstration du rôle de l'autophagie dans la voie de présentation d'Ag croisée vacuolaire par CMH-I dans les lymphocytes B.

La présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV par les lymphocytes B : modèle proposé

Bien que le lien direct entre l'autophagie et l'apprêtement de la VLP de PapMV ainsi que le mécanisme précis n'aient pas été clairement caractérisé, nos résultats démontrent que l'induction de l'autophagie est nécessaire à la présentation croisée par CMH-I de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV selon une voie vacuolaire indépendante du protéasome (362) et de TAP. Comme discuté dans les sections précédentes, il est probable qu'il y ait un lien entre la stimulation

des TLR-7/8 et l'induction de l'autophagie afin de promouvoir la dégradation de la VLP et la présentation croisée par CMH-I.

Par ailleurs, une forme d'autophagie non canonique dans laquelle les protéines ATG régulent une variante de la phagocytose appelée phagocytose associée à LC3 (*LC3-associated phagocytosis*, LAP) a été décrite. La LAP couple directement la stimulation des TLR (TLR-1/2, TLR-2/6 et TLR-4), la phagocytose, l'autophagie et la présentation des Ag. La LAP requiert également la production de ROS au niveau de la membrane du phagosome par le recrutement du complexe NOX2 qui s'associe à la membrane du phagosome (589). Dans nos travaux, ce processus peut être exclu pour expliquer l'internalisation de la VLP et l'induction de l'autophagie, car l'inhibition de l'induction de l'autophagie par le 3-MA ou la déficience en ATG5 n'ont pas d'impact significatif sur l'entrée de la VLP de PapMV dans les cellules EBV-B (**Figures 12A et 13B**). De plus, il a été démontré que l'activation des TLR-7 et/ou TLR-8 induit le recrutement de NOX2 au niveau de la membrane des phagosomes dans les Mϕ et les neutrophiles (590-592). Les ROS facilitent la dégradation des agents infectieux, mais ils permettent également d'alcaliniser le pH des phagosomes. Les anions superoxyde ($O_2^{-\bullet}$) produits par NOX2 dans la lumière du phagosome se dismutent et génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'autres ROS. Cette réaction consomme une quantité importante de protons (H^+) ayant été importés par l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) et d'autres transporteurs insérés dans la membrane du phagosome. La diminution de la concentration de protons conduit à l'alcalinisation du pH du phagosome ce qui limite l'activité des hydrolases acides et favorise la présentation croisée des Ag (357, 593, 594). Dans notre modèle, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'engagement des TLR-7/8 endosomaux par la VLP de PapMV mène au recrutement du complexe NOX2.

Nous proposons qu'à la suite de l'internalisation de la VLP de PapMV par les lymphocytes B, l'engagement des TLR-7/8 par la VLP dans les endosomes conduit à l'induction de l'autophagie. L'autophagie favorise le transport de la VLP dans les compartiments vacuolaires riches protéases et conduit au recrutement d'autres TLR-7/8. Dans ce compartiment, la cathepsine S participe à la fois à la dégradation de la VLP et à la maturation des TLR. L'ARN de la VLP active les TLR-7/8 ce qui induit fortement l'autophagie selon une boucle de rétroaction positive qui favoriserait ainsi la dégradation de la VLP. De plus, l'autophagie et les TLR pourraient

mener au recrutement de NOX2 au niveau de la membrane vacuolaire contenant la VLP de PapMV afin de maintenir un pH optimal et faciliter la présentation croisée de l'épitope. Enfin, les peptides pourraient être chargés sur les CMH-I directement dans le compartiment vacuolaire. Les CMH-I pourraient provenir du RE ou des endosomes de recyclage. Les différentes évidences et hypothèses associées à la présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV sont illustrées dans la **Figure 28**.

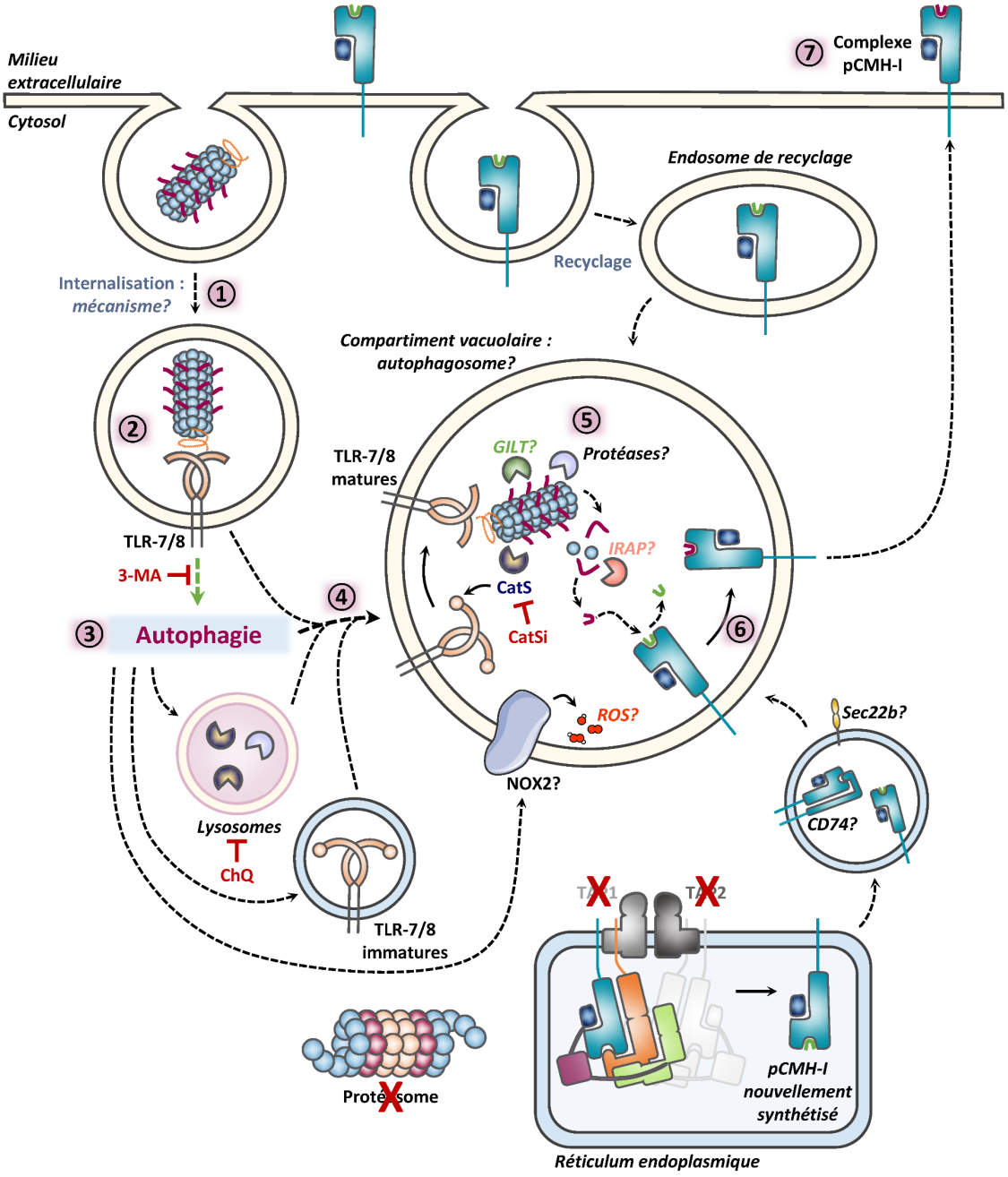


Figure 28. – Présentation croisée vacuolaire de la VLP de PapMV par les lymphocytes B : modèle proposé

①La VLP de PapMV est internalisée dans les endosomes. ②L'ARN de la VLP est reconnu par les TLR-7/8. ③L'engagement des TLR-7/8 induit l'autophagie. ④L'autophagie conduit à la localisation de la VLP dans un compartiment vacuolaire riche en protéases par la fusion avec les lysosomes et pourrait mener au recrutement d'autres TLR-7/8 et de NOX2 qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS). ⑤La cathepsine S (**CatS**) participe à la fois à la maturation des TLR-7/8 et à l'apprêtement de la VLP pour libérer les épitopes. **GILT** et **IRAP** pourraient aussi être

impliqués. ⑥Les peptides sont chargés sur les CMH-I dans le compartiment vacuolaire. Les CMH-I pourraient provenir du RE ou des endosomes de recyclage. ⑦Les peptides sont présentés à la surface du lymphocyte B. **X** : la voie de présentation croisée de la VLP de PapMV est indépendante du protéasome et de TAP. L'inhibition de la cathepsine S (**CatSi**), de l'acidification des lysosomes (chloroquine, **ChQ**) et de l'autophagie (3-methyladénine, **3-MA**) altère la présentation croisée de l'épitope inséré dans la VLP de PapMV.

Les lymphocytes B stimulés *in vitro* par le CD40, l'IL-4 ou la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 sont des APC efficaces

La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules CD40-B

Mise en contexte

Les lymphocytes B primaires humains constituent une source alternative d'APC qui présentent un fort potentiel biotechnologique que ce soit pour des applications de recherches fondamentales ou cliniques. De nombreux protocoles sont utilisés pour cultiver les lymphocytes B (291, 595, 596). Parmi ceux-ci, la méthode mise au point par Banchereau et al. (186, 281), repose sur l'activation *ex vivo* des lymphocytes B par l'engagement du récepteur CD40 par le CD40L recombinant ou un Ab monoclonal agoniste, et la stimulation avec l'IL-4. Ces travaux fondamentaux ont permis l'étude de la biologie des lymphocytes B et ont mené à une meilleure compréhension des interactions entre les lymphocytes B et T qui sont centrales à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Cette méthode constitue un moyen efficace pour induire la fonction de présentation d'Ag des lymphocytes B (283, 284, 286) et leur prolifération, mais leur expansion extensive requiert au moins deux semaines de culture (285, 302).

Afin d'améliorer la prolifération des cellules tout en induisant leur fonction de présentation d'Ag, nous avons évalué l'impact de la stimulation des lymphocytes B avec le CD40L (cellules CD40-B) et l'IL-21, au lieu de l'IL-4, ou en combinaison avec cette dernière. Nous avons porté notre attention sur l'IL-21, car cette cytokine sécrétée par les lymphocytes $CD4^+$ T_{FH} est essentielle au déroulement de la réponse immunitaire des lymphocytes B *in vivo* (52, 77, 166, 167) et elle induit leur forte prolifération *in vitro* (188, 198-200, 204, 205). Nous avons émis l'hypothèse que la stimulation des lymphocytes B humains périphériques avec le CD40L et la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 permettra de mimer plus précisément les signaux fournis par les lymphocytes $CD4^+$ T_{FH} *in vivo* ce qui conduira à la génération de cellules CD40-B très prolifératives qui seront des APC efficaces. Selon nos connaissances, aucune étude n'a évalué l'utilisation de l'IL-21 au lieu de l'IL-4, ou la combinaison des deux cytokines pour générer un grand nombre d'APC efficaces.

Retour sur les résultats

Les travaux présentés dans le **Chapitre 3** ont tout d'abord démontré que la stimulation des cellules CD40-B avec IL-21 seule (IL-21-CD40-B) ou en combinaison avec l'IL-4 (Combo-CD40-B) permet d'augmenter significativement leur prolifération comparativement aux cellules CD40-B activées avec l'IL-4 (IL-4-CD40-B) (**Figure 16**). La caractérisation phénotypique des populations de lymphocytes B générées par la culture *in vitro*, nous a permis d'observer que la stimulation des cellules CD40-B avec l'IL-21 seule conduit à leur différenciation progressive en plasmocytes (PC) sécrétant des Ab alors que les cellules Combo-CD40-B ont une plus faible propension à se différencier en PC (**Figures 16 et 17**). Les cellules IL-4- et Combo-CD40-B sont des cellules activées qui expriment des molécules impliquées dans la migration dans les SLO (**Figure 18**). De plus, elles sécrètent des chimiokines et cytokines qui pourraient induire le recrutement des lymphocytes T et moduler leurs réponses (**Figure 19**). Comparativement aux cellules IL-21-CD40-B, les cellules IL-4- et Combo-CD40-B expriment de multiples molécules de costimulation, mais pas de molécules de co-inhibition, ce qui suggère qu'elles possèdent des fonctions de présentation d'Ag aux lymphocytes T efficaces (**Figure 20**). Enfin, les essais de reconnaissance *in vitro* ont mis en évidence que les cellules Combo-CD40-B sont des APC aussi efficaces que les cellules IL-4-CD40-B et les MoDC pour activer les lymphocytes T $CD8^+$ (**Figure 21**).

Ces travaux ont permis d'approfondir notre compréhension de la biologie des cellules CD40-B humaines. Selon nos connaissances, ils constituent la première démonstration que l'activation *in vitro* des lymphocytes B avec le CD40L, l'IL 4 et l'IL 21 génère, en moins de deux semaines, un grand nombre de cellules hautement prolifératives ayant des fonctions de présentation d'Ag efficaces. Dans les prochaines sections, je critiquerai les méthodes utilisées et les résultats obtenus puis je proposerai des expériences pour approfondir les résultats présentés.

Critique des méthodes utilisées

Les limitations de la technique de cytométrie en flux

Dans ces travaux, les lymphocytes B humains ont été cultivés *in vitro* pendant douze jours et leurs phénotypes ont été analysés tous les trois jours par cytométrie en flux avec un analyseur BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). Cette technique présente toutefois des limitations. Le

cytomètre utilisé permet seulement l'analyse simultanée d'un maximum de 15 paramètres. En conséquence, les cellules CD40-B ont été divisées en trois tubes afin 1) d'analyser les phénotypes/sous-populations de lymphocytes B (**Figures 16 et 17**), 2) d'analyser l'expression des molécules modulées par l'activation et des molécules impliquées dans la migration au sein des SLO (**Figure 18**) et 3) d'analyser les molécules de costimulation et de co-inhibition (**Figure 20**). Cette stratégie nous a offert la possibilité de mesurer un nombre élevé de paramètres différents, mais elle n'a pas permis d'étudier simultanément l'expression de l'ensemble des marqueurs comme les ligands de costimulation, sur une sous-population spécifique de cellules CD40-B. Ceci constitue une limitation de notre étude, car les paramètres mesurés en 2) et 3) représentent leur expression globale par la population cellulaire totale alors que nous avons démontré que les cellules CD40-B sont une population hétérogène, quelle que soit la stimulation utilisée.

Pour contrer cette limitation, nous pourrions réitérer la cinétique de caractérisation en utilisant des cytomètres de nouvelle génération comme les analyseurs BD FACSymphony™ capables d'analyser simultanément de 30 à 50 paramètres (597, 598). En outre, ces instruments possèdent des lasers plus puissants et offrent la possibilité d'utiliser des Ab couplés à des fluorochromes de nouvelle génération, ce qui permet une analyse avec meilleure résolution se traduisant par une caractérisation phénotypique plus précise. De façon similaire, la cytométrie de masse (CyTOF) jumelant la cytométrie et l'analyse par spectrométrie de masse permettait d'évaluer l'expression jusqu'à une centaine de paramètres simultanément en utilisant des Ab couplés à des métaux lourds (599, 600). Il serait également possible de combiner la caractérisation du phénotype avec des Ab reconnaissants des protéines de surfaces (jusqu'à 30 paramètres simultanément) avec le séquençage de l'ARNm sur les mêmes cellules uniques (*single cell RNA-seq*) grâce à l'analyse par BD® AbSeq Assay couplé au système d'analyse de cellule unique BD Rhapsody™ (BD® Biosciences) (600). Ainsi, l'analyse des cellules par ces nouvelles technologies permettrait d'approfondir et de raffiner la caractérisation phénotypique des cellules CD40-B en évaluant l'ensemble des marqueurs sur une même population cellulaire.

Les limitations de la stratégie d'analyse des données de cytométrie en flux

L'analyse des données de cytométrie en flux a été effectuée en suivant des stratégies d'identification des populations cellulaires fondées sur celles décrites dans la littérature (601,

602). Parmi les nomenclatures, nous avons utilisé la classification *B mature* (Bm) qui définit les sous-populations de lymphocyte B d'après leur expression des marqueurs de surface IgD et CD38 (601, 602) (**Figure 16**). Toutefois, les classifications IgD vs CD27 (603) ou CD24 vs CD38 pourraient être utilisées pour définir les phénotypes des lymphocytes B (601). Par ailleurs, l'étude des molécules modulées par l'activation, impliquées dans la migration et des ligands de costimulation/co-inhibition a été effectuée en analysant leur expression de façon individuelle. Bien qu'informatives, ces stratégies d'analyse fournissent seulement une information limitée.

Afin d'analyser simultanément l'expression de l'ensemble des molécules, nous pourrions avoir recours à des stratégies d'analyse non dirigées et non biaisées. Parmi celles-ci, les techniques de réduction de dimension non linéaire comme les algorithmes t-SNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) et UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) sont fréquemment utilisées (604) (**Figure 29**). Ces méthodes d'analyse non biaisées offrent également l'opportunité d'évaluer l'expression de marqueurs peu définis qui auraient pu être ignorés lors d'une analyse dirigée (CD11b, CD43…). En outre, l'analyse des données obtenues grâce aux nouvelles techniques de cytométrie citées précédemment repose sur ces algorithmes.

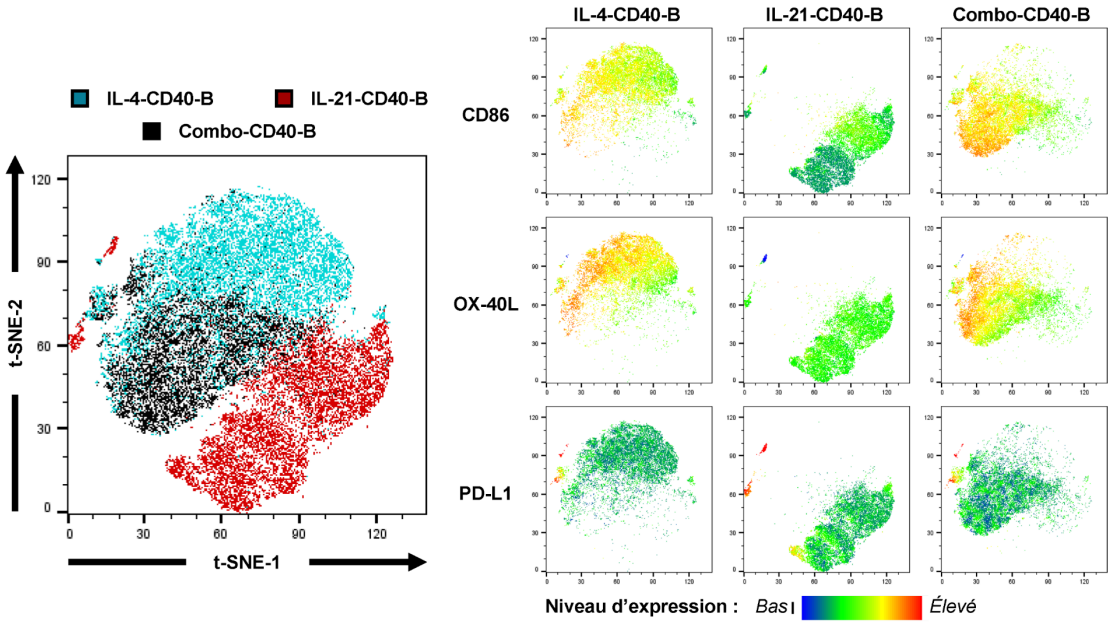


Figure 29. – Exemple d'analyse par t-SNE

Les cellules CD40-B d'un donneur sain représentatif ont été analysées après 9 jours de culture. Parmi l'ensemble des molécules de surface analysées, seulement trois sont représentées.

Critiques des résultats et perspectives

La prolifération des cellules CD40-B

La possibilité d'amplifier *in vitro* les lymphocytes B isolés du sang périphérique constitue un atout majeur en faveur de l'utilisation de ces cellules comme source alternative d'APC comparativement aux DC. Banchereau et al., ont été les premiers à démontrer que les lymphocytes B pouvaient être amplifiés *in vitro* par l'engagement du CD40 et la stimulation par l'IL-4 (186, 281). Depuis, de nombreux variants de ce protocole ont été développé que ce soit au niveau de la source de CD40L ou des cytokines utilisées (291, 595). Dans nos travaux, l'expansion des lymphocytes B est réalisée par leur stimulation avec une forme recombinante trimérique du CD40L (605) et les cytokines IL-4 ou IL-21 ou la combinaison des deux. Conformément à la littérature décrivant l'IL-21 comme une cytokine induisant une prolifération massive des lymphocytes B tant humains que murins (188, 198, 199, 204, 205, 606), nos résultats ont mis en évidence que la stimulation avec l'IL-21 ou le Combo permet d'induire une prolifération supérieure à celle induite par l'IL-4 (**Figure 16B-C**). Récemment, Robinson et al., ont démontré que la combination de l'IL-4 et de l'IL-21 augmente la division cellulaire des cellules CD40-B murines (165). Su et al., rapportent également que la stimulation des cellules CD40-B humaines avec l'IL-21 ou la combinaison IL-4/IL-21 induit leur expansion robuste, mesurée après 8 jours de culture, comparativement à leur stimulation l'IL-4 (287). En outre, ils démontrent aussi que la co-culture des lymphocytes B pendant 16 jours avec une lignée cellulaire stromale exprimant le CD40L, et les cytokines IL-2, IL-4, IL-21 et BAFF permet leur expansion significative (287).

Nous avons dénombré les cellules CD40-B pour évaluer leur expansion (**Figure 30**). L'expansion des cellules IL-21-CD40-B semble ralentir puis plafonner après 6 jours de culture tandis que les cellules Combo-CD40-B maintiennent une croissance importante (**Figure 30A**). La caractérisation phénotypique des cellules a mis en évidence qu'après 6 jours de culture, la stimulation des cellules CD40-B avec l'IL-21 génère des plasmablastes ($CD27^{high}CD38^{high}$) qui se différencient de façon terminale en PC $CD138^{+}$ matures (**Figure 17**). Puisque les PC $CD138^{+}$ matures perdent leur capacité à se diviser (607, 608), nous supposons que la différenciation progressive des cellules IL-21-CD40-B en PC matures entraîne un arrêt de la prolifération qui se traduit par le plateau observé. Les cellules IL-4-CD40-B présentent quant à elles une faible

expansion, mais nos résultats semblent suggérer une augmentation de l'expansion des cellules IL-4-CD40-B à partir du jour 9 (**Figure 30**). Bien que certaines études rapportent une expansion plus importante des cellules CD40-B stimulées avec l'IL-4 (285, 609), leur croissance exponentielle semble s'effectuer après 10 à 14 jours de culture (285, 302). Ces divergences pourraient provenir de conditions expérimentales différentes, notamment au niveau de la source de CD40L. Nous utilisons une forme recombinante trimérique du CD40L (605) tandis que certaines études co-cultivent les lymphocytes B humains avec des lignées cellulaires murines modifiées génétiquement pour exprimer le CD40L comme la lignée de fibroblastes murins NIH/3T3 (282, 285, 609, 610).

Lors de nos expériences, les PBMC ont été obtenus à partir d'environ 90 mL de sang périphérique puis les lymphocytes B ont été isolés. Après 12 jours de culture *in vitro*, le nombre total de cellules CD40-B obtenu varie selon le donneur et la condition de stimulation; la culture des lymphocytes B avec le CD40L et le Combo ayant permis d'obtenir jusqu'à plusieurs dizaines de millions de cellules (**Figure 30B**). Dans un contexte d'utilisation biotechnologique comme la vaccination, l'obtention d'un nombre important de cellules est requise. Les patients traités avec des vaccins cellulaires formulés à partir de DC reçoivent plusieurs millions de cellules dont le nombre varie selon les études. Dans le cas du Sipuleucel-T, les patients reçoivent trois infusions intraveineuses contenant au moins 40 millions de cellules (485). Dans une étude de phase II, des patients atteints d'un mélanome avancé ont reçu un traitement avec l'Ipilimumab en combinaison avec une injection intraveineuse et une injection intradermique constituées respectivement de 20 et 4 millions de MoDC autologues électroporées avec des ARNm codant pour des Ag tumoraux (611). Une étude de phase III a quant à elle évalué la combinaison de la chimiothérapie et d'une injection intradermique de 2.5 millions de DC autologues chargées avec un lysat tumoral pour le traitement de patients atteints d'un glioblastome (612). Concernant les vaccins formulés à partir de lymphocytes B, une étude a évalué le traitement de chiens atteints d'un lymphome non hodgkinien avec un vaccin constitué de 1 à 5 millions de cellules IL-4-CD40-B autologues électroporées avec des ARNm codants pour des Ag tumoraux (489). Bien que la stimulation des lymphocytes B avec le CD40L et le Combo semble générer un nombre de cellules suffisant pour réaliser une injection contenant plusieurs millions de cellules, il pourrait être

envisageable de prolonger l'expansion des cellules CD40-B au-delà de 12 jours si le nombre d'APC requis pour l'utilisation n'est pas atteint. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre leur culture, par exemple jusqu'au jour 24, afin d'évaluer si les cellules IL-4- et Combo-CD40-B maintiennent leur prolifération.

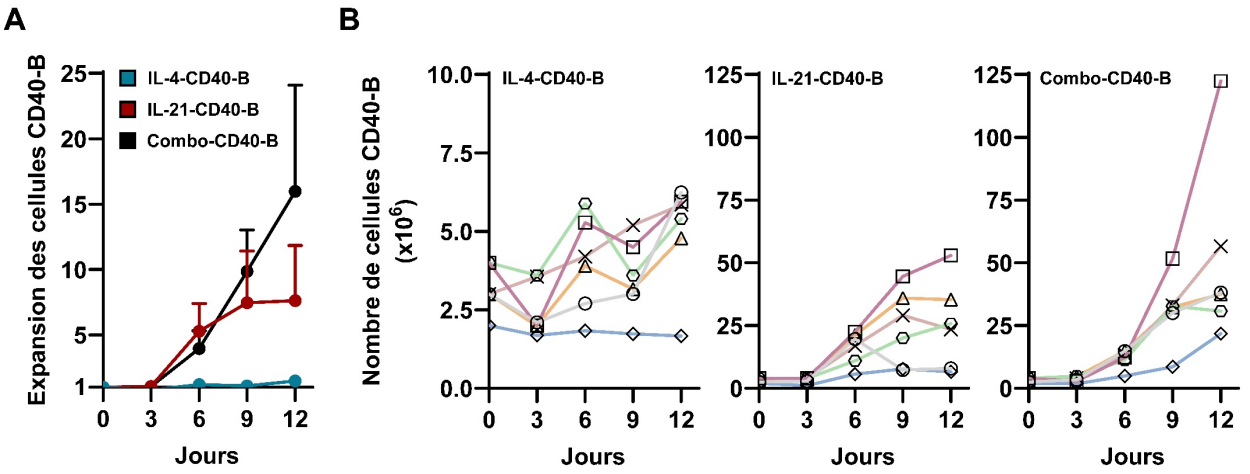


Figure 30. – Expansion des cellules CD40-B

Les lymphocytes B ont été cultivés comme illustré dans la **Figure 16**. Les cellules ont été diluées avec une solution de Bleu Trypan 0.4% puis les cellules vivantes ont été dénombrées à l'aide d'un hématimètre. **A** L'expansion des cellules CD40-B est représentée sous la forme du ratio du nombre de cellules comptées et le nombre de lymphocytes B au jour 0. Les résultats représentent la moyenne (*standard deviation,* SD) de 6 donneurs indépendants. **B** Le nombre total de cellules CD40-B cultivées selon la condition indiquée est représenté. Chaque symbole/couleur représente un donneur indépendant identique pour chaque graphique (n = 6).

La caractérisation phénotypique des cellules CD40-B

Nos résultats ont mis en évidence que la stimulation des cellules CD40-B avec l'IL-4, l'IL-21 ou le Combo induit des phénotypes distincts. Tandis que l'IL-4 a peu d'impact sur les phénotypes des lymphocytes B, l'IL-21 ou le Combo induisent l'acquisition graduelle de phénotypes caractéristiques de cellules matures (**Figures 16D-E et 17**). La présence de l'IL-21 dans le milieu de culture induit la commutation de classe isotypique des cellules $CD27^+$ mémoires et mène à la différenciation des cellules CD40-B en plasmablastes puis en PC $CD138^+$ matures qui sécrètent des IgM, IgG et IgA (**Figure 17**). La stimulation par le Combo est quant à elle moins encline à induire la différenciation PC ce qui suggère que l'IL-4 module les signaux de différenciation de l'IL-21. Nos résultats concordent avec la littérature publiée qui rapporte que l'engagement du

CD40 et la stimulation avec l'IL-21 ou l'IL-4 régulent la production d'Ig et la commutation de classe isotypique (180-182, 195, 198, 206). Chez l'Homme, IL-21 promeut la sécrétion d'IgM et la commutation de classe vers les isotypes IgG1/IgG3 et IgA1 tandis qu'elle constitue un régulateur négatif des réponses IgE (197-202) contrairement à l'IL-4 qui induit l'IgG4 et l'IgE (183, 184).

Récemment, Franke et al., ont rapporté que la stimulation des PBMC humaines avec un Ab anti-CD40 (αCD40) et l'IL-4 n'induit pas la sécrétion des différents isotypes d'Ig par les lymphocytes B alors que l'activation avec l'αCD40, l'IL-4 et l'IL-21 mène à la génération de cellules qui produisent des IgG, IgE et IgA et une faible quantité d'IgM (613). De façon surprenante, les auteurs n'ont pas évalué la production d'Ig en stimulant les cellules avec l'αCD40 et l'IL-21 (613). Bien que nous ayons observé une induction de la sécrétion des IgM, IgG et IgA par les cellules Combo-CD40-B, la stimulation avec le CD40L et l'IL-21 seule induit une sécrétion des Ig significativement plus importantes (**Figure 17E**). Par ailleurs, Su et al., ont démontré que les lymphocytes B co-cultivés avec une lignée cellulaire exprimant le CD40L et stimulés avec l'IL-2, l'IL-4, l'IL-21 et BAFF se différencient peu jusqu'au jour 12, mais présentent une différenciation abrupte en PC $CD27^{high}CD38^{high}CD138^{+}$ aux jours 14-16 (287). Il serait ainsi judicieux de poursuivre la caractérisation phénotypique des cellules CD40-B pour évaluer si une différenciation similaire des cellules Combo-CD40-B se produit au-delà de 12 jours de culture. Enfin, l'IL-4 étant une cytokine qui induit la sécrétion d'IgE (183, 184), il serait intéressant d'évaluer par dosage ELISA si cette Ig est produite dans les surnageants de culture. L'identification des sous-classes d'IgG et IgA, ainsi que la quantification des Ig produits tout au long de la culture permettrait d'approfondir nos résultats de caractérisation et de présenter une cinétique d'induction des Ab.

Les phénotypes et les destins cellulaires des lymphocytes B sont finement régulés par de multiples facteurs de transcription tels que BCL-6, c-MYC, BLIMP-1, IRF-4, XBP-1. Leurs expressions sont régulées par les signaux de stimulation comme le CD40 et les cytokines (93, 121). L'IL-21 régule la réaction du GC en maintenant l'expression de BCL-6 (194, 213-215), mais elle induit également BLIMP-1, qui inhibe BCL-6 et mène à la différenciation des cellules B en PC *in vitro* et *in vivo* (195, 196, 198, 204, 217, 606, 614). Récemment, Robinson et al., ont démontré que la combinaison de l'IL-21 et de l'IL-4 induit BCL-6 dans les cellules CD40-B murines(165). De façon similaire, Chevrier et al., ont rapporté que l'IL-4 et l'IL-21 coopèrent pour induire une forte

expression protéique de BCL-6 dans les cellules CD40-B murines spléniques (164). Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse que la stimulation par le Combo mène à la forte expression de BCL-6 par les lymphocytes B ce qui les maintient dans état prolifératif similaire à celui des cellules B de la zone sombre dans le GC, et atténue ou retarde l'induction du programme transcriptionnel menant à la différenciation en PC. Afin de tester cette hypothèse, l'étude de la cinétique d'expression des multiples facteurs de transcription (93, 121) pourrait être effectuée en réalisant une caractérisation multiomique sur cellule unique grâce aux technologies 10x Chromium (10X Genomics) ou BD® AbSeq Assay couplé au système d'analyse de cellule unique BD Rhapsody™ (BD® Biosciences) (600). Ces plateformes jumellent la caractérisation du phénotype avec des Ab reconnaissants des protéines de surfaces avec le séquençage de l'ARNm sur les mêmes cellules uniques (*single cell RNA-seq*). Les résultats obtenus mettront en évidence les évènements régulant la biologie de chaque sous-population de cellules CD40-B. Ils permettront également d'offrir des pistes recherche afin d'optimiser les protocoles de culture visant soit à amplifier les lymphocytes B et induire leur fonction de présentation d'Ag ou générer des cellules sécrétrices d'Ab selon l'utilisation biotechnologique souhaitée.

La migration des cellules CD40-B

Pour servir de plateforme vaccinale efficace, les cellules CD40-B doivent atteindre les SLO pour présenter les Ag aux lymphocytes T et induire leurs réponses. Nos résultats ont démontré que les différents groupes de cellules CD40-B expriment différentiellement des molécules impliquées dans la migration dans les SLO comme la molécule d'adhérence CD62L et les récepteurs de chimiokines CCR7, CXCR4 et CXCR5 comparativement aux MoDC qui expriment seulement le récepteur CCR7. La forte expression des molécules CD62L et CXCR5 suggèrent que les cellules Combo-CD40-B activées pendant 9 jours pourraient présenter une plus forte propension à migrer dans les SLO comparativement aux cellules IL-4-CD40-B (**Figure 18**). Nos résultats sont similaires à ceux publiés par l'équipe de von Bergwelt-Baildon qui rapportent une modulation semblable des profils d'expression des molécules CD62L, CCR7, CXCR4 et CXCR5 pour les cellules IL-4-CD40-B humaines et murines (301-303, 615, 616). Leurs travaux ont démontré que ces molécules facilitent la chimiotaxie des cellules CD40-B humaines et murines vers leurs ligands respectifs *in vitro* (302, 303, 615), ainsi que la migration *in vivo* des cellules CD40-B

murines au sein des SLO (301, 615, 616). Gonzalez et al., ont rapporté que 12 heures après l'injection intraveineuse, les cellules CD40-B GFP$^+$ sont retrouvées majoritairement dans la zone B de la pulpe blanche de la rate, au niveau de l'interface entre les zones T et B ainsi qu'un faible pourcentage dans la zone T. Leur nombre au niveau de l'interface des zones B et T et dans la zone T augmente après 5 jours. En outre, la vaccination avec les cellules CD40-B chargées avec un peptide se révèle être efficace pour induire la réponse cellulaire des CTL et la lyse des cellules tumorales (615). Selon nos résultats, nous postulons que les cellules Combo-CD40-B ont une capacité de migration dans les SLO supérieure à celle des cellules IL-4-CD40-B.

Afin de tester cette hypothèse, des essais de migration *in vitro* de type *transwell* pourraient être réalisés afin d'évaluer la migration des cellules CD40-B en réponse à des gradients de concentration des chimiokines CXCL12 (CXCR4), CCL19 ou CCL21 (CCR7) ou CXCL13 (CXCR5) (302, 303, 615) (**Figure 31A**). Pour étudier la migration *in vivo* des cellules IL-4- et Combo-CD40-B, nous pourrions avoir recours à un modèle murin possédant un système immunitaire humain tel que les souris humanisées par le transfert adoptif de cellules souches du sang de cordon CD34$^+$. La lignée de souris immunodéficientes *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient* (NOD/SCID) possédant une mutation nulle du gène codant pour la chaîne γ_c est une des lignées dans laquelle le transfert adoptif de cellules souches du sang de cordon CD34$^+$ est possible (617). Ce modèle disponible commercialement permettra d'isoler des lymphocytes B et des monocytes humains à partir du sang périphérique de souris et de générer respectivement des cellules CD40-B et des MoDC. Les cellules seront marquées avec un marqueur fluorescent puis transférées dans les souris possédant un système immunitaire autologue par injection intraveineuse. Après 24 heures et 5 jours, les souris seront sacrifiées afin de collecter le sang périphérique, la rate et les ganglions lymphatiques (GL) puis la migration des cellules CD40-B et des MoDC fluorescentes dans les SLO sera évaluée par cytométrie en flux (618). Des coupes histologiques des SLO seront également analysées par microscopie confocale à immunofluorescence afin d'identifier précisément le positionnement des cellules CD40-B dans ces tissus. Cette stratégie est illustrée dans la **Figure 31B.** Les expériences proposées permettront ainsi d'étudier les capacités migratoires des cellules CD40-B *in vitro* et *in vivo* et d'encourager leur utilisation comme source alternative d'APC dans une stratégie de vaccination.

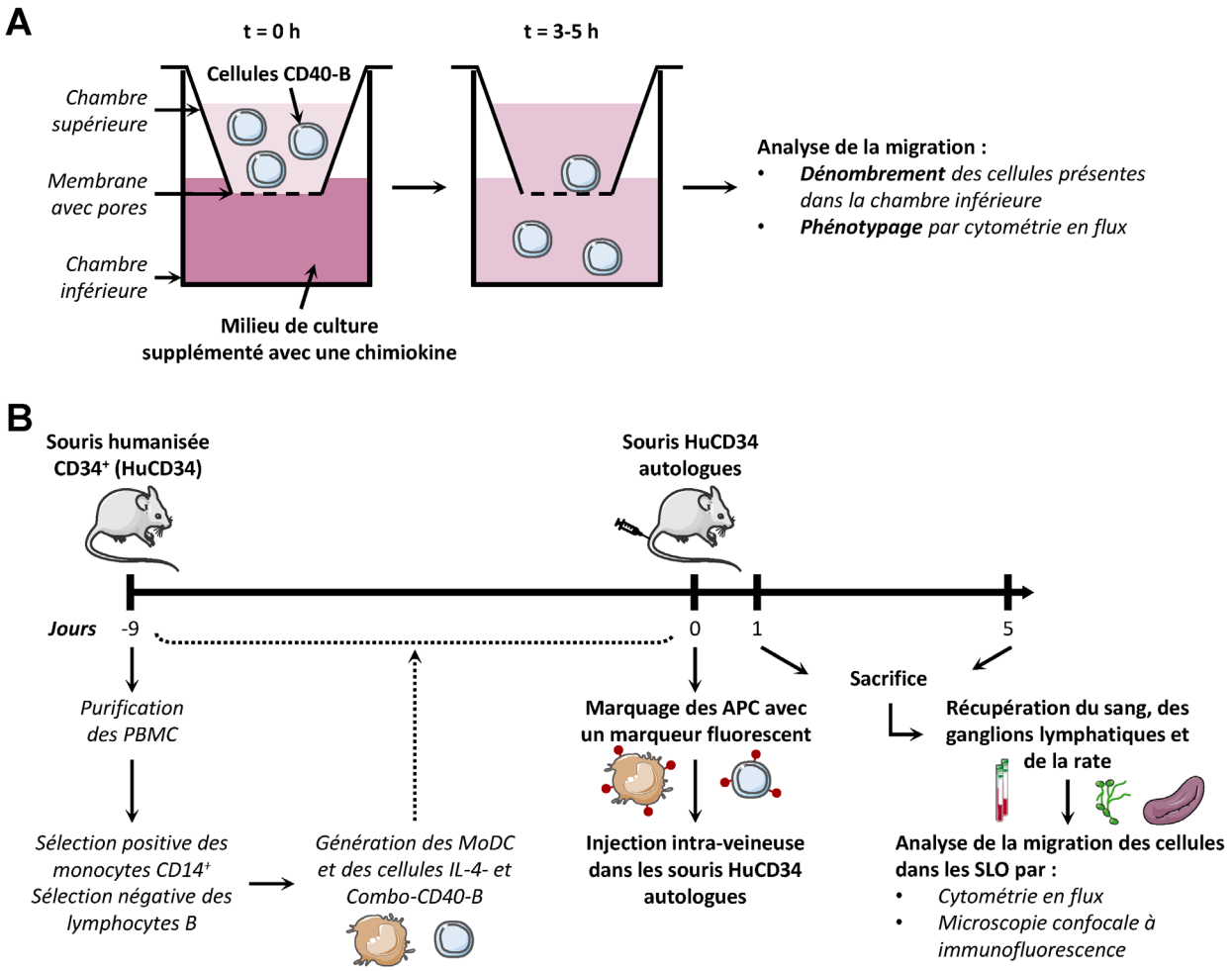


Figure 31. – Étude de la migration des cellules CD40-B *in vitro* et *in vivo* : modèles proposés

A Les MoDC et les cellules IL-4- et Combo-CD40-B seront cultivées pendant 9 jours puis placées dans les chambres supérieures de puits séparés en deux sections par une membrane perméable arborant des pores de 5 µm (*transwell plate*). Les chambres inférieures renfermeront quant à elles un milieu de culture supplémenté avec des concentrations croissantes de la chimiokine CXCL12 (CXCR4), CCL19 ou CCL21 (CCR7) ou CXCL13 (CXCR5). Après une incubation de quelques heures, la migration des cellules dans la chambre inférieure sera évaluée en dénombrant les cellules présentes. Le phénotype des cellules CD40-B ayant migrées sera déterminé par cytométrie en flux. **B** Les MoDC et les cellules IL-4- et Combo-CD40-B seront générées pendant 9 jours à partir des PBMC isolés de souris humanisées par le transfert adoptif de cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ (HuCD34). Les APC seront marquées avec un marqueur fluorescent puis injectées par voie intraveineuse dans des souris HuCD34 autologues. Après 24 heures et 5 jours, les souris seront sacrifiées afin de collecter le sang périphérique, la rate et les GL puis la migration des APC fluorescentes dans les SLO sera évaluée par cytométrie en flux et microscopie confocale à immunofluorescence afin d'identifier précisément le positionnement des APC dans ces tissus.

La sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules CD40-B

La sécrétion de cytokines et de chimiokines constitue une fonction alternative importante des lymphocytes B par laquelle ils modulent les réponses immunitaires (241, 242). Nos travaux ont démontré que les cellules IL-4- et Combo-CD40-B présentent un sécrétome similaire caractérisé par la production de chimiokines et de cytokines de type T_H1 (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2 et IL-12p70) et T_H2 (IL-6, IL-10 et IL-13) (**Figure 19**). L'étude du transcriptome des cellules IL-4-CD40-B humaines après 14 jours de stimulation a révélé que ces cellules expriment les transcrits de nombreuses chimiokines dont CCL17, CCL5, CCL22 et CXCL10 (303). Leurs expressions dans les surnageants sont également détectées après 4 jours de stimulation (619). De plus, les surnageants de culture des cellules IL-4-CD40-B induisent la migration des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ *in vitro* (303). Les travaux fondamentaux de Harris et al., ont également démontré que les lymphocytes B peuvent acquérir une polarisation de type B effecteur (Be)1 ou Be2 et sécréter respectivement des cytokines de type T_H1 et T_H2 qui influencent les réponses des lymphocytes T effecteurs (261, 262). Récemment, une étude a rapporté que des lymphocytes B murins isolés de la rate et stimulés pendant 3 jours avec BAFF biaise leur polarisation vers le phénotype Be1 caractérisé par la sécrétion d'IL-12 (620). Chez l'Homme, les lymphocytes B humains présents dans les GL drainant les tumeurs mammaires sécrètent de multiples cytokines telles que le TNF-α, l'IL-10, le TGF-β, l'IL-2 et l'IFN-γ (621). De plus, les lymphocytes B infiltrant les tumeurs mammaires sécrètent majoritairement des cytokines de type T_H1 (IFN-γ et TNF-α) qui pourraient supporter la réponse de type T_H1 des lymphocytes T (622).

Afin d'approfondir la caractérisation du sécrétome des cellules CD40-B, il serait intéressant d'évaluer par dosage multiplex la production d'un nombre plus important de chimiokines et de cytokines dans le surnageant. Le sécrétome des MoDC sera aussi analysé. Nos résultats ne permettent pas de conclure si les cytokines T_H1 et T_H2, sont sécrétées par les mêmes cellules ou par des sous-populations de cellules CD40-B distinctes de type Be1 ou Be2. Pour répondre à cette question, il serait possible d'avoir recours à une analyse par BD® AbSeq Assay couplé au système d'analyse de cellule unique BD Rhapsody™ (BD® Biosciences) (600). Cette plateforme permettra de déterminer simultanément le phénotype des cellules CD40-B et d'évaluer l'expression des transcrits de nombreuses cytokines et chimiokines.

Selon nos résultats, nous postulons que les cellules Combo-CD40-B auraient une plus grande capacité à induire la migration des lymphocytes T que les cellules IL-4-CD40-B. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser des essais de migration *in vitro* de type *transwell* (303) afin d'évaluer l'induction de la migration des lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ purifiés vers la chambre inférieure du puits qui renfermera un surnageant de cultures des cellules IL-4-, IL-21-, Combo-CD40-B cultivées à différents jours ou des MoDC. Il est également probable que les cytokines sécrétées par les cellules CD40-B puissent moduler les réponses des lymphocytes T et notamment polariser leur différenciation. Pour éprouver cette hypothèse, la culture des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ purifiés et activés par une stimulation polyclonale (αCD3 et αCD28) sera réalisée en présence des surnageants des cellules CD40-B récoltés à différents jours ou des surnageants de la culture de MoDC (623). La polarisation des lymphocytes T sera évaluée après 7 jours en mesurant par cytométrie en flux et qPCR l'expression de facteurs de transcription et des cytokines caractéristiques des différents sous-types de lymphocytes T.

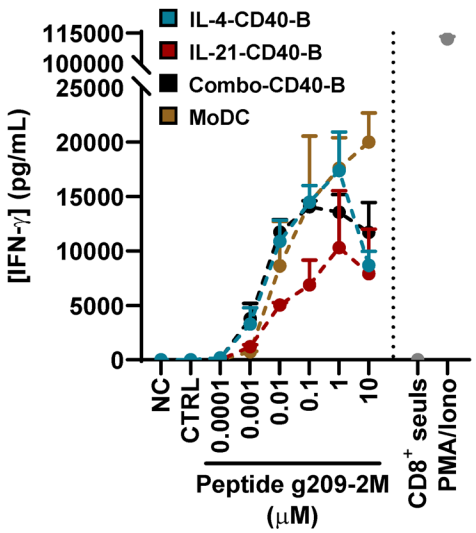
La présentation d'antigènes et l'activation des lymphocytes T

Selon nos connaissances, nos travaux sont les premiers à présenter une caractérisation phénotypique et fonctionnelle des fonctions de présentation d'Ag des lymphocytes B humains stimulés avec le CD40L et l'IL-21 ou la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 au lieu de la stimulation standard avec le CD40L et l'IL-4. Comparativement à la plupart des études réalisées jusqu'à ce jour qui mesurent seulement l'expression des molécules CD80, CD86 et du CMH-II (283, 286, 287, 301, 302, 609, 615), nos travaux présentent une caractérisation plus détaillée des cellules CD40-B associée à la cinétique d'expression des molécules impliquées dans la présentation d'Ag. Nos résultats démontrent que les cellules Combo-CD40-B expriment fortement des molécules de costimulation et très faiblement des ligands de co-inhibition de façon similaire aux cellules IL-4-CD40-B, ce qui suggère qu'ils puissent être des APC efficaces (**Figure 20**). Notre analyse phénotypique s'étant limitée à l'analyse de trois ligands de co-inhibition, il serait intéressant de caractériser l'expression d'autres ligands impliqués dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T tels que HVEM (CD270, ligand de BTLA), CD112 et CD155 (ligand de TIGIT) (322).

Par ailleurs, les essais de reconnaissances *in vitro* réalisés ont démontré que les cellules Combo-CD40-B étaient aussi efficaces que les cellules IL-4-CD40-B et les MoDC pour induire

l'activation des lymphocytes T CD8$^+$ spécifique d'un Ag. Lorsque le chargement des APC est réalisé avec une concentration non saturante de peptide, les cellules Combo-CD40-B se sont révélées être des APC plus puissantes que les MoDC. Les cellules IL-21-CD40-B sont les APC les moins performantes (**Figure 21**). Les essais *in vitro* ont été effectués avec des cellules CD40-B stimulées pendant 9 jours, car il s'agit du jour auquel les cellules semblent posséder une capacité de présentation d'Ag optimale (**Figures 16-18 et 20**). Une expérience préliminaire a été réalisée en utilisant les cellules CD40-B activées pendant 12 jours. Les résultats étant similaires aux à ceux obtenus avec les cellules CD40-B cultivées pendant 9 jours (**Figures 21 et 32**), ceci suggère qu'une culture plus longue n'affecte pas la capacité des cellules CD40-B à être des APC efficaces (**Figure 32**). Su et al., ont rapporté que les cellules CD40-B stimulées avec les cytokines IL-2, IL-4, IL-21 et BAFF maintiennent une expression élevée des molécules associées à la présentation antigénique (CMH-II, CD80 et CD86) pendant les 16 jours de culture. Toutefois, ils observent un déclin de l'expression du CD80 ainsi que la différenciation des cellules CD40-B en PC aux jours 14-16. En conséquence, les cellules cultivées pendant 16 jours possèdent des capacités de présentation d'Ag moins efficaces que les cellules CD40-B utilisées au jour 8 (287). Ainsi, il serait judicieux de poursuivre la caractérisation phénotypique et reproduire les essais de reconnaissance *in vitro* avec des cellules CD40-B cultivées au-delà du jour 12 afin d'évaluer si les cellules Combo-CD40-B maintiennent leur capacité à être des APC efficaces.

Figure 32. – Essai de reconnaissance avec les cellules CD40-B cultivées jusqu'au jour 12



Les MoDC et les cellules CD40-B ont été cultivées pendant 8 et 12 jours respectivement. Les APC ont été chargées pendant 6 heures avec le peptide gp209-2M (gp100) aux concentrations indiquées puis co-cultivées pendant 16-20 heures avec les lymphocytes T CD8$^+$ spécifiques de gp100 a un ratio de 1:1. L'activation des CTL a été évaluée par la quantification par ELISA de la sécrétion d'IFN-γ dans les surnageants de co-culture pour évaluer la capacité des APC à présenter l'Ag par CMH-I. Les résultats représentent la moyenne (SD) de la sécrétion d'IFN-γ pour deux donneurs indépendants (n = 2). La concentration d'IFN-γ a été mesurée dans un deux réplicats techniques pour chaque condition. **NC** : non chargées; **CTRL** : peptide contrôle.

L'ensemble de nos travaux se sont concentrés sur la présentation d'Ag aux lymphocytes T $CD8^+$ *in vitro*. Il serait intéressant d'évaluer la capacité des cellules IL-4- et Combo-CD40-B à induire l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ comparativement aux MoDC. Des expériences *in vitro* similaires à ceux présentés dans la **Figure 21** pourront être réalisées en ayant recours à un clone de lymphocytes T $CD4^+$ spécifique de la nucléoprotéine du virus influenza A (H1N1) présentée par le CMH-II HLA-DRβ*0401 disponible au sein du laboratoire. Ces expériences seront réalisées en chargeant les APC avec la protéine recombinante complète.

Outre les rôles majeurs des lymphocytes T αβ conventionnels ($CD4^+$ et $CD8^+$) dans l'immunité, les lymphocytes T non conventionnels ont des fonctions importantes dans les réponses immunitaires, notamment dans les réponses antitumorales (234, 624). Récemment, Huang et al., ont vacciné des souris ayant un système immunitaire humain avec une nanoparticule vaccinale ciblant spécifiquement les cDC1, dans laquelle le glycolipide α-galactosylcéramide (α-GalCer) et un Ag peptidique du mélanome sont encapsulés. Ils ont démontré que cette stratégie conduit à l'activation et à l'expansion des DC $CD141^+$ et des cellules iNKT humaines et induit ultimement une réponse antitumorale efficace des CTL spécifiques de l'Ag *in vivo*. Les auteurs ont rapporté que cette réponse résulte d'une activation des cellules iNKT qui fournissent des signaux d'aide efficaces aux DC et aux CTL (625). Les lymphocytes B étant capables d'interagir avec les lymphocytes T non conventionnels comme les cellules iNKT (225) et les lymphocytes T γδ (233), il serait intéressant d'évaluer la capacité des cellules IL-4- et Combo-CD40-B à activer ces types cellulaires. Par exemple, nous pourrions étudier si les cellules IL-4- et Combo-CD40-B chargées avec l'agoniste α-GalCer peuvent induire l'activation des cellules iNKT *in vitro*. Il serait aussi intéressant d'évaluer si le chargement simultané des cellules IL-4- et Combo-CD40-B avec un Ag peptidique du mélanome comme gp100 et le glycolipide α-GalCer pourrait mener à une activation augmentée des CTL lors d'une co-culture *in vitro* avec des PBMC provenant de patients atteints d'un mélanome.

Nos travaux se sont concentrés sur l'étude de la présentation d'Ag par les lymphocytes de la lignée B-2. Cependant, des études ont rapporté que les lymphocytes B-1 murins non activés sont des APC efficaces capables d'induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T (23). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la capacité des lymphocytes B-1 humains à induire l'activation

et la prolifération des lymphocytes T. Tout d'abord, les lymphocytes B-1 humains seront isolés des PBMC par tri cellulaire ($CD19^+CD20^+CD27^+CD38^{low/medium}CD43^+$) (10, 11) puis ils seront chargés avec un Ag avant d'être co-cultivés avec des lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ spécifiques. Les fonctions de présentation d'Ag et de costimulation des lymphocytes B-1 seront évaluées en mesurant leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T et leur sécrétion de cytokines.

Les cellules CD40-B, une potentielle plateforme vaccinale alternative aux MoDC

Les vaccins thérapeutiques utilisés en immunothérapie du cancer reposent principalement sur les DC comme source d'APC (296, 480). Le phénotype des MoDC ainsi que leur capacité à induire l'activation des CTL lors des essais de reconnaissance *in vitro* ont donc été évalués. Les MoDC expriment fortement les molécules CD80 et CD86 (ligands du récepteur CD28), mais comparativement aux cellules IL-4- et Combo-CD40-B, elles expriment des ligands de co-inhibition, mais n'expriment pas les molécules de costimulation CD70 (ligand du CD27) et OX40L (ligand de OX40) (**Figure 20**). Une étude récente a démontré que des lymphocytes B murins modifiés génétiquement pour coexprimer le CD40L et les molécules CD70 ou OX40L ont des fonctions de présentation d'Ag augmentées (320). La vaccination des souris portant des tumeurs de mélanome avec ces lymphocytes B modifiés et chargés avec des peptides induit à une réponse antitumorale des CTL plus efficace que la vaccination avec les DC (320). De façon similaire, les lymphocytes B murins spléniques activés par le CD40 et transfectés avec les ARNm codants pour OX40L, 4-1BBL et l'IL-12p70 induisent une plus forte prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ et leur sécrétion d'IL-2 et d'IFN-γ. Ces cellules sont aussi efficaces que les DC pour induire la réponse cytotoxique des CTL *in vitro* mais pas *in vivo* (321). Ainsi, nous postulons que la vaccination avec les cellules IL-4- et Combo-CD40 serait au moins aussi efficace que la vaccination avec les MoDC pour induire une réponse cellulaire, mais plus efficace pour soutenir l'activation des lymphocytes T en fournissant des signaux de costimulation par l'engagement des récepteurs CD27 et OX40 exprimés tardivement (318). Ces résultats supportent l'utilisation des cellules Combo-CD40-B comme APC alternatives aux MoDC dans les applications de recherche fondamentale et clinique.

Les DC utilisées dans les vaccins sont fréquemment obtenues par la différenciation *ex vivo* des monocytes $CD14^+$ ou des cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ puis leur maturation est

réalisée par leur stimulation avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6 avec la prostaglandine E2 (295) et d'autres cytokines comme l'IFN-γ (296). Une étude ayant utilisé des MoDC ayant subi une maturation par la stimulation avec le CD40L et l'IFN-γ et chargées avec des peptides dérivés de gp100 a rapporté des résultats encourageants pour le traitement des patients souffrant d'un mélanome de stade IV (297). Dans nos travaux, les MoDC ont été générés à partir des monocytes stimulés avec l'IL-4 et le GM-CSF puis leur maturation a été réalisée par leur stimulation avec le CD40L (626) (**Figure 18**). Il serait judicieux de réitérer la caractérisation phénotypique et les essais de reconnaissance en utilisant des MoDC dont la maturation est réalisée avec le cocktail de cytokines le plus couramment utilisé en clinique pour comparer leur potentiel à induire les réponses des CTL à celui des cellules IL-4- et Combo-CD40-B.

Afin de valider la faisabilité d'une vaccination avec les cellules Combo-CD40-B chargées avec un Ag, nous pourrions réaliser des expériences *in vivo* à l'aide d'un modèle murin humanisé par le transfert adoptif de cellules souches $CD34^+$ (617). Les cellules humaines de mélanome 624.38mel (HLA-A*0201, $gp100^+$) seront injectées de façon sous-cutanée. L'humanisation des souris avec des cellules souches ayant une expression des allèles des CMH la plus appariée possible avec les cellules 624.38mel permettra de réduire le risque de rejet des cellules tumorales. Lorsque les tumeurs auront atteint un volume suffisant, les souris seront vaccinées avec les APC (IL-4-, Combo-CD40-B et MoDC) générées à partir des cellules isolées du sang périphérique des souris possédant un système immunitaire autologue et chargées avec l'épitope gp100 inséré dans la VLP de PapMV ou par la transfection avec l'ARNm codant pour l'Ag. À la suite du traitement, le volume de la tumeur sera mesuré pour évaluer la réponse antitumorale. Des souris seront sacrifiées à différents jours pour réaliser une caractérisation phénotypique par cytométrie en flux des lymphocytes T infiltrant la tumeur, présents dans les GL drainants et le sang. L'émergence de CTL spécifiques de gp100 sera évaluée par cytométrie en flux grâce au marquage avec un tétramère couplé à un fluorochrome. Des expériences complémentaires seront réalisées afin de valider l'utilisation de ce modèle murin pour réaliser cette expérience de vaccination antitumorale. La stratégie proposée est illustrée dans la **Figure 33.**

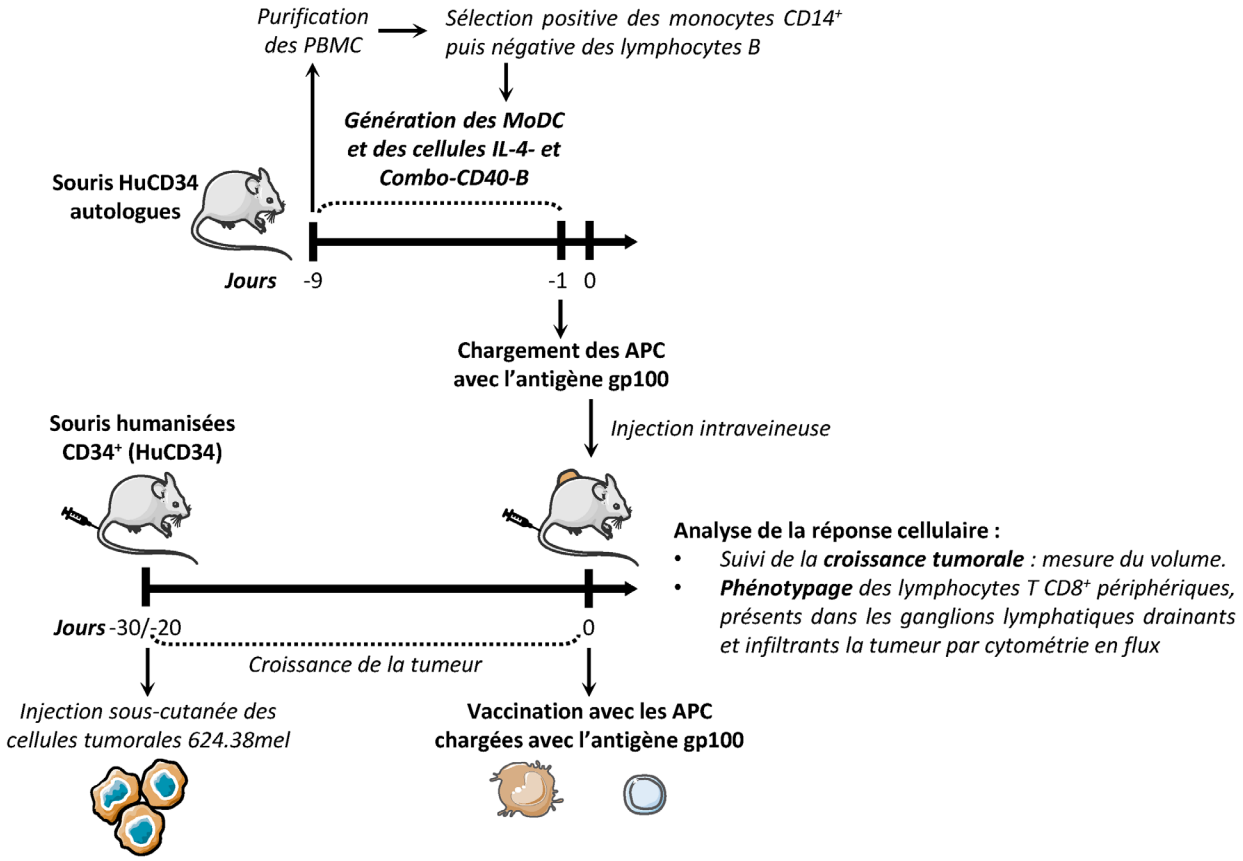


Figure 33. – Évaluation de la vaccination avec les cellules CD40-B : modèle proposé

Les cellules tumorales 624.38mel (HLA-A*0201, gp100$^+$) seront injectées dans des souris humanisées par le transfert adoptif de cellules souches hématopoïétiques CD34$^+$ (HuCD34). Après la tumeur est formée (20-30 jours), les MoDC ou les cellules IL-4- et Combo-CD40-B générées préalablement à partir des PBMC isolées de souris HuCD34 autologues seront chargées avec PapMV-gp100 ou par la transfection avec l'ARNm codant pour l'Ag. Les APC chargées seront injectées aux souris portant les tumeurs. La réponse cellulaire antitumorale sera évaluée en suivant l'évolution de la croissance tumorale et en réalisant un phénotypage par cytométrie en flux des lymphocytes T CD8$^+$ périphériques, infiltrant la tumeur et présents dans les GL drainants.

Les résultats présentés dans le **Chapitre 3** ont permis d'approfondir nos connaissances de la biologie des CD40-B et de démontrer pour la première fois le potentiel des cellules Combo-CD40-B comme APC. Les perspectives proposées parachèveront nos travaux et permettront d'évaluer l'utilisation des cellules IL-4- et Combo-CD40-B comme plateforme vaccinale dans un modèle animal préclinique. L'ensemble de ces données supporteront l'utilisation des cellules Combo-CD40-B comme source alternative d'APC dans les applications de recherche fondamentale et clinique.

Dans la section suivante, je discuterai de la littérature rapportant l'utilisation des lymphocytes B en tant que plateforme vaccinale en immunothérapie du cancer. Par la suite, je présenterai des expériences préliminaires effectuées afin de démontrer la possibilité d'utiliser les cellules CD40-B comme APC afin d'enrichir les populations de lymphocytes T en CTL spécifiques d'Ag tumoraux dans un contexte de traitement d'immunothérapie par transfert adoptif de TIL.

Les lymphocytes B, des cellules à fort potentiel biotechnologique

Une plateforme vaccinale en immunothérapie du cancer

Malgré les multiples fonctions effectrices des lymphocytes B et particulièrement la fonction de présentation d'Ag des cellules CD40-B, le potentiel de ces cellules est sous-estimé notamment en ce qui concerne leur utilisation en thérapie cellulaire. Des études réalisées dans des modèles précliniques murins et canins ont rapporté que les traitements d'immunothérapie du cancer avec les cellules CD40-B étaient capables d'induire une réponse cellulaire antitumorale des CTL (291, 301, 321, 489, 616). Par exemple, la vaccination de souris avec des cellules CD40-B chargées avec un Ag du LCMV menait à une réduction significative des tumeurs sous-cutanées exprimant l'Ag modèle (368). Moutai et al., ont démontré que l'administration de lymphocytes B spécifiques du lysozyme de blanc d'œuf (LBB) isolés de souris et amplifiés par co-culture avec des cellules exprimant le CD40L et BAFF, en présence d'IL-4 et d'IL-21, conduisait à la régression de métastases pulmonaires formées par les cellules du mélanome B16 exprimant l'Ag LBB (627).

Quelques études en phases cliniques précoces ont évalué le potentiel des lymphocytes B en tant que vaccin contre le cancer. Ces essais ont démontré que les immunothérapies utilisant des lymphocytes B sont généralement sécuritaires et engendrent peu de toxicité. Les résultats rapportés suggèrent qu'elles puissent conduire à une réponse antitumorale des lymphocytes T (291). Deux essais cliniques ayant évalué une approche vaccinale hybride reposant sur la fusion de lymphocytes B allogéniques provenant de PBMC de donneurs sains avec des cellules tumorales autologues de carcinome rénal (628) ou de mélanome (629) ont rapporté des résultats encourageants. L'étude par Trefzer et al., a démontré que cette vaccination conduit à la relocalisation des lymphocytes T au niveau des nodules tumoraux (629).

Nos travaux démontrant la capacité des cellules Combo-CD40-B à induire une réponse des CTL *in vitro* encouragent l'évaluation de ces cellules comme plateforme vaccinale dans un contexte d'immunothérapie du cancer. Comme mentionné précédemment, l'étude de la capacité de ces cellules à induire une réponse antitumorale *in vivo* dans un modèle murin permettrait à la fois de valider nos résultats *in vitro* et d'encourager la conduite d'études cliniques. Par ailleurs, la disponibilité des réactifs recombinants comme le CD40L (609) ainsi que l'amélioration des techniques de chargement d'Ag des lymphocytes (291, 630) permettent d'envisager la réalisation d'études cliniques. Toutefois, la tenue de ces études requiert la production des réactifs de culture des lymphocytes B selon les normes *Good Manufacturing Practices*. À long terme, ces essais cliniques permettraient d'évaluer la faisabilité ainsi que les aspects sécuritaires et la toxicité reliés à l'utilisation des cellules Combo-CD40-B comme plateforme vaccinale en immunothérapie du cancer. De plus, l'induction d'une réponse antitumorale, la persistance des cellules infusées et ainsi que l'impact de la vaccination sur le contrôle tumoral seraient également étudiées.

La sélection de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux à l'aide des lymphocytes B

Au cours de ce doctorat, des expériences préliminaires ont été réalisées afin d'évaluer le recours aux lymphocytes B comme APC pour sélectionner les lymphocytes T spécifiques d'Ag tumoraux dans le but d'améliorer le traitement d'immunothérapie par transfert adoptif de TIL.

L'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de TIL

Afin de réaliser un transfert adoptif de TIL, la tumeur du patient est excisée par chirurgie puis divisée en petits fragments qui sont cultivés en présence de haute dose d'IL-2 pour induire la croissance des TIL. À la suite de cette expansion primaire, les TIL sont amplifiés pendant 14 jours en suivant un protocole d'expansion rapide (*rapid expansion protocol*, REP) fondée sur la stimulation polyclonale des cellules avec Ab anti-CD3 soluble (αCD3) et de hautes doses d'IL-2 en présence de cellules nourricières (*feeder cells*) allogéniques irradiées. Les millions de lymphocytes T sont ensuite réinfusés au patient ayant au préalable subi une lymphodéplétion. De hautes doses d'IL-2 sont également injectées au patient afin de soutenir les lymphocytes T infusés (491).

Plusieurs études cliniques ont démontré l'efficacité du transfert adoptif de TIL pour le traitement du mélanome métastatique (491, 631). Cette thérapie présente toutefois des limitations. Les TIL sont une population hétérogène tant au niveau des fréquences des lymphocytes T $CD4^+$ vs $CD8^+$ que de leur réactivité à la tumeur et à leur spécificité antigénique (632-635). Rohaan et al., rapporte qu'un maximum de 30 % de TIL réactifs à la tumeur sont retrouvés dans le produit d'infusion (631), suggérant que ce sont principalement des lymphocytes T sans spécificité pour des Ag tumoraux qui sont amplifiés puis réinjectés. Plusieurs stratégies pour raffiner le produit d'infusion et améliorer la réactivité tumorale sont à l'étude (631). La sélection des TIL réactifs à la tumeur, avant l'expansion par REP, grâce un marqueur de surface exprimé spécifiquement par ces cellules, est une stratégie qui permettrait de générer un produit d'infusion plus homogène, enrichi en CTL réactifs à la tumeur et dont l'efficacité thérapeutique serait augmentée. Elle permettrait aussi de réduire le nombre de cellules infusées aux patients.

Les travaux du Dr Rosenberg ont démontré que les TIL $CD8^+$ réactifs au mélanome expriment un haut niveau de PD-1. La sélection des cellules $CD8^+PD\text{-}1^+$ présentes dans la population totale enrichit les TIL en CTL reconnaissants la tumeur avant l'amplification par REP. Parmi les cinq patients traités avec le produit d'infusion enrichi, trois ont démontré une augmentation de la réactivité contre la tumeur comparativement aux populations $CD8^+PD\text{-}1^-$ ou non sélectionnée (636). Une étude subséquente a confirmé ces résultats et a démontré que l'expression de TIM-3 et LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) permet aussi d'identifier des TIL $CD8^+$ reconnaissants les tumeurs autologues (632). La sélection des CTL $PD\text{-}1^+$ présents dans le sang périphérique permet également d'isoler des CTL réactifs à des néo-Ag tumoraux (633). Récemment, Yussef et al., ont démontré que la sélection des lymphocytes T $CD3^+PD\text{-}1^+$ et/ou $4\text{-}1BB^+$ et/ou $OX40^+$ infiltrant des tumeurs épithéliales était une méthode efficace pour isoler des lymphocytes T réactifs aux néo-Ag avant leur expansion.

Ye et al., ont quant à eux rapporté que l'activation des TIL $CD8^+$ présents dans les tumeurs de l'ovaire ou du mélanome avec les cellules tumorales, l'IL-7 et IL-15 pendant 24 heures induit l'expression de 4-1BB. Par des essais *in vitro* et à l'aide d'un modèle murin portant des xénogreffes dérivées de patients, les auteurs ont démontré que les TIL $CD8^+4\text{-}1BB^+$ sélectionnés présentent une meilleure réactivité à la tumeur comparativement aux TIL $CD8^+4\text{-}1BB^-$ ou totaux (637).

Récemment, Seliktar-Ofir et al., ont fourni une preuve de concept de la faisabilité de cette stratégie pour sélectionner des TIL 4-1BB$^+$ selon les normes *Good Manufacturing Practices* afin de réaliser une thérapie cellulaire personnalisée. Comparativement à la population totale, les TIL 4-1BB$^+$ étaient enrichis en lymphocytes T spécifiques d'Ag tumoraux et présentaient une reconnaissance de la tumeur augmentée (638). Parkhurst et al., ont quant à eux cultivé des TIL avec des DC transfectées avec de l'ARN codant pour un Ag muté puis les TIL 4-1BB$^+$ ont été triés par cytométrie en flux à la suite de l'essai de reconnaissance, avant d'être amplifiés par REP. Cette stratégie permettait de sélectionner des lymphocytes T spécifiques de néo-Ag (639).

Résultats préliminaires

Puisque les lymphocytes B de patients atteints de cancer peuvent être activés, amplifiés et servir d'APC qui sont aussi efficaces que ceux provenant de donneurs sains (302), nous avons émis l'hypothèse que les cellules CD40-B générées à partir des lymphocytes B autologues de patients pourraient servir d'APC pour enrichir les TIL en CTL réactifs à la tumeur. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences préliminaires pour évaluer si les cellules IL-4-, Combo-CD40-B ou les MoDC pouvaient se substituer à la stimulation polyclonale par l'αCD3 pour activer et amplifier des CTL spécifiques de l'Ag tumoral modèle NY-ESO-1, lors de l'expansion par REP (**Figure 34**). Les résultats obtenus suggèrent que les cellules CD40-B chargées avec un peptide sont capables d'enrichir les CTL spécifiques de NY-ESO-1 (20-30 % de lymphocytes T CD8$^+$ TCR NY-ESO-1$^+$ au jour 14 vs 10 % au jour 0), ce qui se traduit par un nombre absolu de CTL TCR NY-ESO-1$^+$ supérieur, comparativement à la stimulation polyclonale. Toutefois, le protocole standard de REP est plus efficace pour induire la prolifération des CTL (**Figure 34A-C**). Les CTL amplifiés avec les APC sont fonctionnels et présentent une reconnaissance augmentée de la lignée tumorale 624.38mel (HLA-A*0201$^+$ NY-ESO-1$^+$) comparativement aux cellules amplifiées avec le protocole de REP standard (**Figure 34D**).

Puisque le nombre de CTL obtenus à la suite à l'amplification avec les APC est inférieur à celui obtenu avec la stimulation polyclonale, nous avons conduit une expérience préliminaire en suivant une stratégie similaire à celle menée par Parkhurst et al. (639), qui permet d'enrichir les CTL avant leur amplification par le protocole standard de REP. Un essai de reconnaissance a été réalisé en utilisant les cellules IL-4-CD40-B ou les MoDC transfectées avec l'ARNm codant pour

NY-ESO-1 comme APC afin d'induire l'expression de 4-1BB par les CTL spécifiques de l'Ag. Les CTL $CD8^{+}4\text{-}1BB^{-}$ et $CD8^{+}4\text{-}1BB^{+}$ ont été triés par cytométrie en flux puis la population totale et les fractions cellulaires triées ont été amplifiées (**Figure 35**). Les résultats suggèrent que les CTL TCR NY-ESO-1^{+} sont enrichis dans la fraction $4\text{-}1BB^{+}$ (>80 %) comparativement à la fraction $4\text{-}1BB^{-}$ ou à la population totale (**Figure 35A**). Cette stratégie permet d'obtenir un nombre absolu de CTL spécifique de l'Ag NY-ESO-1 plus élevé qu'avec la méthodologie employée précédemment (**Figures 35B et 34B**). Enfin, les CTL amplifiés peuvent être réactivés à la suite d'une nouvelle rencontre avec l'Ag (**Figure 35C**). Il serait intéressant de reproduire cette expérience en utilisant les cellules Combo-CD40-B comme APC.

Ainsi, ces expériences préliminaires suggèrent que les lymphocytes B puissent être utilisés comme source alternative d'APC pour améliorer l'immunothérapie par transfert adoptif de TIL.

L'utilisation des lymphocytes B en tant qu'APC : modèle proposé

La stratégie de sélection des TIL spécifiques d'Ag tumoraux décrite par Parkhurst et al. (639), nécessite l'identification des Ag tumoraux pour charger ou transfecter les APC ce qui représente un processus long et très coûteux. La stratégie employée par Ye et al. (637), et Seliktar-Ofir et al. (638), requiert la co-culture avec les cellules tumorales autologues et peut représenter une limitation technique.

Nous proposons une stratégie alternative qui ne requiert pas l'identification des Ag tumoraux exprimés par les cellules tumorales et qui nécessite seulement une faible quantité de cellules tumorales. Elle repose sur l'extraction de l'ARN total des cellules tumorales puis l'amplification spécifique de l'ensemble des ARNm codants (640, 641). Une fois amplifié, les ARNm codants pour de nombreuses protéines, dont supposément les Ag tumoraux, seront transfectés par électroporation dans les cellules Combo-CD40-B autologues du patient, activées pendant 9 jours. Un essai de reconnaissance sera ensuite réalisé avec les TIL ayant subi une expansion primaire afin d'activer les CTL spécifiques d'Ag tumoraux. Les TIL $CD8^{+}4\text{-}1BB^{+}$ seront sélectionnés par cytométrie en flux puis amplifiés pendant 14 jours selon le protocole standard de REP. Nous postulons que cette stratégie se révèlera efficace pour enrichir le produit d'infusion en multiples CTL spécifiques d'Ag tumoraux ce permettra d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie par transfert adoptif de TIL. Le concept proposé est illustré dans la **Figure 36.**

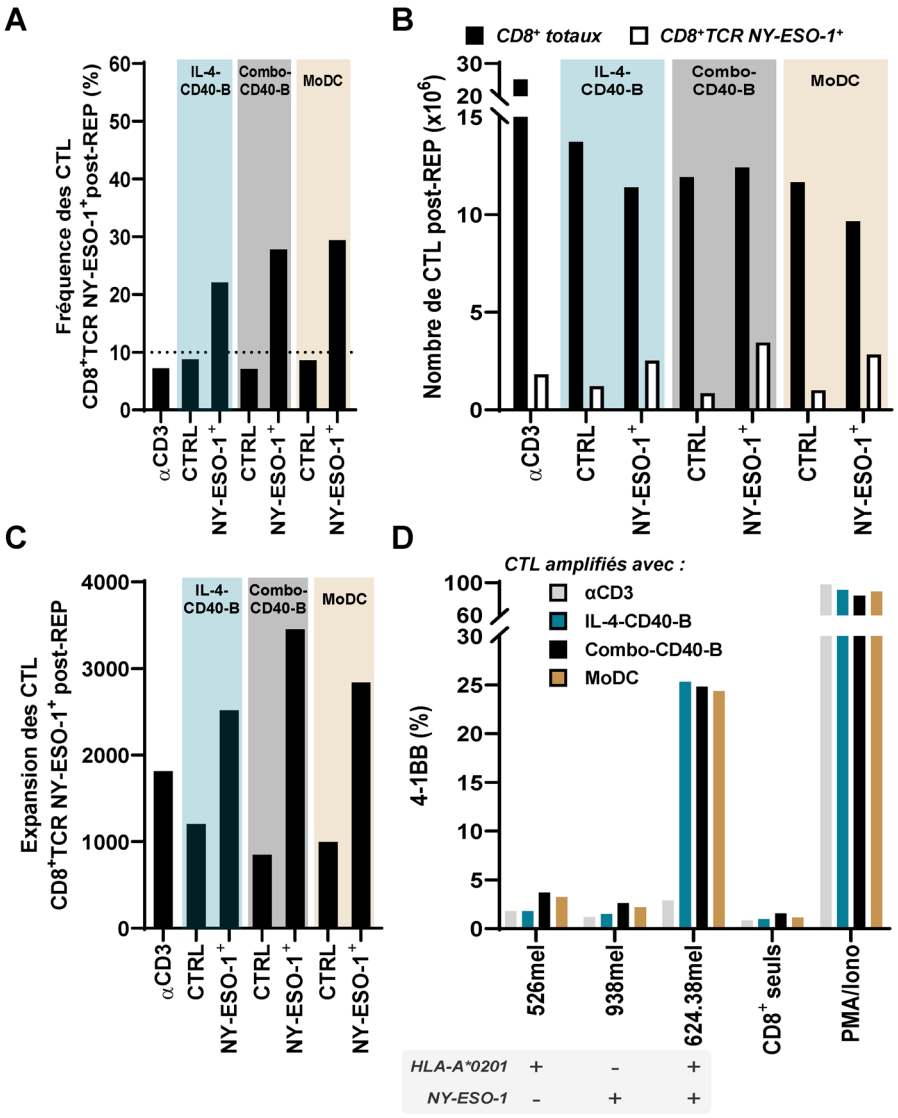


Figure 34. – Utilisation des cellules CD40-B pour induire l'expansion préférentielle de CTL spécifiques d'un antigène tumoral dans une expansion par REP

A-C Les lymphocytes T transduits pour exprimer un TCR reconnaissant l'Ag NY-ESO-1 présenté par HLA-A*0201 (TCR NY-ESO-1$^+$) ont été dilués à une fréquence de 10 % avec des lymphocytes T autologues non transduits. Les lymphocytes T ont été activés avec un Ab αCD3 (clone OKT3) ou les MoDC (jour 8) ou les cellules CD40-B (jour 9) chargées pendant 6 heures avec le peptide NY-ESO-1 (1 µM) ou un peptide contrôle. De l'IL-2 et des PBMC allogéniques irradiées provenant de trois donneurs sains (cellules nourricières) ont été ajoutées à la culture. Après 14 jours, les cellules ont été dénombrées et l'enrichissement des CTL TCR NY-ESO-1$^+$ a été évalué par cytométrie en flux. Le nombre absolu de CTL TCR NY-ESO-1$^+$ et leur expansion spécifique ont été calculés à partir des mesures précédentes. **D** Les CTL ont été co-cultivés pendant 16-20 heures avec les lignées de mélanome indiquées à un ratio CTL:cellule tumorale de 2:1. L'activation des CTL a été évaluée en mesurant l'expression de 4-1BB par cytométrie en flux.

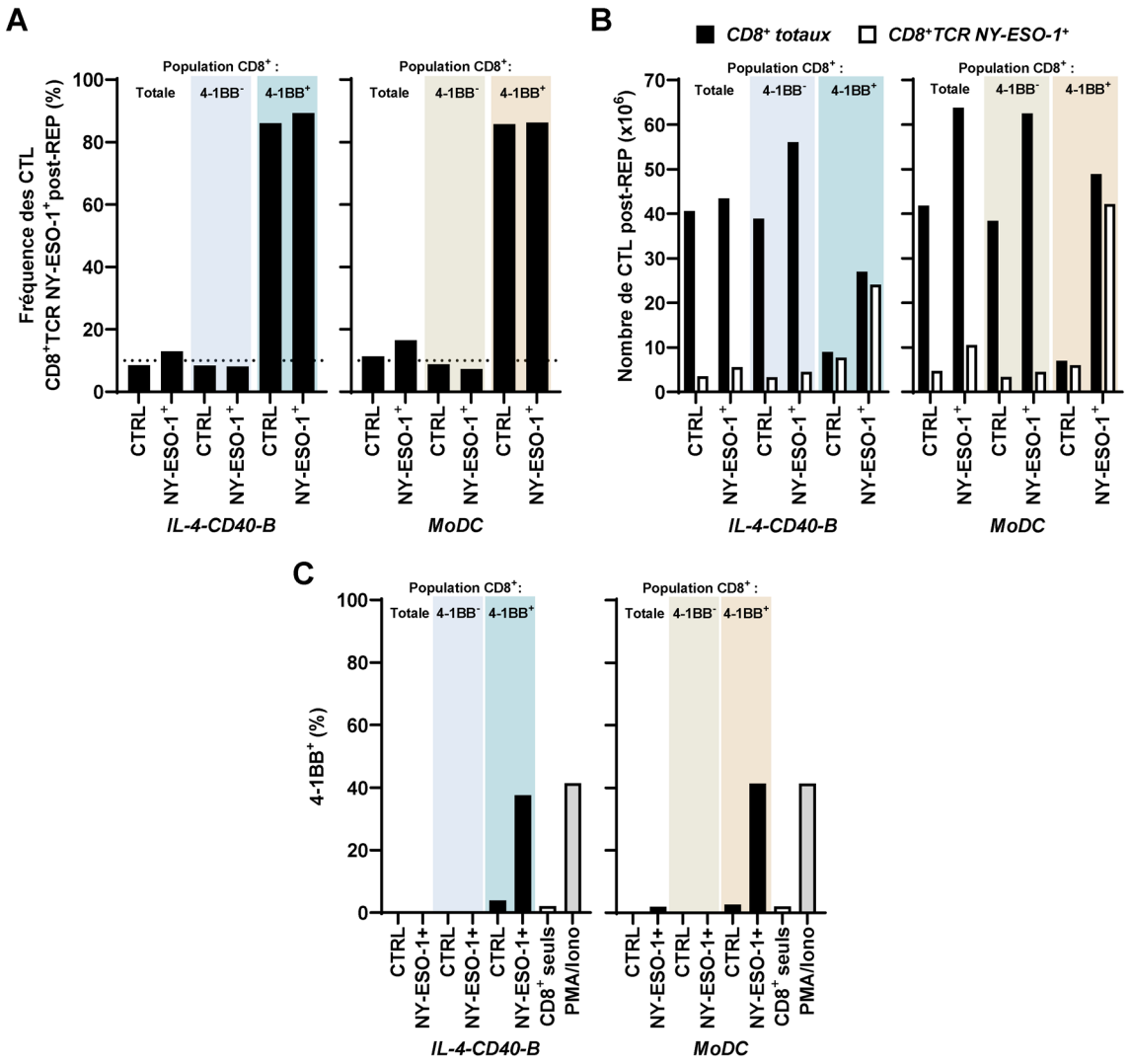


Figure 35. – Utilisation des cellules CD40-B pour activer les lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral pré-REP

A-B Les lymphocytes T TCR NY-ESO-1$^+$ ont été dilués à une fréquence de 10 % avec des lymphocytes T autologues non transduits. Les lymphocytes T ont été co-cultivés pendant 16-20 heures avec les MoDC ou les cellules IL-4-CD40-B transfectées 24 heures avant l'essai avec 4 µg d'ARNm codant pour NY-ESO-1 ou la GFP. Les lymphocytes T CD8$^+$4-1BB$^-$ et CD8$^+$4-1BB$^+$ ont ensuite été triés par cytométrie en flux. La population totale et les populations triées ont été amplifiées pendant 14 jours selon un protocole de REP standard (αCD3, IL-2 et cellules nourricières irradiées). Le nombre total de cellules a été déterminé par dénombrement et l'enrichissement des CTL TCR NY-ESO-1$^+$ a été évalué par cytométrie en flux. Le nombre absolu de CTL TCR NY-ESO-1$^+$ a été calculé à partir des mesures précédentes. **C** Les CTL ont été co-cultivés pendant 16-20 heures à un ratio de 1:1 avec les cellules T2 chargées préalablement pendant 6 heures avec le peptide NY-ESO-1 (1 µM) ou un peptide contrôle. L'activation des CTL a été évaluée en mesurant l'expression de 4-1BB par cytométrie en flux.

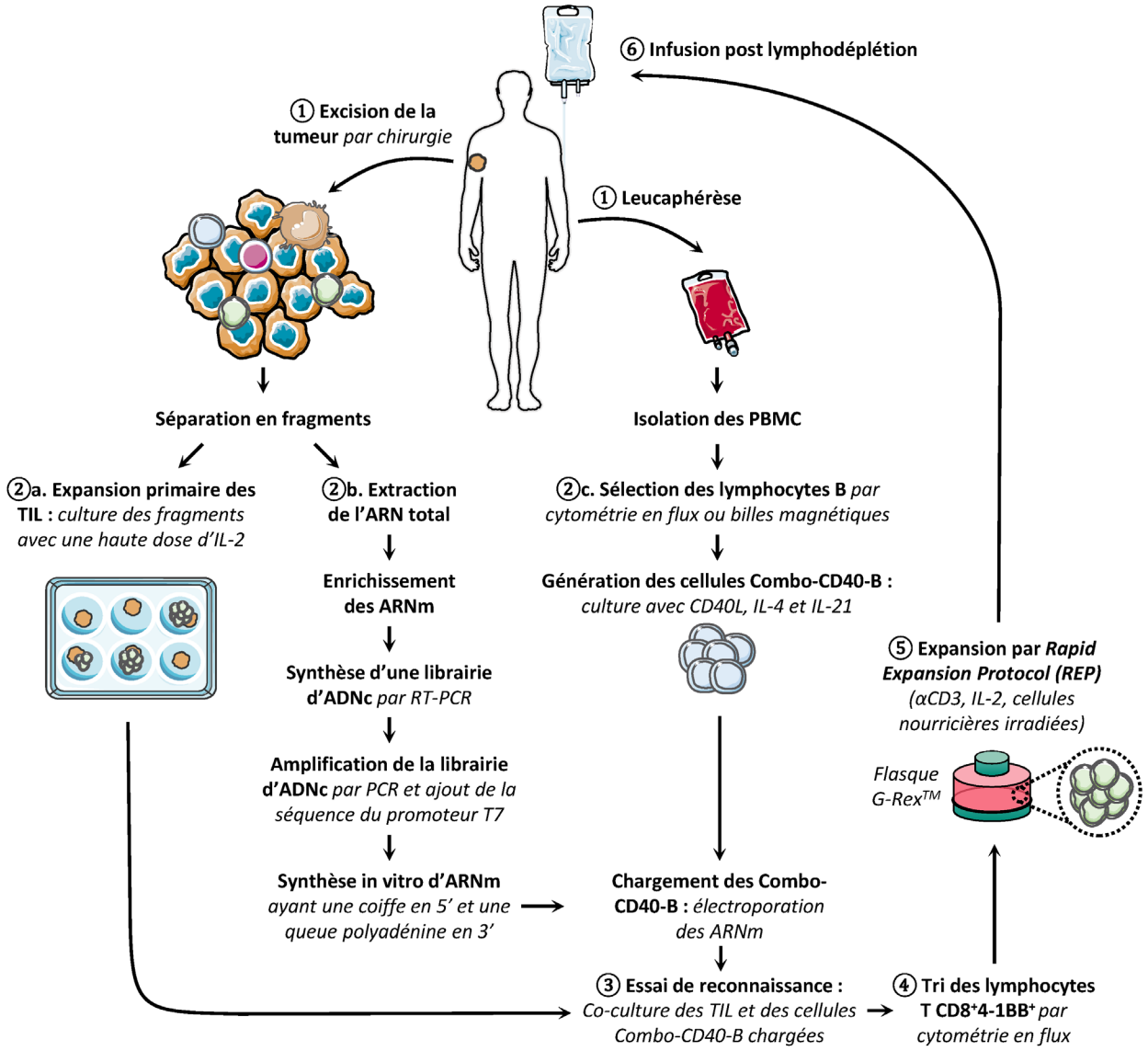


Figure 36. – Concept d'une possible étude utilisant les lymphocytes B comme APC pour améliorer le traitement d'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de TIL

① Les PBMC du patient sont obtenues par leucaphérèse puis conservées par congélation. La tumeur de mélanome est excisée par chirurgie puis divisée en multiples fragments. ②**a** Certains fragments tumoraux sont cultivés individuellement pendant 2 à 3 semaines en présence d'une haute dose d'IL-2 pour permettre aux TIL de proliférer. ②**b** En parallèle, l'ARN total de fragments tumoraux est extrait. Les ARNm seront enrichis par déplétion des ARN ribosomaux et de transfert. Une librairie d'ADN complémentaires (ADNc) est synthétisée par RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) en ciblant spécifiquement les ARNm codants (sens) grâce à des amorces spécifiques. La librairie d'ADNc est ensuite amplifiée par PCR standard et permet l'ajout de la séquence du promoteur T7 en 5' des ADNc grâce à une amorce spécifique. Les ARNm sont synthétisés par un système de transcription *in vitro* utilisant l'ARN polymérase du bactériophage T7 puis une coiffe en 5' et une queue polyadénine en 3' sont ajoutées. ②**c** Les PBMC sont

décongelées, les lymphocytes B sont isolés par billes magnétiques ou tri cellulaire par cytométrie en flux puis stimulés pendant 9 jours avec le CD40L, l'IL-4 et l'IL-21 afin de générer des cellules Combo-CD40-B. Ces APC sont électroporées avec la librairie d'ARNm pour exprimer et présenter de multiples Ag tumoraux par CMH-I. ③ Un essai de reconnaissance est réalisé en co-cultivant les TIL et les cellules Combo-CD40-B chargées. ④ Les TIL $CD8^+4\text{-}1BB^+$ activés par la reconnaissance d'un Ag sont triés par cytométrie en flux. ⑤ La population de TIL $CD8^+4\text{-}1BB^+$ sélectionnée est amplifiée par REP (*rapid expansion protocol*) en présence d'un excès de cellules nourricières irradiées, d'Ab anti-CD3 (αCD3) et d'IL-2. ⑥ Les TIL amplifiés sont réinfusés au patient ayant préalablement subi une lymphodéplétion.

Chapitre 5 – Conclusion

En conclusion, ces travaux de doctorat avaient pour objectif général d'augmenter notre compréhension de la fonction de présentation d'Ag des lymphocytes B et d'améliorer cette fonction afin d'encourager l'utilisation des lymphocytes B comme source alternative d'APC pour des applications biotechnologiques visant à induire une immunité cellulaire.

Nous avons d'abord étudié le mécanisme par lequel les lymphocytes B présentent un épitope inséré dans une plateforme vaccinale, la VLP du virus de plante PapMV. Plus précisément, nous avons mis en évidence que l'apprêtement de l'Ag s'effectue par une voie de présentation croisée vacuolaire indépendante du transporteur TAP, mais qui dépend de l'activité de la cathepsine S, de l'acidification des lysosomes et de l'induction de l'autophagie. Il s'agit de la première description du mécanisme par lequel un épitope inséré dans la VLP de PapMV est présenté dans les lymphocytes B.

Par la suite, nous avons évalué la stimulation *in vitro* des lymphocytes B par le CD40L et l'IL-21 ou la combinaison de l'IL-4 et l'IL-21 au lieu de l'activation standard avec le CD40L et l'IL-4, pour améliorer l'induction de leur fonction de présentation d'Ag afin d'induire les réponses cellulaires des CTL. Nos résultats ont permis d'approfondir nos connaissances de la biologie des lymphocytes B et démontrent que la stimulation avec le CD40L et la combinaison de l'IL-4 et de l'IL-21 augmente la prolifération des lymphocytes B et induit efficacement leur fonction de présentation d'Ag. Nous avons démontré pour la première fois que ce protocole génère des APC puissantes capables d'induire la réponse des CTL *in vitro*

Ces travaux contribuent à des avancées en recherche fondamentale sur les lymphocytes B et offrent de nouvelles pistes de réflexion quant à leurs utilisations biotechnologiques comme source alternative d'APC pour des applications de recherche fondamentale et clinique. À long terme, nous postulons que l'utilisation de ces cellules comme plateforme vaccinale permettra de générer une réponse cellulaire efficace *in vivo*. De plus, ces APC pourraient être utilisées pour améliorer les traitements d'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de TIL.

Références bibliographiques

1. Dai H, Lan P, Zhao D, Abou-Daya K, Liu W, Chen W, et al. PIRs mediate innate myeloid cell memory to nonself MHC molecules. Science. 2020;368(6495):1122-7. Epub 2020/05/10.

2. Gang M, Wong P, Berrien-Elliott MM, Fehniger TA. Memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy. Semin Hematol. 2020;57(4):185-93. Epub 2020/12/02.

3. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol. 2012;12(8):557-69. Epub 2012/07/14.

4. Yuan J, Nguyen CK, Liu X, Kanellopoulou C, Muljo SA. Lin28b reprograms adult bone marrow hematopoietic progenitors to mediate fetal-like lymphopoiesis. Science. 2012;335(6073):1195-200. Epub 2012/02/22.

5. Zhou Y, Li YS, Bandi SR, Tang L, Shinton SA, Hayakawa K, et al. Lin28b promotes fetal B lymphopoiesis through the transcription factor Arid3a. J Exp Med. 2015;212(4):569-80. Epub 2015/03/11.

6. Graf R, Seagal J, Otipoby KL, Lam KP, Ayoub S, Zhang B, et al. BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. Science. 2019;363(6428):748-53. Epub 2019/02/16.

7. Smith FL, Baumgarth N. B-1 cell responses to infections. Curr Opin Immunol. 2019;57:23-31. Epub 2019/01/28.

8. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. J Exp Med. 2011;208(1):67-80. Epub 2011/01/12.

9. Griffin DO, Rothstein TL. A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. J Exp Med. 2011;208(13):2591-8. Epub 2011/11/24.

10. Quach TD, Rodriguez-Zhurbenko N, Hopkins TJ, Guo X, Hernandez AM, Li W, et al. Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. J Immunol. 2016;196(3):1060-9. Epub 2016/01/08.

11. Rodriguez-Zhurbenko N, Quach TD, Hopkins TJ, Rothstein TL, Hernandez AM. Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. Front Immunol. 2019;10(483):483. Epub 2019/04/04.

12. Holodick NE, Rodriguez-Zhurbenko N, Hernandez AM. Defining Natural Antibodies. Front Immunol. 2017;8(872):872. Epub 2017/08/12.

13. Kumar D, Romero Y, Schuck KN, Smalley H, Subedi B, Fleming SD. Drivers and regulators of humoral innate immune responses to infection and cancer. Mol Immunol. 2020;121:99-110. Epub 2020/03/22.

14. Maddur MS, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD, Kazatchkine MD, Bayry J, Kaveri SV. Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis. Clin Rev Allergy Immunol. 2020;58(2):213-28. Epub 2019/06/05.

15. Savage HP, Yenson VM, Sawhney SS, Mousseau BJ, Lund FE, Baumgarth N. Blimp-1-dependent and -independent natural antibody production by B-1 and B-1-derived plasma cells. J Exp Med. 2017;214(9):2777-94. Epub 2017/07/13.

16. Waffarn EE, Hastey CJ, Dixit N, Soo Choi Y, Cherry S, Kalinke U, et al. Infection-induced type I interferons activate CD11b on B-1 cells for subsequent lymph node accumulation. Nat Commun. 2015;6(1):8991. Epub 2015/11/28.

17. Kreuk LS, Koch MA, Slayden LC, Lind NA, Chu S, Savage HP, et al. B cell receptor and Toll-like receptor signaling coordinate to control distinct B-1 responses to both self and the microbiota. Elife. 2019;8:e47015. Epub 2019/08/23.

18. Savage HP, Klasener K, Smith FL, Luo Z, Reth M, Baumgarth N. TLR induces reorganization of the IgM-BCR complex regulating murine B-1 cell responses to infections. Elife. 2019;8:e46997. Epub 2019/08/23.

19. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. Immunity. 2004;21(3):379-90. Epub 2004/09/11.

20. Zhong X, Gao W, Degauque N, Bai C, Lu Y, Kenny J, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. Eur J Immunol. 2007;37(9):2400-4. Epub 2007/08/09.

21. Wang Y, Rothstein TL. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. Front Immunol. 2012;3(281):281. Epub 2012/09/14.

22. Margry B, Wieland WH, van Kooten PJ, van Eden W, Broere F. Peritoneal cavity B-1a cells promote peripheral CD4+ T-cell activation. Eur J Immunol. 2013;43(9):2317-26. Epub 2013/05/31.

23. Popi AF, Longo-Maugeri IM, Mariano M. An Overview of B-1 Cells as Antigen-Presenting Cells. Front Immunol. 2016;7:138. Epub 2016/05/06.

24. Winkler TH, Martensson IL. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. Front Immunol. 2018;9(2423):2423. Epub 2018/12/01.

25. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(4):959-71. Epub 2013/03/08.

26. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. Nat Rev Immunol. 2011;11(4):251-63. Epub 2011/03/12.

27. Briney B, Inderbitzin A, Joyce C, Burton DR. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. Nature. 2019;566(7744):393-7. Epub 2019/01/22.

28. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat Rev Immunol. 2017;17(5):281-94. Epub 2017/04/04.

29. Agrawal S, Smith SA, Tangye SG, Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. Clin Exp Immunol. 2013;174(1):53-9. Epub 2013/06/05.

30. Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. Blood. 2007;109(6):2339-45. Epub 2006/11/23.

31. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. Nat Rev Immunol. 2009;9(11):767-77. Epub 2009/10/27.

32. Grant SM, Lou M, Yao L, Germain RN, Radtke AJ. The lymph node at a glance - how spatial organization optimizes the immune response. J Cell Sci. 2020;133(5):jcs241828. Epub 2020/03/08.

33. Rodda LB, Lu E, Bennett ML, Sokol CL, Wang X, Luther SA, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. Immunity. 2018;48(5):1014-28 e6. Epub 2018/05/13.

34. Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. Nat Immunol. 2010;11(11):989-96. Epub 2010/10/21.

35. Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, Cupovic J, Nieves-Bonilla JM, Schildberg FA, et al. B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. Nat Immunol. 2014;15(10):973-81. Epub 2014/08/26.

36. Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. Immunity. 2007;26(4):491-502. Epub 2007/03/24.

37. Heesters BA, van der Poel CE, Das A, Carroll MC. Antigen Presentation to B Cells. Trends Immunol. 2016;37(12):844-54. Epub 2016/10/30.

38. Carrasco YR, Batista FD. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. Immunity. 2007;27(1):160-71. Epub 2007/07/31.

39. Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. Nat Immunol. 2007;8(9):992-1000. Epub 2007/07/31.

40. Liu W, Wang H, Xu C. Antigen Receptor Nanoclusters: Small Units with Big Functions. Trends Immunol. 2016;37(10):680-9. Epub 2016/08/25.

41. Yang J, Reth M. Receptor Dissociation and B-Cell Activation. Dans: Kurosaki T, Wienands J, rédacteurs. B Cell Receptor Signaling. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 27-43.

42. Suthers AN, Sarantopoulos S. TLR7/TLR9- and B Cell Receptor-Signaling Crosstalk: Promotion of Potentially Dangerous B Cells. Front Immunol. 2017;8(775):775. Epub 2017/07/29.

43. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. Immunity. 2012;37(2):199-207. Epub 2012/08/28.

44. Mongini PK, Vilensky MA, Highet PF, Inman JK. The affinity threshold for human B cell activation via the antigen receptor complex is reduced upon co-ligation of the antigen receptor with CD21 (CR2). The Journal of Immunology. 1997;159(8):3782-91.

45. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, et al. The regulators of BCR signaling during B cell activation. Blood Science. 2019;1(2):119-29.

46. Stoddart A, Jackson AP, Brodsky FM. Plasticity of B cell receptor internalization upon conditional depletion of clathrin. Mol Biol Cell. 2005;16(5):2339-48. Epub 2005/02/18.

47. Natkanski E, Lee WY, Mistry B, Casal A, Molloy JE, Tolar P. B cells use mechanical energy to discriminate antigen affinities. Science. 2013;340(6140):1587-90. Epub 2013/05/21.

48. Hoogeboom R, Natkanski EM, Nowosad CR, Malinova D, Menon RP, Casal A, et al. Myosin IIa Promotes Antibody Responses by Regulating B Cell Activation, Acquisition of Antigen, and Proliferation. Cell Rep. 2018;23(8):2342-53. Epub 2018/05/24.

49. Spillane KM, Tolar P. Mechanics of antigen extraction in the B cell synapse. Mol Immunol. 2018;101:319-28. Epub 2018/07/24.

50. Spillane KM, Tolar P. B cell antigen extraction is regulated by physical properties of antigen-presenting cells. J Cell Biol. 2017;216(1):217-30. Epub 2016/12/08.

51. Yuseff MI, Reversat A, Lankar D, Diaz J, Fanget I, Pierobon P, et al. Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation. Immunity. 2011;35(3):361-74. Epub 2011/08/09.

52. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. Cell. 2019;177(3):524-40. Epub 2019/04/20.

53. Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Forster R, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. Nature. 2002;416(6876):94-9. Epub 2002/03/08.

54. Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. Nature. 2009;460(7259):1122-6. Epub 2009/07/15.

55. Gatto D, Paus D, Basten A, Mackay CR, Brink R. Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. Immunity. 2009;31(2):259-69. Epub 2009/07/21.

56. Gatto D, Wood K, Brink R. EBI2 operates independently of but in cooperation with CXCR5 and CCR7 to direct B cell migration and organization in follicles and the germinal center. J Immunol. 2011;187(9):4621-8. Epub 2011/09/29.

57. Gatto D, Brink R. B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. Trends Immunol. 2013;34(7):336-41. Epub 2013/03/14.

58. Goenka R, Barnett LG, Silver JS, O'Neill PJ, Hunter CA, Cancro MP, et al. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. J Immunol. 2011;187(3):1091-5. Epub 2011/07/01.

59. Hong S, Zhang Z, Liu H, Tian M, Zhu X, Zhang Z, et al. B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4(+) T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. Immunity. 2018;49(4):695-708 e4. Epub 2018/10/07.

60. Arroyo EN, Pepper M. B cells are sufficient to prime the dominant CD4+ Tfh response to Plasmodium infection. J Exp Med. 2020;217(2). Epub 2019/11/22.

61. Krishnaswamy JK, Alsen S, Yrlid U, Eisenbarth SC, Williams A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. Front Immunol. 2018;9:2169. Epub 2018/10/16.

62. Durand M, Walter T, Pirnay T, Naessens T, Gueguen P, Goudot C, et al. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. J Exp Med. 2019;216(7):1561-81. Epub 2019/05/11.

63. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. Immunity. 2004;21(2):279-88. Epub 2004/08/17.

64. Krishnaswamy JK, Gowthaman U, Zhang B, Mattsson J, Szeponik L, Liu D, et al. Migratory CD11b(+) conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. Sci Immunol. 2017;2(18):eaam9169. Epub 2017/12/03.

65. Yi T, Cyster JG. EBI2-mediated bridging channel positioning supports splenic dendritic cell homeostasis and particulate antigen capture. Elife. 2013;2:e00757. Epub 2013/05/18.

66. Webb LMC, Linterman MA. Signals that drive T follicular helper cell formation. Immunology. 2017;152(2):185-94. Epub 2017/06/20.

67. Fazilleau N, McHeyzer-Williams LJ, Rosen H, McHeyzer-Williams MG. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. Nat Immunol. 2009;10(4):375-84. Epub 2009/03/03.

68. Benson RA, MacLeod MK, Hale BG, Patakas A, Garside P, Brewer JM. Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. Elife. 2015;4. Epub 2015/08/11.

69. Watanabe M, Fujihara C, Radtke AJ, Chiang YJ, Bhatia S, Germain RN, et al. Co-stimulatory function in primary germinal center responses: CD40 and B7 are required on distinct antigen-presenting cells. J Exp Med. 2017;214(9):2795-810. Epub 2017/08/05.

70. Fillatreau S, Gray D. T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation. J Exp Med. 2003;197(2):195-206. Epub 2003/01/23.

71. Deenick EK, Ma CS, Brink R, Tangye SG. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. Curr Opin Immunol. 2011;23(1):111-8. Epub 2010/12/01.

72. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. Immunity. 2011;34(6):932-46. Epub 2011/06/04.

73. Choi YS, Eto D, Yang JA, Lao C, Crotty S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. J Immunol. 2013;190(7):3049-53. Epub 2013/03/01.

74. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. Immunity. 2009;31(1):158-69. Epub 2009/07/14.

75. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel SE, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, et al. The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. Nat Immunol. 2014;15(9):856-65. Epub 2014/07/30.

76. Baumjohann D, Okada T, Ansel KM. Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. J Immunol. 2011;187(5):2089-92. Epub 2011/08/02.

77. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. Immunity. 2019;50(5):1132-48. Epub 2019/05/23.

78. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, et al. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. Immunity. 2019;51(2):337-50 e7. Epub 2019/08/04.

79. Hwang JK, Alt FW, Yeap LS. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. Microbiol Spectr. 2015;3(1):MDNA3-0037-2014. Epub 2015/06/25.

80. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. Nat Rev Immunol. 2020;20(4):229-38. Epub 2019/12/15.

81. Bortnick A, Allman D. What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens. J Immunol. 2013;190(12):5913-8. Epub 2013/06/12.

82. Lycke NY, Bemark M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. Mucosal Immunol. 2017;10(6):1361-74. Epub 2017/07/27.

83. Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, Kamphorst AO, Mugnier MR, Gitlin AD, et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. J Exp Med. 2011;208(6):1243-52. Epub 2011/05/18.

84. Woodruff MC, Kim EH, Luo W, Pulendran B. B Cell Competition for Restricted T Cell Help Suppresses Rare-Epitope Responses. Cell Rep. 2018;25(2):321-7 e3. Epub 2018/10/12.

85. Zhang TT, Gonzalez DG, Cote CM, Kerfoot SM, Deng S, Cheng Y, et al. Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help. Elife. 2017;6:e19552. Epub 2017/05/13.

86. Yeh CH, Nojima T, Kuraoka M, Kelsoe G. Germinal center entry not selection of B cells is controlled by peptide-MHCII complex density. Nat Commun. 2018;9(1):928. Epub 2018/03/04.

87. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):137-48. Epub 2015/02/07.

88. Kuraoka M, Schmidt AG, Nojima T, Feng F, Watanabe A, Kitamura D, et al. Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. Immunity. 2016;44(3):542-52. Epub 2016/03/08.

89. Tas JM, Mesin L, Pasqual G, Targ S, Jacobsen JT, Mano YM, et al. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. Science. 2016;351(6277):1048-54. Epub 2016/02/26.

90. Bannard O, Cyster JG. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. Curr Opin Immunol. 2017;45:21-30. Epub 2017/01/16.

91. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nat Immunol. 2004;5(9):943-52. Epub 2004/08/10.

92. Bannard O, Horton RM, Allen CD, An J, Nagasawa T, Cyster JG. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. Immunity. 2013;39(5):912-24. Epub 2013/11/05.

93. Song S, Matthias PD. The Transcriptional Regulation of Germinal Center Formation. Front Immunol. 2018;9(2026):2026. Epub 2018/09/21.

94. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. Cell. 2010;143(4):592-605. Epub 2010/11/16.

95. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. Blood. 2012;120(11):2240-8. Epub 2012/06/29.

96. Rodda LB, Bannard O, Ludewig B, Nagasawa T, Cyster JG. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. J Immunol. 2015;195(10):4781-91. Epub 2015/10/11.

97. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell. 2000;102(5):553-63. Epub 2000/09/28.

98. Gitlin AD, Shulman Z, Nussenzweig MC. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. Nature. 2014;509(7502):637-40. Epub 2014/05/09.

99. Gitlin AD, Mayer CT, Oliveira TY, Shulman Z, Jones MJ, Koren A, et al. HUMORAL IMMUNITY. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. Science. 2015;349(6248):643-6. Epub 2015/07/18.

100. Yeap LS, Hwang JK, Du Z, Meyers RM, Meng FL, Jakubauskaite A, et al. Sequence-Intrinsic Mechanisms that Target AID Mutational Outcomes on Antibody Genes. Cell. 2015;163(5):1124-37. Epub 2015/11/20.

101. Stewart I, Radtke D, Phillips B, McGowan SJ, Bannard O. Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry when Immunoglobulin Gene Mutations are Damaging. Immunity. 2018;49(3):477-89 e7. Epub 2018/09/21.

102. Bannard O, McGowan SJ, Ersching J, Ishido S, Victora GD, Shin JS, et al. Ubiquitin-mediated fluctuations in MHC class II facilitate efficient germinal center B cell responses. J Exp Med. 2016;213(6):993-1009. Epub 2016/05/11.

103. Shlomchik MJ, Luo W, Weisel F. Linking signaling and selection in the germinal center. Immunol Rev. 2019;288(1):49-63. Epub 2019/03/16.

104. Krautler NJ, Suan D, Butt D, Bourne K, Hermes JR, Chan TD, et al. Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. J Exp Med. 2017;214(5):1259-67. Epub 2017/04/02.

105. Luo W, Weisel F, Shlomchik MJ. B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. Immunity. 2018;48(2):313-26 e5. Epub 2018/02/06.

106. Ersching J, Efeyan A, Mesin L, Jacobsen JT, Pasqual G, Grabiner BC, et al. Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. Immunity. 2017;46(6):1045-58 e6. Epub 2017/06/22.

107. Mayer CT, Gazumyan A, Kara EE, Gitlin AD, Golijanin J, Viant C, et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. Science. 2017;358(6360):eaao2602. Epub 2017/09/25.

108. Luo W, Hawse W, Conter L, Trivedi N, Weisel F, Wikenheiser D, et al. The AKT kinase signaling network is rewired by PTEN to control proximal BCR signaling in germinal center B cells. Nat Immunol. 2019;20(6):736-46. Epub 2019/04/24.

109. Finkin S, Hartweger H, Oliveira TY, Kara EE, Nussenzweig MC. Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity. Immunity. 2019;51(2):324-36 e5. Epub 2019/07/28.

110. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. Nat Immunol. 2012;13(11):1083-91. Epub 2012/09/25.

111. Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Kochert K, Sleckman BP, et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. Nat Immunol. 2012;13(11):1092-100. Epub 2012/09/25.

112. Heinzel S, Binh Giang T, Kan A, Marchingo JM, Lye BK, Corcoran LM, et al. A Myc-dependent division timer complements a cell-death timer to regulate T cell and B cell responses. Nat Immunol. 2017;18(1):96-103. Epub 2016/11/08.

113. Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. Immunity. 2016;44(1):116-30. Epub 2016/01/23.

114. Phan TG, Paus D, Chan TD, Turner ML, Nutt SL, Basten A, et al. High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. J Exp Med. 2006;203(11):2419-24. Epub 2006/10/13.

115. Suan D, Krautler NJ, Maag JLV, Butt D, Bourne K, Hermes JR, et al. CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. Immunity. 2017;47(6):1142-53 e4. Epub 2017/12/21.

116. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. Nat Immunol. 2016;17(7):861-9. Epub 2016/05/10.

117. Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. J Immunol. 2000;165(10):5462-71. Epub 2000/11/09.

118. Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. J Exp Med. 2004;200(8):967-77. Epub 2004/10/20.

119. Radtke D, Bannard O. Expression of the Plasma Cell Transcriptional Regulator Blimp-1 by Dark Zone Germinal Center B Cells During Periods of Proliferation. Front Immunol. 2018;9(3106):3106. Epub 2019/01/29.

120. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. Nat Immunol. 2003;4(4):321-9. Epub 2003/03/04.

121. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol. 2015;15(3):160-71. Epub 2015/02/24.

122. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. Front Immunol. 2019;10(721):721. Epub 2019/04/27.

123. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. Front Immunol. 2019;10(965):965. Epub 2019/05/28.

124. Weisel F, Shlomchik M. Memory B Cells of Mice and Humans. Annu Rev Immunol. 2017;35(1):255-84. Epub 2017/02/02.

125. Allie SR, Bradley JE, Mudunuru U, Schultz MD, Graf BA, Lund FE, et al. The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. Nat Immunol. 2019;20(1):97-108. Epub 2018/12/05.

126. Moran I, Nguyen A, Khoo WH, Butt D, Bourne K, Young C, et al. Memory B cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes. Nat Commun. 2018;9(1):3372. Epub 2018/08/24.

127. Kwak K, Akkaya M, Pierce SK. B cell signaling in context. Nat Immunol. 2019;20(8):963-9. Epub 2019/07/10.

128. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. Science. 2007;315(5811):528-31. Epub 2006/12/23.

129. Papa I, Vinuesa CG. Synaptic Interactions in Germinal Centers. Front Immunol. 2018;9(1858):1858. Epub 2018/08/29.

130. Biram A, Davidzohn N, Shulman Z. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. Immunol Rev. 2019;288(1):37-48. Epub 2019/03/16.

131. Poudrier J, Owens T. CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. J Exp Med. 1994;179(5):1417-27. Epub 1994/05/01.

132. Cannons JL, Qi H, Lu KT, Dutta M, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. Immunity. 2010;32(2):253-65. Epub 2010/02/16.

133. Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, Ditoro D, Hansen K, et al. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). J Immunol. 2010;185(1):190-202. Epub 2010/06/08.

134. Kim J, Kim YM, Jeoung DI, Choe J. Human follicular dendritic cells promote the APC capability of B cells by enhancing CD86 expression levels. Cell Immunol. 2012;273(2):109-14. Epub 2012/02/11.

135. Liu D, Xu H, Shih C, Wan Z, Ma X, Ma W, et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. Nature. 2015;517(7533):214-8. Epub 2014/10/16.

136. Papa I, Saliba D, Ponzoni M, Bustamante S, Canete PF, Gonzalez-Figueroa P, et al. TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. Nature. 2017;547(7663):318-23. Epub 2017/07/13.

137. An HJ, Kim YJ, Song DH, Park BS, Kim HM, Lee JD, et al. Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. J Biol Chem. 2011;286(13):11226-35. Epub 2011/02/03.

138. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Immunol Rev. 2009;229(1):152-72. Epub 2009/05/12.

139. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol. 2000;67(1):2-17. Epub 2000/01/27.

140. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(14):6550-4. Epub 1992/07/15.

141. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci. 2001;58(1):4-43. Epub 2001/03/07.

142. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. Immunity. 1994;1(3):167-78. Epub 1994/06/01.

143. Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. J Immunol. 1995;155(2):556-67. Epub 1995/07/15.

144. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science. 1993;259(5097):990-3. Epub 1993/02/12.

145. Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan IC. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. J Exp Med. 1995;181(4):1293-301. Epub 1995/04/01.

146. Koguchi Y, Thauland TJ, Slifka MK, Parker DC. Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4+ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. Blood. 2007;110(7):2520-7. Epub 2007/06/28.

147. Koguchi Y, Buenafe AC, Thauland TJ, Gardell JL, Bivins-Smith ER, Jacoby DB, et al. Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD4+ 8- thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. PLoS One. 2012;7(2):e31296. Epub 2012/03/01.

148. Lesley R, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(28):10717-22. Epub 2006/07/04.

149. Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, Covey LR, Lee JJ, Sinning J, et al. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. J Immunol. 1994;152(2):598-608. Epub 1994/01/15.

150. Yacoub D, Benslimane N, Al-Zoobi L, Hassan G, Nadiri A, Mourad W. CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner. J Biol Chem. 2013;288(50):36083-93. Epub 2013/11/06.

151. Gardell JL, Parker DC. CD40L is transferred to antigen-presenting B cells during delivery of T-cell help. Eur J Immunol. 2017;47(1):41-50. Epub 2016/10/19.

152. Choudhuri K, Llodra J, Roth EW, Tsai J, Gordo S, Wucherpfennig KW, et al. Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. Nature. 2014;507(7490):118-23. Epub 2014/02/04.

153. Saliba DG, Cespedes-Donoso PF, Balint S, Compeer EB, Korobchevskaya K, Valvo S, et al. Composition and structure of synaptic ectosomes exporting antigen receptor linked to functional CD40 ligand from helper T cells. Elife. 2019;8:e47528. Epub 2019/08/31.

154. Grammer AC, Lipsky PE. CD40-Mediated Regulation of Immune Responses by TRAF-Dependent and TRAF-Independent Signaling Mechanisms. Dans: Dixon FJ, rédacteur. Adv Immunol: Academic Press; 2001. p. 61-178.

155. Lai JH, Luo SF, Ho LJ. Targeting the CD40-CD154 Signaling Pathway for Treatment of Autoimmune Arthritis. Cells. 2019;8(8):927. Epub 2019/08/21.

156. Hanissian SH, Geha RS. Jak3 Is Associated with CD40 and Is Critical for CD40 Induction of Gene Expression in B Cells. Immunity. 1997;6(4):379-87.

157. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, et al. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. Immunity. 2018;48(4):702-15 e4. Epub 2018/04/19.

158. Zhou JHS, Markham JF, Duffy KR, Hodgkin PD. Stochastically Timed Competition Between Division and Differentiation Fates Regulates the Transition From B Lymphoblast to Plasma Cell. Front Immunol. 2018;9(2053):2053. Epub 2018/09/27.

159. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayr T, Fechtner R, Scialdone A, et al. Epstein-Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(32):16046-55. Epub 2019/07/26.

160. Kieser A, Sterz KR. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). Curr Top Microbiol Immunol. 2015;391:119-49. Epub 2015/10/03.

161. Wang LW, Jiang S, Gewurz BE. Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Oncogenicity. J Virol. 2017;91(21):e01718-16. Epub 2017/08/25.

162. Gires O, Zimber-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. EMBO J. 1997;16(20):6131-40. Epub 1997/11/14.

163. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. Science. 2014;345(6200):1058-62. Epub 2014/08/30.

164. Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. Immunol Cell Biol. 2017;95(10):925-32. Epub 2017/09/07.

165. Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separably program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. Immunol Cell Biol. 2019;97(9):826-39. Epub 2019/07/06.

166. Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, Licona-Limon P, Esplugues E, Flavell R, et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. Nat Immunol. 2016;17(10):1197-205. Epub 2016/08/31.

167. Gonzalez DG, Cote CM, Patel JR, Smith CB, Zhang Y, Nickerson KM, et al. Nonredundant Roles of IL-21 and IL-4 in the Phased Initiation of Germinal Center B Cells and Subsequent Self-Renewal Transitions. J Immunol. 2018;201(12):3569-79. Epub 2018/11/18.

168. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. Front Immunol. 2018;9(888):888. Epub 2018/06/23.

169. Leonard WJ, Lin JX, O'Shea JJ. The gammac Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications. Immunity. 2019;50(4):832-50. Epub 2019/04/18.

170. Keegan AD, Zamorano J, Keselman A, Heller NM. IL-4 and IL-13 Receptor Signaling From 4PS to Insulin Receptor Substrate 2: There and Back Again, a Historical View. Front Immunol. 2018;9(1037):1037. Epub 2018/06/06.

171. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol. 1999;17(1):701-38. Epub 1999/06/08.

172. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. Immunol Res. 2011;50(1):87-96. Epub 2011/03/29.

173. Zamorano J, Wang HY, Wang LM, Pierce JH, Keegan AD. IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. J Immunol. 1996;157(11):4926-34. Epub 1996/12/01.

174. Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. J Biol Chem. 2002;277(30):27169-75. Epub 2002/05/25.

175. Granato A, Hayashi EA, Baptista BJ, Bellio M, Nobrega A. IL-4 regulates Bim expression and promotes B cell maturation in synergy with BAFF conferring resistance to cell death at negative selection checkpoints. J Immunol. 2014;192(12):5761-75. Epub 2014/05/20.

176. Dufort FJ, Bleiman BF, Gumina MR, Blair D, Wagner DJ, Roberts MF, et al. Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. J Immunol. 2007;179(8):4953-7. Epub 2007/10/04.

177. Xia F, Deng C, Jiang Y, Qu Y, Deng J, Cai Z, et al. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma. Autophagy. 2018;14(3):450-64. Epub 2018/01/04.

178. Thieu VT, Nguyen ET, McCarthy BP, Bruns HA, Kapur R, Chang CH, et al. IL-4-stimulated NF-kappaB activity is required for Stat6 DNA binding. J Leukoc Biol. 2007;82(2):370-9. Epub 2007/05/22.

179. Stack RM, Lenschow DJ, Gray GS, Bluestone JA, Fitch FW. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. J Immunol. 1994;152(12):5723-33. Epub 1994/06/15.

180. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat Immunol. 2009;10(4):385-93. Epub 2009/03/03.

181. Zhou C, Saxon A, Zhang K. Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. J Immunol. 2003;170(4):1887-93. Epub 2003/02/08.

182. Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. Int Immunol. 2004;16(3):395-404. Epub 2004/02/24.

183. Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. Front Immunol. 2014;5(65):65. Epub 2014/03/07.

184. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. J Immunol. 1991;147(1):8-13. Epub 1991/07/01.

185. Banchereau J, Rousset F. Functions of interleukin-4 on human B lymphocytes. Immunol Res. 1991;10(3-4):423-7. Epub 1991/01/01.

186. Banchereau J, de Paoli P, Valle A, Garcia E, Rousset F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. Science. 1991;251(4989):70-2. Epub 1991/01/04.

187. Rush JS, Hodgkin PD. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. Eur J Immunol. 2001;31(4):1150-9. Epub 2001/04/12.

188. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature. 2000;408(6808):57-63. Epub 2000/11/18.

189. Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(21):11439-44. Epub 2000/10/04.

190. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. J Immunol. 2004;173(1):68-78. Epub 2004/06/24.

191. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. Immunity. 2008;29(1):127-37. Epub 2008/07/08.

192. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(5):379-95. Epub 2014/04/23.

193. Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motallebnezhad M, Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. Immunobiology. 2016;221(2):357-67. Epub 2015/10/16.

194. Tangye SG, Ma CS. Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21. J Exp Med. 2020;217(1). Epub 2019/12/11.

195. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. Science. 2002;298(5598):1630-4. Epub 2002/11/26.

196. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. J Immunol. 2004;173(9):5361-71. Epub 2004/10/21.

197. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. J Immunol. 2004;172(9):5154-7. Epub 2004/04/22.

198. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. J Immunol. 2005;175(12):7867-79. Epub 2005/12/13.

199. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. J Immunol. 2007;179(12):8180-90. Epub 2007/12/07.

200. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. J Immunol. 2008;181(3):1767-79. Epub 2008/07/22.

201. Yang Z, Wu CM, Targ S, Allen CDC. IL-21 is a broad negative regulator of IgE class switch recombination in mouse and human B cells. J Exp Med. 2020;217(5). Epub 2020/03/05.

202. Avery DT, Ma CS, Bryant VL, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, et al. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. Blood. 2008;112(5):1784-93. Epub 2008/06/27.

203. Pene J, Guglielmi L, Gauchat JF, Harrer N, Woisetschlager M, Boulay V, et al. IFN-gamma-mediated inhibition of human IgE synthesis by IL-21 is associated with a polymorphism in the IL-21R gene. J Immunol. 2006;177(8):5006-13. Epub 2006/10/04.

204. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. J Immunol. 2006;177(8):5236-47. Epub 2006/10/04.

205. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. J Immunol. 2007;179(9):5886-96. Epub 2007/10/20.

206. Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. J Exp Med. 2010;207(1):155-71. Epub 2010/01/06.

207. Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, et al. IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. Blood. 2013;122(24):3940-50. Epub 2013/10/26.

208. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. J Exp Med. 2013;210(12):2739-53. Epub 2013/11/13.

209. de Totero D, Meazza R, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Colombo M, et al. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2006;107(9):3708-15. Epub 2006/01/05.

210. Konforte D, Paige CJ. Identification of cellular intermediates and molecular pathways induced by IL-21 in human B cells. J Immunol. 2006;177(12):8381-92. Epub 2006/12/05.

211. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. Blood. 2007;109(10):4135-42. Epub 2007/01/20.

212. Wu Y, van Besouw NM, Shi Y, Hoogduijn MJ, Wang L, Baan CC. The Biological Effects of IL-21 Signaling on B-Cell-Mediated Responses in Organ Transplantation. Front Immunol. 2016;7(319):319. Epub 2016/09/08.

213. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J Exp Med. 2010;207(2):365-78. Epub 2010/02/10.

214. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. J Exp Med. 2010;207(2):353-63. Epub 2010/02/10.

215. Chou C, Verbaro DJ, Tonc E, Holmgren M, Cella M, Colonna M, et al. The Transcription Factor AP4 Mediates Resolution of Chronic Viral Infection through Amplification of Germinal Center B Cell Responses. Immunity. 2016;45(3):570-82. Epub 2016/08/28.

216. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control. Immunity. 2000;13(2):199-212.

217. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. J Immunol. 2013;190(4):1827-36. Epub 2013/01/18.

218. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. Immunity. 2004;21(1):81-93. Epub 2004/09/04.

219. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. Immunity. 2002;17(1):51-62. Epub 2002/08/02.

220. Rodriguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Bernal J, Campos-Caro A, Brieva JA. Cutting edge: IL-21 derived from human follicular helper T cells acts as a survival factor for secondary lymphoid organ, but not for bone marrow, plasma cells. J Immunol. 2012;188(4):1578-81. Epub 2012/01/18.

221. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. J Immunol. 2004;173(1):657-65. Epub 2004/06/24.

222. Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. J Immunol. 2003;170(8):4111-8. Epub 2003/04/12.

223. Attridge K, Kenefeck R, Wardzinski L, Qureshi OS, Wang CJ, Manzotti C, et al. IL-21 promotes CD4 T cell responses by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of CD86 on B cells. J Immunol. 2014;192(5):2195-201. Epub 2014/01/29.

224. Doherty DG, Melo AM, Moreno-Olivera A, Solomos AC. Activation and Regulation of B Cell Responses by Invariant Natural Killer T Cells. Front Immunol. 2018;9(1360):1360. Epub 2018/07/04.

225. Leadbetter EA, Karlsson MCI. Reading the room: iNKT cells influence B cell responses. Mol Immunol. 2021;130:49-54. Epub 2020/12/29.

226. Leadbetter EA, Karlsson MCI. Invariant natural killer T cells balance B cell immunity. Immunol Rev. 2021;n/a(n/a). Epub 2021/01/14.

227. King IL, Amiel E, Tighe M, Mohrs K, Veerapen N, Besra G, et al. The mechanism of splenic invariant NKT cell activation dictates localization in vivo. J Immunol. 2013;191(2):572-82. Epub 2013/06/21.

228. Chang PP, Barral P, Fitch J, Pratama A, Ma CS, Kallies A, et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. Nat Immunol. 2011;13(1):35-43. Epub 2011/11/29.

229. Detre C, Keszei M, Garrido-Mesa N, Kis-Toth K, Castro W, Agyemang AF, et al. SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. Blood. 2012;120(1):122-9. Epub 2012/05/23.

230. Leadbetter EA, Brigl M, Illarionov P, Cohen N, Luteran MC, Pillai S, et al. NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(24):8339-44. Epub 2008/06/14.

231. King IL, Fortier A, Tighe M, Dibble J, Watts GF, Veerapen N, et al. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. Nat Immunol. 2011;13(1):44-50. Epub 2011/11/29.

232. Bai L, Deng S, Reboulet R, Mathew R, Teyton L, Savage PB, et al. Natural killer T (NKT)-B-cell interactions promote prolonged antibody responses and long-term memory to pneumococcal capsular polysaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(40):16097-102. Epub 2013/09/18.

233. Rampoldi F, Ullrich L, Prinz I. Revisiting the Interaction of gammadelta T-Cells and B-Cells. Cells. 2020;9(3):743. Epub 2020/03/22.

234. Liu Y, Zhang C. The Role of Human γδ T Cells in Anti-Tumor Immunity and Their Potential for Cancer Immunotherapy. Cells. 2020;9(5):1206.

235. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournie JJ, Meraviglia S, et al. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. J Immunol. 2006;177(8):5290-5. Epub 2006/10/04.

236. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M. IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help. Eur J Immunol. 2012;42(1):110-9. Epub 2011/10/20.

237. Petrasca A, Melo AM, Breen EP, Doherty DG. Human Vdelta3(+) gammadelta T cells induce maturation and IgM secretion by B cells. Immunol Lett. 2018;196:126-34. Epub 2018/02/14.

238. Payandeh Z, Bahrami AA, Hoseinpoor R, Mortazavi Y, Rajabibazl M, Rahimpour A, et al. The applications of anti-CD20 antibodies to treat various B cells disorders. Biomed Pharmacother. 2019;109:2415-26. Epub 2018/12/16.

239. Engel P, Gomez-Puerta JA, Ramos-Casals M, Lozano F, Bosch X. Therapeutic targeting of B cells for rheumatic autoimmune diseases. Pharmacol Rev. 2011;63(1):127-56. Epub 2011/01/20.

240. Gharibi T, Babaloo Z, Hosseini A, Marofi F, Ebrahimi-Kalan A, Jahandideh S, et al. The role of B cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Immunology. 2020;160(4):325-35. Epub 2020/04/07.

241. Fillatreau S. B cells and their cytokine activities implications in human diseases. Clin Immunol. 2018;186:26-31. Epub 2017/07/25.

242. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. Nat Rev Immunol. 2015;15(7):441-51. Epub 2015/06/13.

243. Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, et al. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. J Exp Med. 1999;189(1):159-68. Epub 1999/01/05.

244. Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. J Exp Med. 1998;187(7):1009-18. Epub 1998/05/16.

245. Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J Exp Med. 1998;187(7):997-1007. Epub 1998/05/16.

246. Tumanov A, Kuprash D, Lagarkova M, Grivennikov S, Abe K, Shakhov A, et al. Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. Immunity. 2002;17(3):239-50. Epub 2002/10/02.

247. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature. 2000;406(6793):309-14. Epub 2000/08/05.

248. Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG. Splenic T zone development is B cell dependent. J Exp Med. 2001;194(11):1649-60. Epub 2001/12/26.

249. Tumanov AV, Grivennikov SI, Kruglov AA, Shebzukhov YV, Koroleva EP, Piao Y, et al. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. Blood. 2010;116(18):3456-64. Epub 2010/07/17.

250. Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, et al. Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway. Blood. 2010;115(23):4725-33. Epub 2010/02/27.

251. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. J Exp Med. 2011;208(1):125-34. Epub 2010/12/22.

252. Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. Immunity. 2000;12(5):471-81. Epub 2000/06/08.

253. Alsughayyir J, Pettigrew GJ, Motallebzadeh R. Spoiling for a Fight: B Lymphocytes As Initiator and Effector Populations within Tertiary Lymphoid Organs in Autoimmunity and Transplantation. Front Immunol. 2017;8(1639):1639. Epub 2017/12/09.

254. Germain C, Gnjatic S, Dieu-Nosjean MC. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. Front Immunol. 2015;6(67):67. Epub 2015/03/11.

255. Jones GW, Hill DG, Jones SA. Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together. Front Immunol. 2016;7(401):401. Epub 2016/10/19.

256. Hughes CE, Benson RA, Bedaj M, Maffia P. Antigen-Presenting Cells and Antigen Presentation in Tertiary Lymphoid Organs. Front Immunol. 2016;7(481):481. Epub 2016/11/23.

257. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2014;14(7):447-62. Epub 2014/06/21.

258. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. Nature. 2020;577(7791):561-5. Epub 2020/01/17.

259. Petitprez F, de Reynies A, Keung EZ, Chen TW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. Nature. 2020;577(7791):556-60. Epub 2020/01/17.

260. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. Nature. 2020;577(7791):549-55. Epub 2020/01/17.

261. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat Immunol. 2000;1(6):475-82. Epub 2001/03/23.

262. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. J Immunol. 2005;174(11):6781-90. Epub 2005/05/21.

263. Li R, Rezk A, Li H, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A, et al. Antibody-Independent Function of Human B Cells Contributes to Antifungal T Cell Responses. J Immunol. 2017;198(8):3245-54. Epub 2017/03/10.

264. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. J Clin Invest. 2017;127(3):772-9. Epub 2017/03/02.

265. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. Immunity. 2015;42(4):607-12. Epub 2015/04/23.

266. Peng B, Ming Y, Yang C. Regulatory B cells: the cutting edge of immune tolerance in kidney transplantation. Cell Death Dis. 2018;9(2):109. Epub 2018/01/27.

267. Rosser EC, Blair PA, Mauri C. Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. Mol Immunol. 2014;62(2):296-304. Epub 2014/02/22.

268. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. Nature. 2014;507(7492):366-70. Epub 2014/02/28.

269. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol. 2001;167(2):1081-9. Epub 2001/07/07.

270. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev YV, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. Nat Med. 2014;20(6):633-41. Epub 2014/04/20.

271. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2008;56(2):77-83. Epub 2008/04/01.

272. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung SC, et al. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. Front Immunol. 2017;8(319):319. Epub 2017/04/08.

273. Hua Z, Hou B. The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4+ T cell response. Immunol Rev. 2020;296(1):24-35. Epub 2020/04/19.

274. Dubois Cauwelaert N, Baldwin SL, Orr MT, Desbien AL, Gage E, Hofmeyer KA, et al. Antigen presentation by B cells guides programing of memory CD4(+) T-cell responses to a TLR4-agonist containing vaccine in mice. Eur J Immunol. 2016;46(12):2719-29. Epub 2016/10/05.

275. Perera J, Meng L, Meng F, Huang H. Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(42):17011-6. Epub 2013/10/02.

276. Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, et al. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. Immunity. 2015;42(6):1048-61. Epub 2015/06/14.

277. Perera J, Zheng Z, Li S, Gudjonson H, Kalinina O, Benichou JIC, et al. Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance. Cell Rep. 2016;17(2):387-98. Epub 2016/10/06.

278. Getahun A, Cambier JC. Non-Antibody-Secreting Functions of B Cells and Their Contribution to Autoimmune Disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2019;35(1):337-56. Epub 2019/03/19.

279. Zeng Q, Ng YH, Singh T, Jiang K, Sheriff KA, Ippolito R, et al. B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production. J Clin Invest. 2014;124(3):1052-6. Epub 2014/02/11.

280. Chong AS. B cells as antigen-presenting cells in transplantation rejection and tolerance. Cell Immunol. 2020;349:104061. Epub 2020/02/16.

281. Banchereau J, Rousset F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. Nature. 1991;353(6345):678-9. Epub 1991/10/17.

282. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, et al. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. J Clin Invest. 1997;100(11):2757-65. Epub 1998/02/12.

283. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B Lymphocytes Pulsed with Tumor Antigens Are Effective Antigen-presenting Cells That Can Generate Specific T Cells. Cancer Res. 2003;63(11):2836-43.

284. von Bergwelt-Baildon M, Schultze JL, Maecker B, Menezes I, Nadler LM. Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. Cancer Res 2003;63:2836-43. Cancer Res. 2004;64(11):4055-6; author reply 6-7. Epub 2004/06/03.

285. von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, Butler MO, et al. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by

means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. Blood. 2002;99(9):3319-25. Epub 2002/04/20.

286. Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin JF, Boulet S, Lapointe R, Labrecque N. CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naive CD8+ T cells to generate effector but not memory T cells. PLoS One. 2012;7(1):e30139. Epub 2012/02/01.

287. Su KY, Watanabe A, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. J Immunol. 2016;197(10):4163-76. Epub 2016/11/07.

288. Doucet JD, Forget MA, Grange C, Rouxel RN, Arbour N, von Messling V, et al. Endogenously expressed matrix protein M1 and nucleoprotein of influenza A are efficiently presented by class I and class II major histocompatibility complexes. J Gen Virol. 2011;92(Pt 5):1162-71. Epub 2011/02/11.

289. Shen SN, Xu Z, Qian XP, Ding YT, Yu LX, Liu BR. RNA-electroporated CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against HepG2 cells. Eur J Cancer Care (Engl). 2008;17(4):404-11. Epub 2008/05/20.

290. Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA, Vonderheide RH. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. Blood. 2004;103(6):2046-54. Epub 2003/11/25.

291. Wennhold K, Shimabukuro-Vornhagen A, von Bergwelt-Baildon M. B Cell-Based Cancer Immunotherapy. Transfus Med Hemother. 2019;46(1):36-46. Epub 2019/06/28.

292. Wennhold K, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, von Bergwelt-Baildon M. CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: the final sprint toward clinical application. Expert Rev Vaccines. 2013;12(6):631-7. Epub 2013/06/12.

293. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2018;9(3176):3176. Epub 2019/02/06.

294. Bol KF, Schreibelt G, Rabold K, Wculek SK, Schwarze JK, Dzionek A, et al. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells. J Immunother Cancer. 2019;7(1):109. Epub 2019/04/20.

295. Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaft LE. Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. Front Immunol. 2019;10:766. Epub 2019/04/30.

296. Boudreau G, Carli C, Lamarche C, Rulleau C, Bonnaure G, Neron S, et al. Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for the manufacturing of T-cell therapeutics. Transfusion. 2019;59(4):1300-11. Epub 2018/12/28.

297. Carreno BM, Becker-Hapak M, Huang A, Chan M, Alyasiry A, Lie WR, et al. IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. J Clin Invest. 2013;123(8):3383-94. Epub 2013/07/23.

298. Sauter A, Yi DH, Li Y, Roersma S, Appel S. The Culture Dish Surface Influences the Phenotype and Cytokine Production of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. Front Immunol. 2019;10(2352):2352. Epub 2019/10/22.

299. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. Immunology. 2018;154(1):3-20. Epub 2018/01/10.

300. Ahmadi T, Flies A, Efebera Y, Sherr DH. CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. Immunology. 2008;124(1):129-40. Epub 2007/12/11.

301. Wennhold K, Weber TM, Klein-Gonzalez N, Thelen M, Garcia-Marquez M, Chakupurakal G, et al. CD40-activated B cells induce anti-tumor immunity in vivo. Oncotarget. 2017;8(17):27740-53. Epub 2016/03/05.

302. Kondo E, Gryschok L, Klein-Gonzalez N, Rademacher S, Weihrauch MR, Liebig T, et al. CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. Clin Exp Immunol. 2009;155(2):249-56. Epub 2008/12/02.

303. von Bergwelt-Baildon M, Shimabukuro-Vornhagen A, Popov A, Klein-Gonzalez N, Fiore F, Debey S, et al. CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. Blood. 2006;107(7):2786-9. Epub 2005/12/17.

304. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. Trends Biochem Sci. 2018;43(2):108-23. Epub 2017/12/23.

305. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2018;18(8):485-97. Epub 2018/05/24.

306. Iberg CA, Hawiger D. Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells. J Immunol. 2020;204(4):733-44. Epub 2020/02/06.

307. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. Front Immunol. 2018;9(1643):1643. Epub 2018/08/01.

308. Rhodes JW, Tong O, Harman AN, Turville SG. Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection. Front Immunol. 2019;10(1088):1088. Epub 2019/06/04.

309. Fu C, Jiang A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. Front Immunol. 2018;9(3059):3059. Epub 2019/01/09.

310. Sanchez-Paulete AR, Teijeira A, Cueto FJ, Garasa S, Perez-Gracia JL, Sanchez-Arraez A, et al. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. Ann Oncol. 2017;28(suppl_12):xii44-xii55. Epub 2017/09/26.

311. Theisen D, Murphy K. The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation. F1000Res. 2017;6:98. Epub 2017/02/12.

312. Kuhn S, Yang J, Ronchese F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8(+) T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. Front Immunol. 2015;6(584):584. Epub 2015/12/05.

313. Shin KS, Jeon I, Kim BS, Kim IK, Park YJ, Koh CH, et al. Monocyte-Derived Dendritic Cells Dictate the Memory Differentiation of CD8(+) T Cells During Acute Infection. Front Immunol. 2019;10(1887):1887. Epub 2019/09/03.

314. Damle NK, Doyle LV, Grosmaire LS, Ledbetter JA. Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes. J Immunol. 1988;140(6):1753-61. Epub 1988/03/15.

315. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. Immunity. 2016;44(5):973-88. Epub 2016/05/19.

316. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J Exp Med. 1987;165(2):302-19. Epub 1987/02/01.

317. Schwartz RH. T cell anergy. Annu Rev Immunol. 2003;21(1):305-34. Epub 2002/12/10.

318. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. Immunol Rev. 2009;229(1):5-11. Epub 2009/05/12.

319. Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. Immunotargets Ther. 2018;7:55-61. Epub 2018/07/11.

320. Shin CA, Cho HW, Shin AR, Sohn HJ, Cho HI, Kim TG. Co-expression of CD40L with CD70 or OX40L increases B-cell viability and antitumor efficacy. Oncotarget. 2016;7(29):46173-86. Epub 2016/06/22.

321. Lee J, Dollins CM, Boczkowski D, Sullenger BA, Nair S. Activated B cells modified by electroporation of multiple mRNAs encoding immune stimulatory molecules are comparable to mature dendritic cells in inducing in vitro antigen-specific T-cell responses. Immunology. 2008;125(2):229-40. Epub 2008/04/09.

322. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol. 2013;13(4):227-42. Epub 2013/03/09.

323. Saito T. Molecular Dynamics of Co-signal Molecules in T-Cell Activation. Dans: Azuma M, Yagita H, rédacteurs. Co-signal Molecules in T Cell Activation: Immune Regulation in Health and Disease. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 135-52.

324. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, et al. Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4⁺and CD8⁺T Cells. The Journal of Immunology. 1999;162(6):3256-62.

325. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. J Immunol. 2005;174(8):4465-9. Epub 2005/04/09.

326. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat Immunol. 2015;16(4):343-53. Epub 2015/03/20.

327. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature. 1998;393(6684):480-3. Epub 1998/06/12.

328. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nat Rev Immunol. 2015;15(8):471-85. Epub 2015/07/15.

329. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. 2016;37(11):724-37. Epub 2016/09/12.

330. Blander JM. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. Annu Rev Immunol. 2018;36(1):717-53. Epub 2018/03/01.

331. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. Nat Rev Immunol. 2009;9(12):833-44. Epub 2009/11/26.

332. Murata S, Takahama Y, Kasahara M, Tanaka K. The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. Nat Immunol. 2018;19(9):923-31. Epub 2018/08/15.

333. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell. 1994;78(5):761-71.

334. Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, et al. Peptide Diffusion, Protection, and Degradation in Nuclear and Cytoplasmic Compartments before Antigen Presentation by MHC Class I. Immunity. 2003;18(1):97-108.

335. Lazaro S, Gamarra D, Del Val M. Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome. Mol Immunol. 2015;68(2 Pt A):72-6. Epub 2015/05/27.

336. Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(19):9130-4. Epub 1993/10/01.

337. Trowitzsch S, Tampe R. ABC Transporters in Dynamic Macromolecular Assemblies. J Mol Biol. 2018;430(22):4481-95. Epub 2018/08/09.

338. Mavridis G, Arya R, Domnick A, Zoidakis J, Makridakis M, Vlahou A, et al. A systematic re-examination of processing of MHCI-bound antigenic peptide precursors by endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. J Biol Chem. 2020;295(21):7193-210. Epub 2020/03/19.

339. Trowitzsch S, Tampe R. Multifunctional Chaperone and Quality Control Complexes in Adaptive Immunity. Annu Rev Biophys. 2020;49(1):135-61. Epub 2020/02/01.

340. Fleischmann G, Fisette O, Thomas C, Wieneke R, Tumulka F, Schneeweiss C, et al. Mechanistic Basis for Epitope Proofreading in the Peptide-Loading Complex. J Immunol. 2015;195(9):4503-13. Epub 2015/09/30.

341. Koopmann J-O, Albring J, Hüter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, et al. Export of Antigenic Peptides from the Endoplasmic Reticulum Intersects with Retrograde Protein Translocation through the Sec61p Channel. Immunity. 2000;13(1):117-27.

342. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(5):1896-901. Epub 1997/03/04.

343. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol. 2015;15(4):203-16. Epub 2015/02/28.

344. Wosen JE, Mukhopadhyay D, Macaubas C, Mellins ED. Epithelial MHC Class II Expression and Its Role in Antigen Presentation in the Gastrointestinal and Respiratory Tracts. Front Immunol. 2018;9(2144):2144. Epub 2018/10/16.

345. Neefjes J. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. Eur J Immunol. 1999;29(5):1421-5. Epub 1999/06/08.

346. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. Nature. 1990;345(6276):615-8. Epub 1990/06/14.

347. Cloutier M, Gauthier C, Fortin JS, Thibodeau J. The invariant chain p35 isoform promotes formation of nonameric complexes with MHC II molecules. Immunol Cell Biol. 2014;92(6):553-6. Epub 2014/03/19.

348. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol. 2011;11(12):823-36. Epub 2011/11/15.

349. Lankar D, Vincent-Schneider H, Briken V, Yokozeki T, Raposo G, Bonnerot C. Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. J Exp Med. 2002;195(4):461-72. Epub 2002/02/21.

350. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, et al. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. Immunity. 1999;10(2):197-206. Epub 1999/03/11.

351. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces clip dissociation from MHC class II αβ dimers and facilitates peptide loading. Cell. 1995;82(1):155-65.

352. Welsh R, Song N, Sadegh-Nasseri S. What to do with HLA-DO/H-2O two decades later? Immunogenetics. 2019;71(3):189-96. Epub 2019/01/27.

353. Jiang W, Adler LN, Macmillan H, Mellins ED. Synergy between B cell receptor/antigen uptake and MHCII peptide editing relies on HLA-DO tuning. Sci Rep. 2019;9(1):13877. Epub 2019/09/27.

354. Chen X, Laur O, Kambayashi T, Li S, Bray RA, Weber DA, et al. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. J Exp Med. 2002;195(8):1053-62. Epub 2002/04/17.

355. Glazier KS, Hake SB, Tobin HM, Chadburn A, Schattner EJ, Denzin LK. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. J Exp Med. 2002;195(8):1063-9. Epub 2002/04/17.

356. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. J Exp Med. 1976;143(5):1283-8. Epub 1976/05/01.

357. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. Cell. 2006;126(1):205-18. Epub 2006/07/15.

358. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. Immunity. 2009;30(4):544-55. Epub 2009/03/31.

359. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. Science. 2007;315(5808):107-11. Epub 2007/01/06.

360. Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. J Exp Med. 2013;210(5):1035-47. Epub 2013/04/10.

361. Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? Front Immunol. 2018;9(2874):2874. Epub 2019/01/09.

362. Leclerc D, Beauseigle D, Denis J, Morin H, Pare C, Lamarre A, et al. Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells. J Virol. 2007;81(3):1319-26. Epub 2006/11/24.

363. Hanafi LA, Bolduc M, Gagne ME, Dufour F, Langelier Y, Boulassel MR, et al. Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes. Vaccine. 2010;28(34):5617-26. Epub 2010/07/06.

364. Dasari V, Rehan S, Tey SK, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. Autophagy and proteasome interconnect to coordinate cross-presentation through MHC class I pathway in B cells. Immunol Cell Biol. 2016;94(10):964-74. Epub 2016/06/15.

365. Marino E, Tan B, Binge L, Mackay CR, Grey ST. B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. Diabetes. 2012;61(11):2893-905. Epub 2012/07/26.

366. de Wit J, Souwer Y, Jorritsma T, Klaasse Bos H, ten Brinke A, Neefjes J, et al. Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed Salmonella through cross-presentation. PLoS One. 2010;5(9):e13016. Epub 2010/10/05.

367. Hon H, Oran A, Brocker T, Jacob J. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. J Immunol. 2005;174(9):5233-42. Epub 2005/04/22.

368. Ritchie DS, Yang J, Hermans IF, Ronchese F. B-Lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8(+) T-cells. Scand J Immunol. 2004;60(6):543-51. Epub 2004/12/09.

369. Heit A, Huster KM, Schmitz F, Schiemann M, Busch DH, Wagner H. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. J Immunol. 2004;172(3):1501-7. Epub 2004/01/22.

370. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. Nature. 2003;425(6956):397-402. Epub 2003/09/26.

371. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. Nature. 2003;425(6956):402-6. Epub 2003/09/26.

372. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. Science. 1995;267(5195):243-6. Epub 1995/01/13.

373. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, et al. Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. Cell. 2002;110(1):119-31.

374. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. Cell. 2011;147(6):1355-68. Epub 2011/12/14.

375. Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. Nat Immunol. 2008;9(5):558-66. Epub 2008/04/01.

376. Fiegl D, Kagebein D, Liebler-Tenorio EM, Weisser T, Sens M, Gutjahr M, et al. Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. J Immunol. 2013;190(6):2791-806. Epub 2013/02/19.

377. Nair-Gupta P, Baccarini A, Tung N, Seyffer F, Florey O, Huang Y, et al. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. Cell. 2014;158(3):506-21. Epub 2014/08/02.

378. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. Science. 2009;325(5937):213-7. Epub 2009/06/06.

379. Sengupta D, Graham M, Liu X, Cresswell P. Proteasomal degradation within endocytic organelles mediates antigen cross-presentation. EMBO J. 2019;38(16):e99266. Epub 2019/07/05.

380. Gros M, Amigorena S. Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation. Front Immunol. 2019;10(41):41. Epub 2019/02/13.

381. Giodini A, Cresswell P. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. EMBO J. 2008;27(1):201-11. Epub 2007/11/30.

382. Singh R, Cresswell P. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. Science. 2010;328(5984):1394-8. Epub 2010/06/12.

383. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. Immunity. 2006;25(4):607-17. Epub 2006/10/10.

384. Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. Int Immunol. 2005;17(1):45-53. Epub 2004/11/18.

385. Zehner M, Marschall AL, Bos E, Schloetel JG, Kreer C, Fehrenschild D, et al. The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. Immunity. 2015;42(5):850-63. Epub 2015/05/17.

386. Grotzke JE, Cresswell P. Are ERAD components involved in cross-presentation? Mol Immunol. 2015;68(2 Pt A):112-5. Epub 2015/05/26.

387. Zehner M, Chasan AI, Schuette V, Embgenbroich M, Quast T, Kolanus W, et al. Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(24):9933-8. Epub 2011/06/02.

388. Menager J, Ebstein F, Oger R, Hulin P, Nedellec S, Duverger E, et al. Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. PLoS One. 2014;9(2):e89897. Epub 2014/03/04.

389. Dingjan I, Verboogen DR, Paardekooper LM, Revelo NH, Sittig SP, Visser LJ, et al. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. Sci Rep. 2016;6(1):22064. Epub 2016/02/26.

390. Ma W, Stroobant V, Heirman C, Sun Z, Thielemans K, Mulder A, et al. The Vacuolar Pathway of Long Peptide Cross-Presentation Can Be TAP Dependent. J Immunol. 2019;202(2):451-9. Epub 2018/12/19.

391. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. Immunity. 2004;21(2):155-65. Epub 2004/08/17.

392. Saveanu L, Babdor J, Lawand M, van Endert P. Insulin-regulated aminopeptidase and its compartment in dendritic cells. Mol Immunol. 2013;55(2):153-5. Epub 2012/11/06.

393. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. Nat Immunol. 2008;9(5):551-7. Epub 2008/04/01.

394. Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, Hirohashi Y, et al. Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. J Immunol. 2007;179(3):1803-13. Epub 2007/07/21.

395. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. J Immunol. 2006;177(6):3525-33. Epub 2006/09/05.

396. Chen L, Jondal M. TLR9 activation increases TAP-independent vesicular MHC class I processing in vivo. Scand J Immunol. 2009;70(5):431-8. Epub 2009/10/31.

397. Ma W, Zhang Y, Vigneron N, Stroobant V, Thielemans K, van der Bruggen P, et al. Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. J Immunol. 2016;196(4):1711-20. Epub 2016/01/23.

398. Tang-Huau TL, Gueguen P, Goudot C, Durand M, Bohec M, Baulande S, et al. Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. Nat Commun. 2018;9(1):2570. Epub 2018/07/04.

399. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(6):365-81. Epub 2018/04/08.

400. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(6):349-64. Epub 2018/04/06.

401. Yang Y, Klionsky DJ. Autophagy and disease: unanswered questions. Cell Death Differ. 2020;27(3):858-71. Epub 2020/01/05.

402. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol. 2011;13(2):132-41. Epub 2011/01/25.

403. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nat Cell Biol. 2013;15(7):741-50. Epub 2013/05/21.

404. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. Nat Cell Biol. 2009;11(4):468-76. Epub 2009/03/10.

405. Nascimbeni AC, Giordano F, Dupont N, Grasso D, Vaccaro MI, Codogno P, et al. ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. EMBO J. 2017;36(14):2018-33. Epub 2017/05/28.

406. Klionsky DJ, Schulman BA. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. Nat Struct Mol Biol. 2014;21(4):336-45. Epub 2014/04/05.

407. Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. Mol Cell. 2014;55(2):238-52. Epub 2014/06/24.

408. Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, et al. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Nat Struct Mol Biol. 2013;20(4):433-9. Epub 2013/03/19.

409. Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. J Cell Biol. 2012;198(2):219-33. Epub 2012/07/25.

410. Kriegenburg F, Ungermann C, Reggiori F. Coordination of Autophagosome-Lysosome Fusion by Atg8 Family Members. Curr Biol. 2018;28(8):R512-R8. Epub 2018/04/25.

411. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016;12(1):1-222. Epub 2016/01/23.

412. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Munz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. Nat Immunol. 2015;16(10):1014-24. Epub 2015/09/19.

413. Arbogast F, Arnold J, Hammann P, Kuhn L, Chicher J, Murera D, et al. ATG5 is required for B cell polarization and presentation of particulate antigens. Autophagy. 2019;15(2):280-94. Epub 2018/09/11.

414. Sandoval H, Kodali S, Wang J. Regulation of B cell fate, survival, and function by mitochondria and autophagy. Mitochondrion. 2018;41:58-65. Epub 2017/11/28.

415. Galluzzi L, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. Cell. 2019;177(7):1682-99. Epub 2019/06/15.

416. Munz C. Autophagy proteins influence endocytosis for MHC restricted antigen presentation. Semin Cancer Biol. 2020;66:110-5. Epub 2019/04/01.

417. Munz C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. Trends Immunol. 2016;37(11):755-63. Epub 2016/09/27.

418. Van Kaer L, Parekh VV, Postoak JL, Wu L. Role of autophagy in MHC class I-restricted antigen presentation. Mol Immunol. 2019;113:2-5. Epub 2017/11/12.

419. English L, Chemali M, Desjardins M. Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. Autophagy. 2009;5(7):1026-9. Epub 2009/06/27.

420. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. Nat Immunol. 2009;10(5):480-7. Epub 2009/03/24.

421. Budida R, Stankov MV, Dohner K, Buch A, Panayotova-Dimitrova D, Tappe KA, et al. Herpes simplex virus 1 interferes with autophagy of murine dendritic cells and impairs their ability to stimulate CD8(+) T lymphocytes. Eur J Immunol. 2017;47(10):1819-34. Epub 2017/08/05.

422. Tey SK, Khanna R. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. Blood. 2012;120(5):994-1004. Epub 2012/06/23.

423. Das M, Kaveri SV, Bayry J. Cross-presentation of antigens by dendritic cells: role of autophagy. Oncotarget. 2015;6(30):28527-8. Epub 2015/09/05.

424. Joubert PE, Albert ML. Antigen Cross-Priming of Cell-Associated Proteins is Enhanced by Macroautophagy within the Antigen Donor Cell. Front Immunol. 2012;3(61):61. Epub 2012/05/09.

425. Li Y, Wang LX, Yang G, Hao F, Urba WJ, Hu HM. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. Cancer Res. 2008;68(17):6889-95. Epub 2008/09/02.

426. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. Cell Death Differ. 2009;16(7):991-1005. Epub 2009/02/21.

427. Mintern JD, Macri C, Chin WJ, Panozza SE, Segura E, Patterson NL, et al. Differential use of autophagy by primary dendritic cells specialized in cross-presentation. Autophagy. 2015;11(6):906-17. Epub 2015/05/08.

428. Parekh VV, Pabbisetty SK, Wu L, Sebzda E, Martinez J, Zhang J, et al. Autophagy-related protein Vps34 controls the homeostasis and function of antigen cross-presenting CD8alpha(+) dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(31):E6371-E80. Epub 2017/07/19.

429. Schmid D, Pypaert M, Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. Immunity. 2007;26(1):79-92. Epub 2006/12/22.

430. Li H, Li Y, Jiao J, Hu HM. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. Nat Nanotechnol. 2011;6(10):645-50. Epub 2011/09/20.

431. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, Paharkova-Vatchkova V, et al. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. Eur J Immunol. 2001;31(5):1485-94. Epub 2001/07/24.

432. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(22):7922-7. Epub 2005/05/17.

433. Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, et al. Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. Nat Commun. 2013;4(1):2039. Epub 2013/06/21.

434. Jin Y, Sun C, Feng L, Li P, Xiao L, Ren Y, et al. Regulation of SIV antigen-specific CD4+ T cellular immunity via autophagosome-mediated MHC II molecule-targeting antigen presentation in mice. PLoS One. 2014;9(3):e93143. Epub 2014/03/29.

435. Coulon PG, Richetta C, Rouers A, Blanchet FP, Urrutia A, Guerbois M, et al. HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4+ T Cells. J Immunol. 2016;197(2):517-32. Epub 2016/06/12.

436. Fonteneau JF, Brilot F, Munz C, Gannage M. The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. J Immunol. 2016;196(1):64-71. Epub 2015/11/27.

437. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. Eur J Immunol. 2003;33(5):1250-9. Epub 2003/05/06.

438. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. Science. 2005;307(5709):593-6. Epub 2004/12/14.

439. Leung CS, Haigh TA, Mackay LK, Rickinson AB, Taylor GS. Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(5):2165-70. Epub 2010/02/06.

440. Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A, et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. Immunity. 2010;32(2):227-39. Epub 2010/02/23.

441. Saini NK, Baena A, Ng TW, Venkataswamy MM, Kennedy SC, Kunnath-Velayudhan S, et al. Suppression of autophagy and antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS47. Nat Microbiol. 2016;1(9):16133. Epub 2016/08/27.

442. Gobeil PA, Leib DA. Herpes simplex virus gamma34.5 interferes with autophagosome maturation and antigen presentation in dendritic cells. mBio. 2012;3(5):e00267-12. Epub 2012/10/18.

443. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. Nature. 2008;455(7211):396-400. Epub 2008/08/15.

444. Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. J Exp Med. 2013;210(2):287-300. Epub 2013/02/06.

445. Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, et al. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. J Immunol. 2009;183(11):7278-85. Epub 2009/11/17.

446. Tao S, Drexler I. Targeting Autophagy in Innate Immune Cells: Angel or Demon During Infection and Vaccination? Front Immunol. 2020;11(460):460. Epub 2020/04/09.

447. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. Nat Rev Microbiol. 2011;9(12):889-93. Epub 2011/10/04.

448. Singh A. Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines. Nat Nanotechnol. 2021;16(1):16-24. Epub 2020/11/18.

449. Richardson JS, Dekker JD, Croyle MA, Kobinger GP. Recent advances in Ebolavirus vaccine development. Hum Vaccin. 2010;6(6):439-49. Epub 2010/07/31.

450. Acosta PL, Caballero MT, Polack FP. Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. Clin Vaccine Immunol. 2015;23(3):189-95. Epub 2015/12/18.

451. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. Chem Rev. 2020;120(6):3210-29. Epub 2019/12/06.

452. Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. Chem Sci. 2016;7(2):842-54. Epub 2016/02/01.

453. Lei Y, Zhao F, Shao J, Li Y, Li S, Chang H, et al. Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. PeerJ. 2019;6:e6185. Epub 2019/01/19.

454. Nanishi E, Dowling DJ, Levy O. Toward precision adjuvants: optimizing science and safety. Curr Opin Pediatr. 2020;32(1):125-38. Epub 2020/01/07.

455. Hobernik D, Bros M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? Int J Mol Sci. 2018;19(11):3605. Epub 2018/11/18.

456. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. Front Immunol. 2019;10(594):594. Epub 2019/04/12.

457. Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. Front Immunol. 2018;9(1963):1963. Epub 2018/10/05.

458. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. Expert Rev Vaccines. 2016;15(3):313-29. Epub 2015/12/29.

459. Jahanafrooz Z, Baradaran B, Mosafer J, Hashemzaei M, Rezaei T, Mokhtarzadeh A, et al. Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. Drug Discov Today. 2020;25(3):552-60. Epub 2019/12/18.

460. Lopes A, Vandermeulen G, Preat V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):146. Epub 2019/04/07.

461. Trimble CL, Morrow MP, Kraynyak KA, Shen X, Dallas M, Yan J, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. Lancet. 2015;386(10008):2078-88. Epub 2015/09/21.

462. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. Mol Ther. 2019;27(4):710-28. Epub 2019/03/09.

463. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov. 2018;17(4):261-79. Epub 2018/01/13.

464. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Lower M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. Nature. 2017;547(7662):222-6. Epub 2017/07/06.

465. Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. NPJ Vaccines. 2020;5:11. Epub 2020/02/13.

466. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. Mol Ther. 2019;27(4):757-72. Epub 2019/02/26.

467. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2014;14(8):559-67. Epub 2014/07/06.

468. Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. Hum Vaccin Immunother. 2018;14(4):839-46. Epub 2018/02/09.

469. Mondal M, Guo J, He P, Zhou D. Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. Hum Vaccin Immunother. 2020;16(10):2389-402. Epub 2020/02/23.

470. Roy S, Sethi TK, Taylor D, Kim YJ, Johnson DB. Breakthrough concepts in immune-oncology: Cancer vaccines at the bedside. J Leukoc Biol. 2020;108(4):1455-89. Epub 2020/06/20.

471. Small EJ, Sacks N, Nemunaitis J, Urba WJ, Dula E, Centeno AS, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor--secreting allogeneic cellular immunotherapy for hormone-refractory prostate cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(13):3883-91. Epub 2007/07/04.

472. Lipson EJ, Sharfman WH, Chen S, McMiller TL, Pritchard TS, Salas JT, et al. Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. J Transl Med. 2015;13(1):214. Epub 2015/07/06.

473. Laheru D, Lutz E, Burke J, Biedrzycki B, Solt S, Onners B, et al. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide for metastatic pancreatic cancer: a pilot study of safety, feasibility, and immune activation. Clin Cancer Res. 2008;14(5):1455-63. Epub 2008/03/05.

474. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, et al. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. J Clin Oncol. 2003;21(4):624-30. Epub 2003/02/15.

475. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. NPJ Vaccines. 2019;4(1):7. Epub 2019/02/19.

476. Wu AA, Bever KM, Ho WJ, Fertig EJ, Niu N, Zheng L, et al. A Phase II Study of Allogeneic GM-CSF-Transfected Pancreatic Tumor Vaccine (GVAX) with Ipilimumab as Maintenance Treatment for Metastatic Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res. 2020;26(19):5129-39. Epub 2020/06/28.

477. Yarchoan M, Huang CY, Zhu Q, Ferguson AK, Durham JN, Anders RA, et al. A phase 2 study of GVAX colon vaccine with cyclophosphamide and pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient advanced colorectal cancer. Cancer Med. 2020;9(4):1485-94. Epub 2019/12/27.

478. Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, Greten TF, Crocenzi T, Springett G, et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and Listeria Monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2015;33(12):1325-33. Epub 2015/01/15.

479. Tsujikawa T, Crocenzi T, Durham JN, Sugar EA, Wu AA, Onners B, et al. Evaluation of Cyclophosphamide/GVAX Pancreas Followed by Listeria-Mesothelin (CRS-207) with or without Nivolumab in Patients with Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res. 2020;26(14):3578-88. Epub 2020/04/11.

480. Santos PM, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. J Immunol. 2018;200(2):443-9. Epub 2018/01/10.

481. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. Nat Commun. 2019;10(1):5408. Epub 2019/11/30.

482. Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. Future Oncol. 2018;14(10):907-17. Epub 2017/12/21.

483. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. J Clin Oncol. 2000;18(23):3894-903. Epub 2000/12/01.

484. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. Cancer. 2009;115(16):3670-9. Epub 2009/06/19.

485. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N Engl J Med. 2010;363(5):411-22. Epub 2010/09/08.

486. Antonarakis ES, Kibel AS, Yu EY, Karsh LI, Elfiky A, Shore ND, et al. Sequencing of Sipuleucel-T and Androgen Deprivation Therapy in Men with Hormone-Sensitive Biochemically Recurrent Prostate Cancer: A Phase II Randomized Trial. Clin Cancer Res. 2017;23(10):2451-9. Epub 2016/11/12.

487. Fong L, Carroll P, Weinberg V, Chan S, Lewis J, Corman J, et al. Activated lymphocyte recruitment into the tumor microenvironment following preoperative sipuleucel-T for localized prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2014;106(11). Epub 2014/09/27.

488. Varade J, Magadan S, Gonzalez-Fernandez A. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. Cell Mol Immunol. 2020. Epub 2020/09/04.

489. Sorenmo KU, Krick E, Coughlin CM, Overley B, Gregor TP, Vonderheide RH, et al. CD40-activated B cell cancer vaccine improves second clinical remission and survival in privately owned dogs with non-Hodgkin's lymphoma. PLoS One. 2011;6(8):e24167. Epub 2011/09/10.

490. Magalhaes I, Carvalho-Queiroz C, Hartana CA, Kaiser A, Lukic A, Mints M, et al. Facing the future: challenges and opportunities in adoptive T cell therapy in cancer. Expert Opin Biol Ther. 2019;19(8):811-27. Epub 2019/04/16.

491. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. Science. 2015;348(6230):62-8. Epub 2015/04/04.

492. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, Polydoropoulou V, Karlis D, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. Ann Oncol. 2019;30(12):1902-13. Epub 2019/10/01.

493. Garber K. Pursuit of tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy speeds up. Nat Biotechnol. 2019;37(9):969-71. Epub 2019/09/06.

494. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen J. Adoptive cellular therapies: the current landscape. Virchows Arch. 2019;474(4):449-61. Epub 2018/11/25.

495. Stevanovic S, Helman SR, Wunderlich JR, Langhan MM, Doran SL, Kwong MLM, et al. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. Clin Cancer Res. 2019;25(5):1486-93. Epub 2018/12/07.

496. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2020;17(3):147-67. Epub 2019/12/19.

497. Qian C, Liu X, Xu Q, Wang Z, Chen J, Li T, et al. Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles. Vaccines (Basel). 2020;8(1):139. Epub 2020/04/05.

498. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. Semin Immunol. 2017;34:123-32. Epub 2017/09/10.

499. Zepeda-Cervantes J, Ramirez-Jarquin JO, Vaca L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. Front Immunol. 2020;11:1100. Epub 2020/06/26.

500. Zabel F, Mohanan D, Bessa J, Link A, Fettelschoss A, Saudan P, et al. Viral particles drive rapid differentiation of memory B cells into secondary plasma cells producing increased levels of antibodies. J Immunol. 2014;192(12):5499-508. Epub 2014/05/14.

501. Mohsen MO, Gomes AC, Vogel M, Bachmann MF. Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. Vaccines (Basel). 2018;6(3):37. Epub 2018/07/14.

502. Caldeira JC, Perrine M, Pericle F, Cavallo F. Virus-Like Particles as an Immunogenic Platform for Cancer Vaccines. Viruses. 2020;12(5):488.

503. Fuenmayor J, Godia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. N Biotechnol. 2017;39(Pt B):174-80. Epub 2017/08/06.

504. Frietze KM, Peabody DS, Chackerian B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. Curr Opin Virol. 2016;18:44-9. Epub 2016/04/05.

505. Laliberté-Gagné M-È, Bolduc M, Thérien A, Garneau C, Casault P, Savard P, et al. Increased Immunogenicity of Full-Length Protein Antigens through Sortase-Mediated Coupling on the PapMV Vaccine Platform. Vaccines. 2019;7(2):49.

506. Cimica V, Galarza JM. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. Clin Immunol. 2017;183:99-108. Epub 2017/08/07.

507. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature. 1982;298(5872):347-50. Epub 1982/07/22.

508. Garbuglia AR, Lapa D, Sias C, Capobianchi MR, Del Porto P. The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. Front Immunol. 2020;11(188):188. Epub 2020/03/07.

509. Li SW, Zhao Q, Wu T, Chen S, Zhang J, Xia NS. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. Hum Vaccin Immunother. 2015;11(4):908-14. Epub 2015/02/26.

510. Urakami A, Sakurai A, Ishikawa M, Yap ML, Flores-Garcia Y, Haseda Y, et al. Development of a Novel Virus-Like Particle Vaccine Platform That Mimics the Immature Form of Alphavirus. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(7):e00090-17. Epub 2017/05/19.

511. Collins KA, Snaith R, Cottingham MG, Gilbert SC, Hill AVS. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. Sci Rep. 2017;7(1):46621. Epub 2017/04/20.

512. Garg H, Mehmetoglu-Gurbuz T, Joshi A. Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. Sci Rep. 2020;10(1):4017. Epub 2020/03/07.

513. Pillet S, Couillard J, Trepanier S, Poulin JF, Yassine-Diab B, Guy B, et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate-Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and >/=50 years old adults. PLoS One. 2019;14(6):e0216533. Epub 2019/06/06.

514. Bolduc M, Baz M, Laliberte-Gagne ME, Carignan D, Garneau C, Russel A, et al. The quest for a nanoparticle-based vaccine inducing broad protection to influenza viruses. Nanomedicine. 2018;14(8):2563-74. Epub 2018/09/09.

515. Carignan D, Therien A, Rioux G, Paquet G, Gagne ML, Bolduc M, et al. Engineering of the PapMV vaccine platform with a shortened M2e peptide leads to an effective one dose influenza vaccine. Vaccine. 2015;33(51):7245-53. Epub 2015/11/10.

516. Masavuli MG, Wijesundara DK, Torresi J, Gowans EJ, Grubor-Bauk B. Preclinical Development and Production of Virus-Like Particles As Vaccine Candidates for Hepatitis C. Front Microbiol. 2017;8:2413. Epub 2017/12/21.

517. Gonelli CA, Khoury G, Center RJ, Purcell DFJ. HIV-1-based Virus-like Particles that Morphologically Resemble Mature, Infectious HIV-1 Virions. Viruses. 2019;11(6):507. Epub 2019/06/05.

518. Pankrac J, Klein K, McKay PF, King DFL, Bain K, Knapp J, et al. A heterogeneous human immunodeficiency virus-like particle (VLP) formulation produced by a novel vector system. NPJ Vaccines. 2018;3(1):2. Epub 2018/01/26.

519. Schweneker M, Laimbacher AS, Zimmer G, Wagner S, Schraner EM, Wolferstatter M, et al. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Generating Ebola Virus-Like Particles. J Virol. 2017;91(11):e00343-17. Epub 2017/03/24.

520. Ward BJ, Gobeil P, Séguin A, Atkins J, Boulay I, Charbonneau P-Y, et al. Phase 1 trial of a Candidate Recombinant Virus-Like Particle Vaccine for Covid-19 Disease Produced in Plants. medRxiv. 2020:2020.11.04.20226282.

521. Mohsen MO, Speiser DE, Knuth A, Bachmann MF. Virus-like particles for vaccination against cancer. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2020;12(1):e1579. Epub 2019/08/29.

522. Kramer K, Al-Barwani F, Baird MA, Young VL, Larsen DS, Ward VK, et al. Functionalisation of Virus-Like Particles Enhances Antitumour Immune Responses. J Immunol Res. 2019;2019:5364632. Epub 2019/02/08.

523. Speiser DE, Schwarz K, Baumgaertner P, Manolova V, Devevre E, Sterry W, et al. Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. J Immunother. 2010;33(8):848-58. Epub 2010/09/16.

524. Goldinger SM, Dummer R, Baumgaertner P, Mihic-Probst D, Schwarz K, Hammann-Haenni A, et al. Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8(+) T-cell responses in melanoma patients. Eur J Immunol. 2012;42(11):3049-61. Epub 2012/07/19.

525. Lebel M-È, Chartrand K, Leclerc D, Lamarre A. Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. Vaccines. 2015;3(3):620-37.

526. Balke I, Zeltins A. Recent Advances in the Use of Plant Virus-Like Particles as Vaccines. Viruses. 2020;12(3):270.

527. Balke I, Zeltins A. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. Adv Drug Deliv Rev. 2019;145:119-29. Epub 2018/09/03.

528. Tremblay MH, Majeau N, Gagne ME, Lecours K, Morin H, Duvignaud JB, et al. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. FEBS J. 2006;273(1):14-25. Epub 2005/12/22.

529. Laliberte Gagne ME, Lecours K, Gagne S, Leclerc D. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. FEBS J. 2008;275(7):1474-84. Epub 2008/03/04.

530. Mathieu C, Rioux G, Dumas MC, Leclerc D. Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and Streptococcus pneumoniae challenge. Nanomedicine. 2013;9(7):839-48. Epub 2013/03/19.

531. Lebel ME, Daudelin JF, Chartrand K, Tarrab E, Kalinke U, Savard P, et al. Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8+ T cell-mediated protection from Listeria monocytogenes infection. J Immunol. 2014;192(3):1071-8. Epub 2014/01/01.

532. Lebel ME, Langlois MP, Daudelin JF, Tarrab E, Savard P, Leclerc D, et al. Complement Component 3 Regulates IFN-alpha Production by Plasmacytoid Dendritic Cells following TLR7 Activation by a Plant Virus-like Nanoparticle. J Immunol. 2017;198(1):292-9. Epub 2016/11/20.

533. Carignan D, Herblot S, Laliberte-Gagne ME, Bolduc M, Duval M, Savard P, et al. Activation of innate immunity in primary human cells using a plant virus derived nanoparticle TLR7/8 agonist. Nanomedicine. 2018;14(7):2317-27. Epub 2017/11/13.

534. Acosta-Ramirez E, Perez-Flores R, Majeau N, Pastelin-Palacios R, Gil-Cruz C, Ramirez-Saldana M, et al. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. Immunology. 2008;124(2):186-97. Epub 2007/12/12.

535. Lacasse P, Denis J, Lapointe R, Leclerc D, Lamarre A. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. J Virol. 2008;82(2):785-94. Epub 2007/11/09.

536. Savard C, Guerin A, Drouin K, Bolduc M, Laliberte-Gagne ME, Dumas MC, et al. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles. PLoS One. 2011;6(6):e21522. Epub 2011/07/13.

537. Rioux G, Mathieu C, Russell A, Bolduc M, Laliberte-Gagne ME, Savard P, et al. PapMV nanoparticles improve mucosal immune responses to the trivalent inactivated flu vaccine. J Nanobiotechnology. 2014;12(1):19. Epub 2014/06/03.

538. Rioux G, Carignan D, Russell A, Bolduc M, Gagne ME, Savard P, et al. Influence of PapMV nanoparticles on the kinetics of the antibody response to flu vaccine. J Nanobiotechnology. 2016;14(1):43. Epub 2016/06/11.

539. Savard C, Laliberte-Gagne ME, Babin C, Bolduc M, Guerin A, Drouin K, et al. Improvement of the PapMV nanoparticle adjuvant property through an increased of its avidity for the antigen [influenza NP]. Vaccine. 2012;30(15):2535-42. Epub 2012/02/14.

540. Lebel ME, Chartrand K, Tarrab E, Savard P, Leclerc D, Lamarre A. Potentiating Cancer Immunotherapy Using Papaya Mosaic Virus-Derived Nanoparticles. Nano Lett. 2016;16(3):1826-32. Epub 2016/02/19.

541. Langley J, Pastural E, Halperin S, McNeil S, ElSherif M, MacKinnon-Cameron D, et al. A Randomized Controlled Study to Evaluate the Safety and Reactogenicity of a Novel rVLP-Based Plant Virus Nanoparticle Adjuvant Combined with Seasonal Trivalent Influenza Vaccine Following Single Immunization in Healthy Adults 18-50 Years of Age. Vaccines (Basel). 2020;8(3):393. Epub 2020/07/24.

542. Rioux G, Babin C, Majeau N, Leclerc D. Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the HA11 peptide to several putative surface-exposed sites. PLoS One. 2012;7(2):e31925. Epub 2012/03/01.

543. Rioux G, Majeau N, Leclerc D. Mapping the surface-exposed regions of papaya mosaic virus nanoparticles. FEBS J. 2012;279(11):2004-11. Epub 2012/04/25.

544. Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard MC, Simard S, et al. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. Virology. 2007;363(1):59-68. Epub 2007/02/27.

545. Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, Hamelin ME, Koukavica I, Baz M, et al. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. Vaccine. 2008;26(27-28):3395-403. Epub 2008/05/31.

546. Babin C, Majeau N, Leclerc D. Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. J Nanobiotechnology. 2013;11(1):10. Epub 2013/04/06.

547. Therien A, Bedard M, Carignan D, Rioux G, Gauthier-Landry L, Laliberte-Gagne ME, et al. A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. J Nanobiotechnology. 2017;15(1):54. Epub 2017/07/20.

548. Ruedl C, Storni T, Lechner F, Bachi T, Bachmann MF. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. Eur J Immunol. 2002;32(3):818-25. Epub 2002/03/01.

549. Zhu Q, Zhang M, Shi M, Liu Y, Zhao Q, Wang W, et al. Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis. Immunobiology. 2016;221(4):558-67. Epub 2016/01/01.

550. Martinez-Riano A, Bovolenta ER, Mendoza P, Oeste CL, Martin-Bermejo MJ, Bovolenta P, et al. Antigen phagocytosis by B cells is required for a potent humoral response. EMBO Rep. 2018;19(9):e46016. Epub 2018/07/11.

551. Willox AK, Sahraoui YM, Royle SJ. Non-specificity of Pitstop 2 in clathrin-mediated endocytosis. Biol Open. 2014;3(5):326-31. Epub 2014/04/08.

552. Charpentier JC, Chen D, Lapinski PE, Turner J, Grigorova I, Swanson JA, et al. Macropinocytosis drives T cell growth by sustaining the activation of mTORC1. Nat Commun. 2020;11(1):180. Epub 2020/01/12.

553. McCluskey A, Daniel JA, Hadzic G, Chau N, Clayton EL, Mariana A, et al. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. Traffic. 2013;14(12):1272-89. Epub 2013/09/13.

554. Plummer EM, Manchester M. Endocytic uptake pathways utilized by CPMV nanoparticles. Mol Pharm. 2013;10(1):26-32. Epub 2012/08/22.

555. Kremlitzka M, Macsik-Valent B, Erdei A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement. Immunol Lett. 2016;178:37-44. Epub 2016/08/04.

556. Hess MW, Schwendinger MG, Eskelinen E-L, Pfaller K, Pavelka M, Dierich MP, et al. Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). Blood. 2000;95(8):2617-23.

557. Francian A, Mann K, Kullberg M. Complement C3-dependent uptake of targeted liposomes into human macrophages, B cells, dendritic cells, neutrophils, and MDSCs. Int J Nanomedicine. 2017;12:5149-61. Epub 2017/08/10.

558. Francian A, Namen S, Stanley M, Mann K, Martinson H, Kullberg M. Intratumoral delivery of antigen with complement C3-bound liposomes reduces tumor growth in mice. Nanomedicine. 2019;18:326-35. Epub 2018/11/13.

559. Weimershaus M, Maschalidi S, Sepulveda F, Manoury B, van Endert P, Saveanu L. Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation. J Immunol. 2012;188(4):1840-6. Epub 2012/01/13.

560. Barlow N, Vanga SR, Savmarker J, Sandstrom A, Burns P, Hallberg A, et al. Macrocyclic peptidomimetics as inhibitors of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP). RSC Med Chem. 2020;11(2):234-44. Epub 2021/01/23.

561. Unanue ER, Turk V, Neefjes J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. Annu Rev Immunol. 2016;34(1):265-97. Epub 2016/02/26.

562. Basha G, Omilusik K, Chavez-Steenbock A, Reinicke AT, Lack N, Choi KB, et al. A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. Nat Immunol. 2012;13(3):237-45. Epub 2012/02/07.

563. Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(2):745-50. Epub 2000/01/19.

564. Phipps-Yonas H, Semik V, Hastings KT. GILT expression in B cells diminishes cathepsin S steady-state protein expression and activity. Eur J Immunol. 2013;43(1):65-74. Epub 2012/09/27.

565. Burster T, Beck A, Tolosa E, Marin-Esteban V, Rotzschke O, Falk K, et al. Cathepsin G, and not the asparagine-specific endoprotease, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes. J Immunol. 2004;172(9):5495-503. Epub 2004/04/22.

566. Wu CM, Roth TL, Baglaenko Y, Ferri DM, Brauer P, Zuniga-Pflucker JC, et al. Genetic engineering in primary human B cells with CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. J Immunol Methods. 2018;457:33-40. Epub 2018/04/04.

567. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. Sci Rep. 2018;8(1):12144. Epub 2018/08/16.

568. Colbert JD, Cruz FM, Rock KL. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules. Curr Opin Immunol. 2020;64:1-8. Epub 2020/01/14.

569. Zou L, Zhou J, Zhang J, Li J, Liu N, Chai L, et al. The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(37):15801-6. Epub 2009/09/01.

570. Cebrian I, Croce C, Guerrero NA, Blanchard N, Mayorga LS. Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. EMBO Rep. 2016;17(12):1753-65. Epub 2016/11/20.

571. van Weert AW, Geuze HJ, Groothuis B, Stoorvogel W. Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. Eur J Cell Biol. 2000;79(6):394-9. Epub 2000/08/06.

572. Cruz FM, Colbert JD, Rock KL. The GTPase Rab39a promotes phagosome maturation into MHC-I antigen-presenting compartments. EMBO J. 2020;39(2):e102020. Epub 2019/12/11.

573. Alloatti A, Rookhuizen DC, Joannas L, Carpier JM, Iborra S, Magalhaes JG, et al. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. J Exp Med. 2017;214(8):2231-41. Epub 2017/07/01.

574. Mayorga LS, Cebrian I. Rab22a: A novel regulator of immune functions. Mol Immunol. 2019;113:87-92. Epub 2018/04/11.

575. Chartrand K, Lebel ME, Tarrab E, Savard P, Leclerc D, Lamarre A. Efficacy of a Virus-Like Nanoparticle As Treatment for a Chronic Viral Infection Is Hindered by IRAK1 Regulation and Antibody Interference. Front Immunol. 2017;8(1885):1885. Epub 2018/01/23.

576. Albakri MM, Veliz FA, Fiering SN, Steinmetz NF, Sieg SF. Endosomal toll-like receptors play a key role in activation of primary human monocytes by cowpea mosaic virus. Immunology. 2020;159(2):183-92. Epub 2019/10/21.

577. Oh JE, Lee HK. Pattern recognition receptors and autophagy. Front Immunol. 2014;5(300):300. Epub 2014/07/11.

578. De Meyer I, Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans JP, Bult H, De Meyer GR. Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques. Basic Res Cardiol. 2012;107(3):269. Epub 2012/05/01.

579. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. EMBO J. 2008;27(7):1110-21. Epub 2008/03/14.

580. Shi CS, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. J Biol Chem. 2008;283(48):33175-82. Epub 2008/09/06.

581. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. Science. 2007;315(5817):1398-401. Epub 2007/02/03.

582. Petes C, Odoardi N, Gee K. The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. Front Immunol. 2017;8:1075. Epub 2017/09/21.

583. Weindel CG, Richey LJ, Bolland S, Mehta AJ, Kearney JF, Huber BT. B cell autophagy mediates TLR7-dependent autoimmunity and inflammation. Autophagy. 2015;11(7):1010-24. Epub 2015/06/30.

584. Weindel CG, Richey LJ, Mehta AJ, Shah M, Huber BT. Autophagy in Dendritic Cells and B Cells Is Critical for the Inflammatory State of TLR7-Mediated Autoimmunity. J Immunol. 2017;198(3):1081-92. Epub 2016/12/30.

585. Matsumoto F, Saitoh S, Fukui R, Kobayashi T, Tanimura N, Konno K, et al. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. Biochem Biophys Res Commun. 2008;367(3):693-9. Epub 2008/01/02.

586. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. J Exp Med. 2011;208(4):643-51. Epub 2011/03/16.

587. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. Blood. 2003;102(3):956-63. Epub 2003/04/12.

588. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem. 2010;285(14):10850-61. Epub 2010/02/04.

589. Heckmann BL, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. J Cell Sci. 2019;132(5):jcs222984. Epub 2019/02/23.

590. To EE, Vlahos R, Luong R, Halls ML, Reading PC, King PT, et al. Endosomal NOX2 oxidase exacerbates virus pathogenicity and is a target for antiviral therapy. Nat Commun. 2017;8(1):69. Epub 2017/07/14.

591. Makni-Maalej K, Marzaioli V, Boussetta T, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, Hurtado-Nedelec M, et al. TLR8, but not TLR7, induces the priming of the NADPH oxidase activation in human neutrophils. J Leukoc Biol. 2015;97(6):1081-7. Epub 2015/04/17.

592. To EE, Broughton BR, Hendricks KS, Vlahos R, Selemidis S. Influenza A virus and TLR7 activation potentiate NOX2 oxidase-dependent ROS production in macrophages. Free Radic Res. 2014;48(8):940-7. Epub 2014/05/30.

593. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Perez L, Geffner J, Hermine O, et al. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. Blood. 2008;112(12):4712-22. Epub 2008/08/07.

594. Lamb FS, Moreland JG, Miller FJ, Jr. Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes. Antioxid Redox Signal. 2009;11(6):1335-47. Epub 2009/02/12.

595. Neron S, Nadeau PJ, Darveau A, Leblanc JF. Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011;59(1):25-40. Epub 2011/01/15.

596. Van Belle K, Herman J, Boon L, Waer M, Sprangers B, Louat T. Comparative In Vitro Immune Stimulation Analysis of Primary Human B Cells and B Cell Lines. J Immunol Res. 2016;2016:5281823. Epub 2017/01/25.

597. Filipovic I, Sonnerborg I, Strunz B, Friberg D, Cornillet M, Hertwig L, et al. 29-Color Flow Cytometry: Unraveling Human Liver NK Cell Repertoire Diversity. Front Immunol. 2019;10:2692. Epub 2019/12/05.

598. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. Science. 2020;369(6508):eabc8511. Epub 2020/07/17.

599. Gadalla R, Noamani B, MacLeod BL, Dickson RJ, Guo M, Xu W, et al. Validation of CyTOF Against Flow Cytometry for Immunological Studies and Monitoring of Human Cancer Clinical Trials. Front Oncol. 2019;9:415. Epub 2019/06/06.

600. Schulte-Schrepping J, Reusch N, Paclik D, Bassler K, Schlickeiser S, Zhang B, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. Cell. 2020;182(6):1419-40 e23. Epub 2020/08/19.

601. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. Front Immunol. 2019;10(2458):2458. Epub 2019/11/05.

602. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med. 1994;180(1):329-39. Epub 1994/07/01.

603. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, et al. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. Eur J Immunol. 1997;27(8):2073-9. Epub 1997/08/01.

604. Palit S, Heuser C, de Almeida GP, Theis FJ, Zielinski CE. Meeting the Challenges of High-Dimensional Single-Cell Data Analysis in Immunology. Front Immunol. 2019;10:1515. Epub 2019/07/30.

605. Kornbluth RS, Stempniak M, Stone GW. Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. Int Rev Immunol. 2012;31(4):279-88. Epub 2012/07/19.

606. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. Immunol Rev. 2008;223(1):60-86. Epub 2008/07/11.

607. Lin KI, Lin Y, Calame K. Repression of c-myc is necessary but not sufficient for terminal differentiation of B lymphocytes in vitro. Mol Cell Biol. 2000;20(23):8684-95. Epub 2000/11/14.

608. Roy K, Mitchell S, Liu Y, Ohta S, Lin YS, Metzig MO, et al. A Regulatory Circuit Controlling the Dynamics of NFkappaB cRel Transitions B Cells from Proliferation to Plasma Cell Differentiation. Immunity. 2019;50(3):616-28 e6. Epub 2019/03/10.

609. Garcia-Marquez MA, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Kochanek M, Weber T, Wennhold K, et al. A multimerized form of recombinant human CD40 ligand supports long-term activation and proliferation of B cells. Cytotherapy. 2014;16(11):1537-44. Epub 2014/10/08.

610. Neron S, Roy A, Dumont N, Dussault N. Effective in vitro expansion of CD40-activated human B lymphocytes in a defined bovine protein-free medium. J Immunol Methods. 2011;371(1-2):61-9. Epub 2011/07/05.

611. Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, van Baren N, Lucas S, Kvistborg P, et al. Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. J Clin Oncol. 2016;34(12):1330-8. Epub 2016/03/02.

612. Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. J Transl Med. 2018;16(1):142. Epub 2018/05/31.

613. Franke F, Kirchenbaum GA, Kuerten S, Lehmann PV. IL-21 in Conjunction with Anti-CD40 and IL-4 Constitutes a Potent Polyclonal B Cell Stimulator for Monitoring Antigen-Specific Memory B Cells. Cells. 2020;9(2):433. Epub 2020/02/20.

614. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, et al. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. J Immunol. 2008;180(7):4805-15. Epub 2008/03/21.

615. Gonzalez NK, Wennhold K, Balkow S, Kondo E, Bolck B, Weber T, et al. In vitro and in vivo imaging of initial B-T-cell interactions in the setting of B-cell based cancer immunotherapy. Oncoimmunology. 2015;4(9):e1038684. Epub 2015/09/26.

616. Wennhold K, Thelen M, Schlosser HA, Haustein N, Reuter S, Garcia-Marquez M, et al. Using Antigen-Specific B Cells to Combine Antibody and T Cell-Based Cancer Immunotherapy. Cancer Immunol Res. 2017;5(9):730-43. Epub 2017/08/06.

617. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood. 2005;106(5):1565-73. Epub 2005/05/28.

618. Greenberg ML, Yu Y, Leverrier S, Zhang SL, Parker I, Cahalan MD. Orai1 function is essential for T cell homing to lymph nodes. J Immunol. 2013;190(7):3197-206. Epub 2013/03/05.

619. Shimabukuro-Vornhagen A, Zoghi S, Liebig TM, Wennhold K, Chemitz J, Draube A, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation specifically interferes with CD40-dependent B cell activation, resulting in a reduced capacity to induce T cell immunity. J Immunol. 2014;193(10):5294-305. Epub 2014/10/15.

620. Yarchoan M, Ho WJ, Mohan A, Shah Y, Vithayathil T, Leatherman J, et al. Effects of B cell-activating factor on tumor immunity. JCI Insight. 2020;5(10). Epub 2020/05/22.

621. Mehdipour F, Razmkhah M, Faghih Z, Bagheri M, Talei AR, Ghaderi A. The significance of cytokine-producing B cells in breast tumor-draining lymph nodes. Cell Oncol (Dordr). 2019;42(3):381-95. Epub 2019/03/10.

622. Garaud S, Buisseret L, Solinas C, Gu-Trantien C, de Wind A, Van den Eynden G, et al. Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. JCI Insight. 2019;5(18). Epub 2019/08/14.

623. Oth T, Schnijderberg MC, Senden-Gijsbers BL, Germeraad WT, Bos GM, Vanderlocht J. Monitoring the initiation and kinetics of human dendritic cell-induced polarization of autologous naive CD4+ T cells. PLoS One. 2014;9(8):e103725. Epub 2014/08/22.

624. Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. Front Immunol. 2018;9:1838. Epub 2018/08/31.

625. Huang J, Zhou J, Ghinnagow R, Seki T, Iketani S, Soulard D, et al. Targeted Co-delivery of Tumor Antigen and alpha-Galactosylceramide to CD141(+) Dendritic Cells Induces a Potent Tumor Antigen-Specific Human CD8(+) T Cell Response in Human Immune System Mice. Front Immunol. 2020;11(2043):2043. Epub 2020/09/26.

626. Lapointe R, Toso JF, Butts C, Young HA, Hwu P. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. Eur J Immunol. 2000;30(11):3291-8. Epub 2000/11/28.

627. Moutai T, Yamana H, Nojima T, Kitamura D. A novel and effective cancer immunotherapy mouse model using antigen-specific B cells selected in vitro. PLoS One. 2014;9(3):e92732. Epub 2014/03/22.

628. Kugler A, Seseke F, Thelen P, Kallerhoff M, Muller GA, Stuhler G, et al. Autologous and allogenic hybrid cell vaccine in patients with metastatic renal cell carcinoma. Br J Urol. 1998;82(4):487-93. Epub 1998/11/07.

629. Trefzer U, Weingart G, Chen Y, Herberth G, Adrian K, Winter H, et al. Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. Int J Cancer. 2000;85(5):618-26. Epub 2000/03/04.

630. Szeto GL, Van Egeren D, Worku H, Sharei A, Alejandro B, Park C, et al. Microfluidic squeezing for intracellular antigen loading in polyclonal B-cells as cellular vaccines. Sci Rep. 2015;5:10276. Epub 2015/05/23.

631. Rohaan MW, van den Berg JH, Kvistborg P, Haanen J. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. J Immunother Cancer. 2018;6(1):102. Epub 2018/10/05.

632. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest. 2014;124(5):2246-59. Epub 2014/03/29.

633. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. Nat Med. 2016;22(4):433-8. Epub 2016/02/24.

634. Pasetto A, Gros A, Robbins PF, Deniger DC, Prickett TD, Matus-Nicodemos R, et al. Tumor- and Neoantigen-Reactive T-cell Receptors Can Be Identified Based on Their Frequency in Fresh Tumor. Cancer Immunol Res. 2016;4(9):734-43. Epub 2016/06/30.

635. Yossef R, Tran E, Deniger DC, Gros A, Pasetto A, Parkhurst MR, et al. Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy. JCI Insight. 2018;3(19). Epub 2018/10/05.

636. Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Ahmadzadeh M, Wunderlich JR, Rosenberg SA, et al. Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother. 2010;33(9):956-64. Epub 2010/10/16.

637. Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, et al. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. Clin Cancer Res. 2014;20(1):44-55. Epub 2013/09/21.

638. Seliktar-Ofir S, Merhavi-Shoham E, Itzhaki O, Yunger S, Markel G, Schachter J, et al. Selection of Shared and Neoantigen-Reactive T Cells for Adoptive Cell Therapy Based on CD137 Separation. Front Immunol. 2017;8:1211. Epub 2017/10/27.

639. Parkhurst M, Gros A, Pasetto A, Prickett T, Crystal JS, Robbins P, et al. Isolation of T-Cell Receptors Specifically Reactive with Mutated Tumor-Associated Antigens from Tumor-Infiltrating Lymphocytes Based on CD137 Expression. Clin Cancer Res. 2017;23(10):2491-505. Epub 2016/11/09.

640. Harris J, Monesmith T, Ubben A, Norris M, Freedman JH, Tcherepanova I. An improved RNA amplification procedure results in increased yield of autologous RNA transfected dendritic cell-based vaccine. Biochim Biophys Acta. 2005;1724(1-2):127-36. Epub 2005/05/04.

641. Slagter-Jager JG, Raney A, Lewis WE, Debenedette MA, Nicolette CA, Tcherepanova IY. Evaluation of RNA Amplification Methods to Improve DC Immunotherapy Antigen Presentation and Immune Response. Mol Ther Nucleic Acids. 2013;2(5):e91. Epub 2013/05/09.

Annexe I : Curriculum vitae

Formation académique

Janv. 2014 – Fév. 2021	**Doctorat en Sciences Biomédicales option Générale** Université de Montréal – Montréal, QC, Canada
Sept. 2011 – Juill. 2013	**Master Recherche mention Biochimie Structurale et Fonctionnelle** Mention Bien – Major de promotion Université Claude Bernard Lyon1 – Lyon, France
Sept. 2010 – Juill. 2011	**Mobilité Internationale : Échange Oregon, États-Unis** Oregon State University – Corvallis, Oregon, États-Unis
Sept. 2008 – Juill. 2011	**Licence Sciences Technologie Santé mention Biochimie** Mention Très Bien – Major de promotion Université Claude Bernard Lyon1 – Lyon, France
Sept. 2005 – Juill. 2008	**Baccalauréat Scientifique spé. Sciences de la Vie et de la Terre** Mention Très Bien – Major de promotion Lycée Edme Bouchardon – Chaumont, France

Expériences en recherche et enseignement

Sept. 2018 – Oct. 2018	**Chargé de cours : SPB1035 : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire.** Programme de Baccalauréat en Sciences Biopharmaceutiques, Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal. *Responsables : Dr Marc Servant et Dr Simon-Pierre Gravel.*
Mai. 2016 – Fév. 2021	**Auxiliaire d'enseignement : surveillant d'examens.** Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal *Responsable : M. Damien Ascargorta.*
Janv. 2014 – Fév. 2021	**Doctorat** Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal et Institut du cancer de Montréal (ICM) Laboratoire d'immuno-oncologie humaine *Directeur de recherche : Dr Réjean Lapointe* Sujet : Compréhension et amélioration de la présentation antigénique par les lymphocytes B, une source alternative de cellules présentatrices d'antigènes.

Oct. 2012 – Juill. 2013	**Stage Master 2**. UMR 5086 « Bases Moléculaire et Structurale des Systèmes Infectieux » – Centre national de la recherche scientifique et Université Claude Bernard Lyon1 Équipe Réseaux d'Interactions Extracellulaires *Directrice de recherche : Dre Sylvie Ricard-Blum* Sujet : Interactions Hôte-Leishmania.
Mars 2012 – Avr. 2012	**Stage Master 1.** UMR 5239 « Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule » – Centre national de la recherche scientifique et École Normale Supérieure de Lyon Équipe Aptamères Peptidiques *Directeur de recherche : Dr Brian B. Rudkin* Sujet : Mise au point de plasmides pour le développement d'un système double-hybride quantitatif.
Sept. 2010 – Juin 2011	**Assistant d'enseignement universitaire de Français.** College of Liberal Arts – School of Language, Culture, and Society, Oregon State University – Corvallis, Oregon, États-Unis *Responsable : Mme Brenda McCullough*

Publications

1- **David Possamaï**, Gabriel Pagé, Rébecca Panes, Étienne Gagnon and Réjean Lapointe. CD40L-stimulated B lymphocytes are polarized toward antigen-presenting cell functions after exposure to IL-4 and IL-21. **Soumis pour publication à *The Journal of Immunology* (octobre 2020)**.

2- **David Possamaï**, Laïla-Aïcha Hanafi, Angélique Bellemare-Pelletier, Katia Hamelin, Paméla Thébault, Marie-Josée Hébert, Étienne Gagnon, Denis Leclerc and Réjean Lapointe. *MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen presenting cells is dependent on autophagy.* **Soumis pour publication à *Scientific Reports* (octobre 2020)**.

3- Laïla-Aïcha Hanafi, Dominique Gauchat, Jessica Godin-Ethier, **David Possamaï**, Jean-Baptiste Duvignaud, Denis Leclerc, Nathalie Grandvaux, Réjean Lapointe. *Fludarabine Downregulates Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Tumors via a Proteasome-Mediated Degradation Mechanism.* PLoS ONE 9(6): e99211. doi: 10.1371/journal.pone.0099211 (2014).

Bourses

2020 – 2021	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2019 – 2020	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2019 – 2020	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal :	10 000 $

2019 – 2020	Prime d'Excellence Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	1 000 $
2018 – 2019	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2018 – 2019	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal :	6 000 $
2018 – 2019	Prime d'Excellence Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	1 000 $
2017 – 2018	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2017 – 2018	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	6 000 $
2017 – 2018	Prime d'Excellence Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	1 000 $
2016 – 2017	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2016 – 2017	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	6 000 $
Juin 2016	Bourse de voyage – Congrès BioCanRX	936.99 $
2015 – 2016	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2015 – 2016	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	6 000 $
2015 – 2016	Prime d'Excellence Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	1 000 $
Déc. 2015	Bourse de formation niveau doctorat du CRCHUM	1 000 $
2014 – 2015	Bourse de doctorat du Programme de sciences biomédicales	4 000 $
2014 – 2015	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	9 000 $
2013 – 2014	Bourse Canderel de l'Institut du cancer de Montréal	1 749 $
2008 – 2013	Bourse au mérite du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche (France)	1 800 €/an
Juill. 2011	Bourse d'Excellence de l'Université Claude Bernard Lyon 1	1 500 €
2010 – 2011	Bourse Explo'RA Sup du conseil régional de Rhône-Alpes, France pour la mobilité internationale :	1 860 €

Prix

Déc. 2017	Prix de présentation par affiche 10th Annual Canadian Cancer Immunotherapy Consortium, Montréal, QC.	200 $
Mai 2017	Prix Marilyn Wener d'implication communautaire de l'Institut du cancer de Montréal	500 $
Mai 2017	Prix d'excellence – présentation par affiche Niveau doctorat 19e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM	400 $
Déc. 2014	Prix d'excellence – présentation par affiche Niveau doctorat 17e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM	400 $
Juin 2010	Prix des Amis de l'Université de Lyon – Centre OREGON	350 €

Présentations orales

1- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
28e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (25 Jan. 2019).

2- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
Journée Annuelle ThéCell, Montréal, QC. (21 Nov. 2018).

3- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
10th Annual Canadian Cancer Immunotherapy Consortium (CCIC), Montréal, QC.
(13-15 Déc. 2017). Présentation de 2 minutes type speed poster.

4- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Contrôle des fonctions alternatives des lymphocytes B.
24e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (13 Nov. 2014).

Présentations par affiche

1- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
29e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (17 Jan. 2020).

2- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
21e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM, Montréal, QC.
(9 Mai 2019).

3- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
20e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM, Montréal, QC.
(3 Mai 2018).

4- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
27e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (12 Jan. 2018).

5- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
10th Annual Canadian Cancer Immunotherapy Consortium, Montréal, QC. (13-15 Déc. 2017).

6- **David Possamaï**, Sandy Pelletier, Mélissa Mathieu, Simon Turcotte et Réjean Lapointe.
Selection of tumor-antigen reactive T cells for cancer immunotherapy using B lymphocytes.
19e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM, Montréal, QC.
(4 Mai 2017).

7- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
26e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (2 Déc. 2016).

8- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
Summit for Cancer Immunotherapy (BioCanRX/CCIC), Halifax, NS. (25-29 Juin 2016).

9- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
18e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM, Montréal, QC.
(4 Mai 2016).

10- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
2nd Montreal Immunology Meetings (MIM) Symposium 2015, Montréal, QC. (23 Nov. 2015).

11- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
25e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal, Montréal, QC. (13 Nov. 2015).

12- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
Canadian Cancer Research Conference, Montréal, QC. (8-10 Nov. 2015).

13- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
6e Journée Scientifique du CRCHUM. (14-15 Oct. 2015).

14- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
17e Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM, Montréal, QC.
(5 Déc. 2014).

15- **David Possamaï**, Anne Monette et Réjean Lapointe.
Deciphering alternative functions of B lymphocytes.
Montreal Immunology Meetings (MIM) Symposium 2014, Montréal, QC. (24 Nov. 2014).

Implication sociale

2014 – 2019 : Bénévole pour les levées de fonds en faveur de l'Institut du cancer de Montréal.
Défi Canderel (Mai 2014-2019), Vente de bijoux Anne-Marie Chagnon (Mai 2014-2016), Golf contre le cancer (Juin 2016), Concert contre le Cancer – Enbridge (Mars 2015-2019), Casino contre le Cancer (Sept. 2014-2017), Soirée Masquée (Oct. 2016-2018).

2014 – 2016 : Juge pour les Expo-sciences du Québec du Réseau CDLS-CLS
Expo-sciences Hydro-Québec, finale régionale de Montréal.

2014 : Membre étudiant du comité organisateur de la 24e Journée Scientifique de l'Institut du cancer de Montréal (13 Nov. 2014).

2010 – 2011 : Trésorier et bénévole pour l'European Student Association of Oregon State University
Organisation de l'« European Night ».