

Université de Montréal

**Étude de l'impact des niveaux élevés de BAFF sur la dérégulation des lymphocytes
B de la zone marginale associée avec l'infection au virus de l'immunodéficience
humaine**

Par

Michelle Renée Byrns

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Décembre 2019

©Michelle Renée Byrns, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'impact des niveaux élevés de BAFF sur la dérégulation des lymphocytes B de la zone marginale associée avec l'infection au virus de l'immunodéficience humaine

Présenté par :
Michelle Renée Byrns

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Carolina Alfieri
Dr Guy Lemay
Dr Michel Roger
Dre Johanne Poudrier

Résumé

L'infection au VIH a plusieurs effets délétères, dont la dérégulation du compartiment des lymphocytes B. Cette dérégulation s'installe rapidement après l'infection et perdure au-delà de la thérapie antirétrovirale, pouvant mener à diverses maladies auto-immunes ainsi qu'à des lymphomes. Chez les individus atteints du VIH, cette dérégulation mène à l'augmentation de la fréquence des cellules B précurseurs de la zone marginale (MZ) dans le sang ainsi qu'à leur production d'IL-10, à l'augmentation du B-cell activating factor (BAFF), et à l'hyperglobulinémie. De plus, Nef a été détecté dans le sérum et dans les cellules dendritiques des patients infectés, les niveaux de Nef des patients corrélant avec leurs niveaux de BAFF.

L'analyse d'un RNAseq effectué sur des cellules B MZ précurseurs démontre la diminution hautement significative d'expression des NR4As et de CD83 chez les patients VIH⁺ progressifs comparativement aux contrôles VIH⁻ et aux élites contrôleurs. Notre équipe a d'ailleurs démontré le potentiel et la fonction Breg associés à l'expression des NR4As et CD83 chez les cellules B MZ précurseurs du sang et d'amygdales. Aussi, la majorité de cette population co-exprime CD73 et CD39, molécules impliquées dans la synthèse de l'adénosine, cette dernière ayant un contrôle sur l'expression des NR4As.

Nous voulions donc étudier l'effet de niveaux élevés de BAFF et de Nef sur la modulation de l'expression des NR4As, de CD83, CD73 et CD39 chez les cellules B MZ d'amygdales et l'effet de la déhydroergotamine (DHE) sur ce modèle, des études ayant déjà illustré sa modulation positive des NR4As. Nous étions aussi intéressés par la production d'IL-10 par ces cellules B MZ ainsi que l'effet de Nef sur son expression. Nous avons trouvé qu'après incubation avec BAFF et Nef, l'expression de NR4A1 et de CD83 était souvent plus basse qu'après une incubation avec BAFF seul qui semblait augmenter l'expression de ces dernières, ce qui concorde avec les résultats du RNAseq mentionné plus haut. Après une incubation avec Nef seul, l'expression des NR4As et de CD83 est similaire à l'expression mesurée après une incubation sans traitement, mais certains patients ont démontré une diminution légère de l'expression de ces molécules, chose normale puisque les échantillons contenaient tous des niveaux basaux de BAFF. De plus,

nos résultats démontrent que le DHE augmente l'expression de NR4A1 et 3 après que leur expression ait été diminuée par Nef et son effet semble être plus important au niveau des cellules B MZ et MZ précurseurs. Ces résultats suggèrent l'utilité du DHE pour la diminution des niveaux inflammatoires chez les individus atteints du VIH, les NR4As ayant un rôle anti-inflammatoire par la diminution des fréquences de NFkB, molécule modulée positivement par Nef. Nous avons remarqué que les populations exprimant IL-10 co-expriment principalement CD10. L'effet de Nef n'a malheureusement pas été remarqué sur l'expression d'IL-10, d'autres études étant nécessaires avec nos populations d'amygdales. Bref, nos résultats suggèrent l'utilité d'agents thérapeutiques ciblant les NR4As en addition à la thérapie antirétrovirale, leur modulation chez les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs pouvant être un aspect clé du contrôle des niveaux inflammatoires chez les individus atteints du VIH.

Mots-clés : Virus de l'immunodéficience humaine, Nef, cellules B, zone marginale, cellules B MZ précurseurs, BAFF, BLyS, inflammation

Abstract

HIV infection is accompanied by many deleterious effects, including B cell dysfunction. This dysfunction begins rapidly after infection and persists throughout the course of infection, without being fully restored by antiretroviral therapy. These alterations can lead to lymphomas and a multitude of auto-immune diseases. In people living with HIV, B-cell deregulation leads to an increase in “precursor-like” marginal zone (MZ) B cell frequency and their secretion of IL-10, to an increase in B-cell activating factor (BAFF), and to hyperglobulinemia. In addition, Nef has been detected in the serum and dendritic cells of infected individuals, its levels correlating with BAFF levels in affected patients.

The analysis of an RNA-seq performed on precursor-like MZ B cells indicated a highly significant drop in NR4A1-3 and CD83 levels in HIV⁺ progressors compared to HIV⁻ controls and HIV⁺ elite controllers. In fact, our team has previously demonstrated regulatory “Breg” potential associated to NR4A and CD83 expression in blood and tonsil precursor-like MZ B cells. The majority of this population also co-expresses CD73 and CD39, molecules involved in adenosine synthesis, adenosine being a regulator of NR4A expression.

Therefore, we wanted to study the effects of BAFF and Nef on the modulation of NR4A, CD83, CD73 and CD39 expression in tonsil MZ B cells as well as the effect of dihydroergotamine (DHE) on this model, studies having already shown its positive modulation on the NR4As. We were also interested in the effects of Nef on IL-10 production by MZ B cells. We found that after incubation with BAFF and Nef, NR4A1 and CD83 expression was often lower than after an incubation with BAFF only, which seemed to increase their expression. This corresponds with the results of the RNA-seq mentioned above. After incubation with Nef alone, NR4A and CD83 expression is similar to the expression levels found after incubation without treatment. Some patients did demonstrate a slight decrease in the expression of these molecules, a normal observation considering all samples contain a basal level of BAFF. In addition, our results demonstrate that DHE increases NR4A1 and NR4A3 levels after their expression is initially decreased

by Nef, and its effect seems more significant in MZ and precursor-like MZ B cells. These results suggest the usefulness of DHE for the reduction of inflammatory levels in individuals living with HIV, the NR4As having an anti-inflammatory role by decreasing the frequency of NFκB, a molecule positively modulated by Nef. Furthermore, we noted the populations expressing IL-10 mainly co-express CD10. Unfortunately, Nef's previously reported effect on IL-10 expression was not noticed, indicating the need for further studies using our tonsil samples. In conclusion, our results suggest the value of therapeutic agents targeting NR4As in addition to antiretroviral therapy, their modulation of MZ and precursor-like MZ B cells possibly being the key to controlling inflammatory levels in individuals living with HIV.

Key words: human immunodeficiency virus, Nef, B cells, marginal zone, precursor like MZ B cells, BAFF, BLyS, inflammation

Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Revue de littérature.....	1
1. Virus d'Immunodéficience humaine (VIH).....	1
1.1. Origine.....	1
1.2. Découverte.....	2
1.3. Épidémiologie.....	2
1.4. Structure du VIH-1.....	3
1.5. Génome du VIH-1.....	3
1.5.1. Facteur négatif du VIH-1 (Nef).....	4
1.5.1.1. Esquive du système immunitaire.....	5
1.5.1.2. Rôle dans l'inflammation.....	6
1.5.1.3. Prévention de la surinfection.....	6
1.6. Cycle répliatif.....	6
1.6.1. Entrée dans la cellule.....	6
1.6.2. Décapsidation.....	8
1.6.3. Transcription inverse.....	8
1.6.4. Transcription, assemblage et sortie.....	9
2. Pathogenèse du VIH-1.....	11
2.1. Transmission.....	11
2.2. Phases cliniques de progression.....	11
2.2.1. Phase aigüe.....	11
2.2.1.1. Importance de l'épithélium des muqueuses.....	13
2.2.2. Phase chronique.....	13
2.2.3. SIDA.....	15
2.3. Traitements antirétroviraux.....	15
2.4. Facteurs immunologiques de l'hôte.....	16

2.4.1. Lymphocytes B.....	16
2.4.2. Cellules dendritiques.....	16
2.4.2.1. Cellules dendritiques myéloïdes.....	17
2.4.2.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	17
2.4.3. Lymphocytes T CD4 ⁺	18
2.4.4. Lymphocytes T CD8 ⁺	19
2.4.5. Cellules NK.....	20
2.4.6. Activation immune liée au VIH.....	21
3. Lymphocytes B.....	22
3.1. Différenciation des lymphocytes B.....	22
3.1.1. Développement des cellules B dans la moelle osseuse.....	22
3.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires.....	25
3.2. Différentes populations de lymphocytes B.....	26
3.2.1. Lymphocytes B B1.....	26
3.2.2. Lymphocytes B folliculaire.....	27
3.2.3. Lymphocytes B de la zone marginale.....	27
3.2.4. Sélection des lymphocytes B folliculaires et de la zone marginale.....	28
3.3. Réponse T-dépendante.....	28
3.3.1. Le centre germinatif.....	29
3.4. Réponse T-indépendante.....	30
3.5. Fonctions des lymphocytes B.....	31
3.5.1. Fonctions effectrices des anticorps.....	31
3.5.2. Cellules B régulatrices « Breg ».....	32
3.5.2.1. Adénosine.....	34
3.5.2.2. La sous-famille NR4A.....	36
3.6. Les lymphocytes B dans le contexte d'une infection au VIH.....	39
3.6.1. Infection des lymphocytes B et transmission.....	39
3.6.2. Perturbation de la dynamique des populations de lymphocytes B.....	39
3.6.2.1. Lymphocytes B mémoires.....	39
3.6.2.2. Hypergammaglobulinémie.....	40

3.6.2.3. Perturbation de l'homéostasie et hypercytokinémie pro-inflammatoire.....	41
3.6.2.4. Rôle des cellules Tfh CD4 ⁺	41
3.6.2.5. Épuisement des lymphocytes B.....	42
3.6.2.6. Lymphocytes B des muqueuses.....	43
3.6.3. Effet de la thérapie sur la restauration du compartiment B.....	43
3.7. Importance de la réponse B dans le contexte d'une infection au VIH.....	44
4. Lymphocytes B de la zone marginale.....	46
4.1. Zone marginale et ontogenèse des cellules B MZ.....	46
4.1.1. Découverte de la zone marginale et des cellules B MZ.....	47
4.2. Rétention des cellules B MZ dans la zone marginale.....	47
4.2.1. Cellules MZ transitoires.....	48
4.3. Présentation antigénique aux cellules B MZ.....	48
4.4. Différenciation en plasmablastes.....	49
4.5. Molécules exprimées par les lymphocytes B MZ.....	50
4.6. Réponse des cellules B MZ aux antigènes T-indépendants.....	51
4.7. Réponse des cellules B MZ aux antigènes T-dépendants.....	51
4.8. Différences entre les cellules B MZ et les cellules mémoires humaines.....	52
4.9. Cellules MZ-like humaines.....	53
4.9.1. Cellules amygdales et ses populations.....	54
5. B-cell activating factor (BAFF).....	55
5.1. Cellules exprimant BAFF.....	56
5.2. Récepteurs de BAFF.....	56
5.3. Fonction de BAFF.....	58
5.3.1. Survie des cellules B.....	59
5.4. Implications dans l'auto-immunité.....	60
5.4.1. Inflammation causée par un excès de BAFF.....	60
5.5. Implication dans le VIH.....	62
6. Modèle murin VIH transgénique.....	64
Hypothèse.....	66
Objectifs.....	67

Matériels et Méthodes.....	68
Résultats.....	72
Discussion.....	93
1. Populations de cellules d’amygdales humaines.....	93
2. Entrée de Nef dans les cellules B.....	94
3. Effets de BAFF et de Nef sur les marqueurs exprimés par les cellules B MZ.....	96
4. Effet du DHE sur les marqueurs exprimés par les cellules B MZ.....	99
5. Expression d’IL-10 par les cellules B MZ.....	101
Conclusion.....	104
Perspectives.....	106
Bibliographie.....	107
Annexes.....	xii
Annexe 1. Article <i>NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells</i>	xiii
Annexe 2. Affiche du 20 ^e congrès des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM.....	xxxv

Liste de figures

Figure 1. Effet de Nef sur les lymphocytes B

Figure 2. Cycle répliatif du VIH

Figure 3. Différenciation des lymphocytes B

Figure 4. Rôle de CD39, de CD73 et de l'adénosine dans la modulation de l'inflammation

Figure 5. Analyse immunohistochimique d'une section d'amygdale illustrant l'épithélium, la zone marginale, le centre germinatif, la zone claire (LZ) et la zone sombre (DZ)

Figure 6. Formes existantes de BAFF et de APRIL et leurs récepteurs respectifs

Figure 7. Expression des NR4As et de CD83 chez les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs d'individus VIH⁻, VIH⁺ et élites contrôleurs (Doyon-Laliberté et al; en préparation)

Figure 8. Populations retrouvées dans les cellules d'amygdales non isolées

Figure 9. Efficacité de l'enrichissement de lymphocytes B chez les PBMC

Figure 10. Efficacité de l'enrichissement de lymphocytes B chez les cellules d'amygdales

Figure 11. Niveaux de BAFF dans les amygdales de chacun des donneurs utilisés lors de cette étude.

Figure 12. Culture de lymphocytes B d'amygdales avec différentes concentrations de BAFF recombinant en présence ou en absence de Nef

Figure 13. Effets de BAFF recombinant et de Nef sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 chez les lymphocytes B totaux, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales

Figure 14. Effets de BAFF et de Nef sur l'expression de CD83, NR4A1, CD73, CD39 par les lymphocytes B totaux

Figure 15. Entrée de Nef dans les populations de lymphocytes B d'amygdales après 3h d'incubation

Figure 16. Test de temps d'incubation et de concentration de BAFF recombinant pour l'observation de l'effet du DHE sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 chez les lymphocytes B, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales

Figure 17. Effet du DHE sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 et NR4A3 chez les lymphocytes B totaux, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales

Figure 18. Expression d'IL-10 par les lymphocytes B des cellules d'amygdales

Annexe I :

Figure 1. RNA-Seq analyses of (A) NR4A1, (B) NR4A3, (C) NR4A2, and (D) CD83, as well as (E) CD39 and (F) CD73 expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells.

Figure 2. Flow-cytometry analyses of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 expression by live ex vivo unstimulated human blood B-cells.

Figure 3. RNA-Seq analyses of HLA-G, TLR7, 9, 10, and CD1a, c, d, and IL-21R expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells.

Figure 4. RNA-Seq analyses of Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1), TGF-1, IL-35, granzyme B, PD-L1, IL-10, and IL-10R expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells.

Figure 5. Flow-cytometry analyses of live unstimulated human tonsillar B-cells.

Figure 6. Reduced CD4⁺ T-cell proliferation following co-culture with precursor-like MZ B-cells.

Liste des abréviations

6-MP : 6-mercaptopurine
ADCC : *antibody-dependent cellular cytotoxicity*
ADNc : ADN complémentaire
ADO : adenosine
ADOR : *adenosine receptor*
AID : *activation-induced cytidine deaminase*
AIRE : *autoimmune regulator*
APRIL : *a proliferation-inducing-ligand*
BAFF : *B lymphocyte stimulator*
BAFF-R : *BAFF receptor*
Bcl6 : *B-cell lymphoma 6*
BCMA : *B-cell maturing factor*
BCR : *B cell receptor*
Blimp-1 : *B lymphocyte-induced maturation protein-1*
BLyS : *B lymphocyte stimulator*
Breg : cellule B régulatrice
BTK : *Bruton tyrosine kinase*
CLR : *C-type lectin receptor*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CNR2 : récepteur cannabinoïde 2
CSR : *class-switch recombination*
CTD : domaine terminal carboxyle
CTL : *cytotoxic T lymphocyte*
CTLA-4 : *antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique*
CycT1 : cycline T1
DC : cellules dendritiques
DC-SIGN : *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin related*
DHE : déhydroergotamine
DLL1 : *delta-like 1*
EC : cellules épithéliales
ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*
FOXP3 : *forkhead box P3*
FasR : *Fas receptor*
FcεRII : *Fc receptor, IgE, low affinity II*
GALT : *gut-associated lymphoid tissue*
G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*
GI : gastro-intestinal
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
HAART : *highly active antiretroviral therapy*

HESN : *highly exposed seronegative*
HLA : *human leukocyte antigen*
HMGI(Y) : *high-mobility group DNA-binding protein*
HSC : *cellules hématopoïétiques précurseurs*
HTLV-III : *human leukemia T cell virus III*
ICAM1 : *intracellular adhesion molecule 1*
IFNa : *interféron de type alpha*
IKKi : *inducible inhibitor of NFkB kinase*
ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*
iTreg : *induced T-regulatory cell*
KIR : *killer immunoglobulin-like receptor*
KO : *knock-out*
LAV : *Lymphadenopathy Associated Virus*
LBD : *domaine de liaison du ligand*
LMA : *leucémie aiguë myéloblastique*
LPS : *lipopolysaccharides*
LTR : *long terminal repeat*
MALT : *mucosa associated lymphoid tissue*
MAP : *mitogen activated protein*
MCLR : *mannose C-type lectin receptor*
mDC : *cellules dendritiques myéloïdes*
MR : *mannose receptor*
MTX : *methotrexate*
MZ : *zone marginale*
NCR : *natural cytotoxicity receptor*
NFAT : *nuclear factors of activated T cells*
NIK : *NCK-interacting kinase*
NK : *natural killer*
NOTCH2 : *neurogenic locus notch homolog protein 2*
NR : *récepteurs nucléaires*
NR4A : *famille de récepteurs nucléaires 4 sous-groupe A*
ONR : *récepteur nucléaire orphelin*
P-TEFb : *positive transcription elongation factor b*
PALS : *gaines lymphoïdes périartériolaires*
PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*
Pax5 : *paired box protein Pax5*
PC : *cellule plasmatique*
PD-1 : *programmed cell death protein 1*
PD-L1 : *programmed death ligand-1*
pDC : *cellules dendritiques plasmacytoïdes*

PI3-K : *phosphatidylinositol 3-kinase*
PIC : complexe de préintégration
PRR : *pattern recognition receptors*
PTPN22 : *protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22*
PolII : polymérase II
RAG: *recombination-activating gene*
RANTES : *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*
RRE : *Rev responsive element*
S1P : *sphingosine-1-phosphate*
S1P2: *sphingosine-1-phosphate receptor 2*
SAMHD1 : *SAM domain and HD domain-containing protein 1*
SEC: *super elongation complex*
SDF1 : *stromal cell-derived factor 1*
SHM : hyper-mutations somatiques
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SIGLEC-6 : *sialic acid-binding Ig-like lectin 6*
SLE : lupus érythémateux systémique
STAT-1 à 3 : *signal transducer and activator of transcription 1-3*
TACI : *transmembrane activator, calcium modulator and cytochlophilin ligand interactor*
TAR : *trans-activation response*
TCR: *T cell receptor*
Tfh : *T follicular helper*
TGFβ : *transforming growth factor beta*
TLR : *Toll-like receptor*
TNFα : *tumor necrosis factor alpha*
TRAF : *TNF receptor-associated factor*
TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*
TSP-1 : thrombospondine 1
Th17 : *T-helper lymphocytes*
Treg : cellule T régulatrice
VCAM1 : *vascular cell adhesion molecule 1*
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH-1 : virus d'immunodéficience humaine 1
VIS : virus d'immunodéficience simienne

Remerciements

D'abord, je tiens à remercier Michel Roger de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir offert un environnement d'apprentissage riche dans lequel j'ai pu découvrir la beauté de la recherche.

J'aimerais aussi remercier Johanne Poudrier. Tu enseignes avec passion, compréhension, et patience. Merci de m'avoir guidé et encouragé.

Lyvia, merci de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours à la maîtrise. Merci d'avoir été mon amie et mon enseignante. Tu es une personne incroyable.

Je remercie aussi les autres membres de notre équipe, Marie-Claude, Kim, Laurence, Matheus. Merci pour nos conversations interminables portant sur de sujets infinis. Merci de toujours m'avoir supporté, que ça soit au niveau de mes expériences de laboratoire ou au niveau personnel.

Merci à mes amis qui ont su m'écouter et m'encourager, surtout Ariane et Élisabeth. Vous continuez à être des piliers dans ma vie et à célébrer mon parcours académique.

Merci à ma famille pour leur support et leur amour inconditionnel. Sans vous, je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Je vous aime de tout mon cœur.

Mes parents, merci de toujours m'avoir poussé à travailler plus fort, à aller plus loin. Vous m'avez transmis une passion pour l'apprentissage et vous m'avez continuellement fourni tout ce dont j'ai besoin pour atteindre mes objectifs. Tous mes accomplissements sont les vôtres.

Revue de littérature

1. Virus d'immunodéficience humaine

1.1 Origine

En 1999, une souche de virus d'immunodéficience simienne (VIS) nommée SIVcpz ressemblant de près au VIH a été retrouvée chez le chimpanzé. C'est cette découverte qui mena à l'hypothèse que le virus a dû, à un moment donné, être transmis d'un chimpanzé à un humain (1). Une recherche plus profonde mena à la découverte que les chimpanzés avaient acquis le virus en se nourrissant de deux espèces de singes ; le Mangabey à collier blanc et le Hocheur, portant deux souches de SIV. Les deux souches se sont fusionnées chez le chimpanzé pour créer le SIVcpz, qui infecta plus tard l'humain lorsque ce dernier entra en contact avec le sang ou les sécrétions mucosales du chimpanzé (2). En sautant du chimpanzé à l'humain, le SIVcpz devenu le virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1).

Le VIH est constitué de quatre groupes (M, N, O, P) chacun représentant une transmission du chimpanzé à l'humain. Le groupe M, constitué de 9 sous-types (A-D, F-H, J, K) (3) est le plus répandu (4). Le groupe O, découvert en 1990, est plutôt restreint au Cameroun, au Gabon et aux pays environnants et représente moins de 1% des infections au VIH-1 (5; 6) tandis que les groupes N et P, découverts en 1998 (7) et 2009 (8), n'ont infectés que 13 et 1 individus, respectivement (9; 10). Le groupe P proviendrait en fait des gorilles infectés au SIVgor (4), qui serait dérivé du SIVcpz lorsque le virus passa d'un chimpanzé à un gorille 100 à 200 ans passés (11).

Un échantillon de sang obtenu en 1959 d'un homme de la République du Congo serait la première preuve du VIH chez l'humain. À l'aide de méthodes statistiques, les chercheurs suspectent donc que la première transmission du SIV en VIH à l'humain fut en 1920 au Congo. Cette région vue aussi les premiers cas de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (12). Depuis l'apparition du VIH, les comportements humains et le développement socio-économique à l'échelle globale ont permis la propagation mondiale du virus.

1.2 Découverte

En 1981, plusieurs hommes gais aux États-Unis furent diagnostiqués avec un cancer rare, le sarcome de Kaposi et une infection pulmonaire opportuniste, la pneumocystose (13; 14). La maladie fut associée aux homosexuels, mais ne tarda pas à affecter d'autres populations tels les hémophiles, et les utilisateurs de drogues injectables, ces derniers étant particulièrement à risque dû à la prévalence d'un bas statut socioéconomique et de bas niveaux d'éducation (15; 16). La maladie obtint finalement le nom de Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) en septembre 1982, nommé par le *Center for Disease Control* (17).

En 1983, le VIH fut isolé et nommé *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV) par Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi à l'Institut Pasteur en France. En même temps, des chercheurs de l'Institut National du Cancer aux États-Unis isolèrent le même virus, le nommant *Human leukemia T cell virus III* (HTLV-III). En 1986, après avoir découvert que les deux virus étaient en fait le même, celui-ci fut nommé Virus d'immunodéficience humaine (VIH) (18). En 1986, un virus avec une morphologie similaire au VIH-1, mais possédant différents antigènes fut découvert en Afrique du Sud, causant aussi le SIDA chez les individus infectés. Ce virus fut nommé VIH-2 (19). Ce mémoire, étant axé sur l'étude du VIH-1, réfèrera à celui-ci en utilisant le terme « VIH ».

1.3 Épidémiologie

Depuis sa découverte aux États-Unis en 1981, le VIH a infecté plus de 77 millions d'individus, 35 millions étant décédés en conséquence de cette infection acquise principalement par voie hétérosexuelle (20). En 2017, 36,9 millions d'individus vivent avec le VIH et 59% sont traités. Malgré ces statistiques, le taux de nouvelles infections a chuté de 47% en 2017 comparé à 1996, et le taux de décès liés à l'infection en 2017 est 51% plus bas qu'en 2004, où la mortalité était à un apogée. Le but actuel de UNAIDS est l'atteinte de 90-90-90 où 90% des individus infectés par le VIH sont au courant de leur infection, 90% des gens diagnostiqués sont traités par thérapie antirétrovirale et 90% des individus traités atteignent une suppression de la charge virale (21).

Aujourd'hui, les populations à risque sont les hommes ayant des relations sexuelles avec les hommes, les gens transgenres, les travailleuses du sexe et les utilisateurs de drogues injectables (22). Ces populations, ainsi que les clients des travailleuses du sexe et les partenaires sexuels des populations clés, représentaient 50% des nouvelles infections au VIH en 2017. En Afrique subsaharienne, les femmes sont plus à risque d'être infectées et représentaient 59% des nouvelles infections en 2017 due à plusieurs facteurs dont la violence contre les femmes, des facteurs psychologiques et les lois exigeant le consentement parental afin d'avoir accès à des services de santé sexuels et reproductifs. À l'extérieur de cette région, les hommes et les garçons étaient victimes de 69% des fatalités liées au SIDA. Malgré des efforts ardues des chercheurs, les données sur le VIH et le SIDA sont presque toutes approximatives puisque pour des raisons sociales, religieuses, ou même légales, les populations clés peuvent être réticentes à s'identifier (23).

1.4 Structure du VIH-1

Jusqu'à 8% de l'ADN humain provient d'anciennes séquences rétrovirales, le résultat d'infections périodiques chez les mammifères au cours de l'histoire (24). Le VIH, faisant partie de la famille des *retroviridae*, est entouré d'une membrane riche en lipoprotéines et a un diamètre de 100 nm. La membrane contient des trimères de gp120 et de la glycoprotéine transmembranaire gp41. Les deux sont liés ensemble de façon non covalente permettant à la gp120 d'être libéré spontanément. La matrice, recouverte de l'enveloppe, est composée de la protéine p17. La capsid, elle, est composée de polymères de p24 et contient les enzymes virales transcriptase inverse, protéase et intégrase, ainsi que deux copies de l'ARN du VIH attachées à une nucléoprotéine (25).

1.5 Génome du VIH-1

Le génome du VIH est composé de deux copies identiques d'ARN à simple brin qui ne codent que pour 16 protéines (26). Le virus est caractérisé par trois gènes de structure dont *gag*, *pol* et *env*. *Gag* code pour les protéines structurales de la capsid (p24, p7 et p6) ainsi que pour la matrice (p17) tandis que *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) qui reconnaissent les récepteurs à la surface des cellules cibles. Gp120 contient 5 domaines conservés (C1 à C5) et 5 boucles variables (V1-V5)

(27). Les enzymes nécessaires à la réplication virale (transcriptase inverse, intégrase et protéase) sont codées par *pol*. D'autres gènes accessoires et régulateurs jouant un rôle dans la modulation de la réplication virale sont aussi présents (*tat*, *rev*, *nef*) (25). Le génome contient également des régions *long terminal repeat* (LTR) régulatrices à chaque bout des molécules d'ARN. Chaque LTR contient les régions U3, R et U5. (28) U3 représente des sites de liaison pour les facteurs de transcription cellulaires (29) et R, comprenant TAR (*transactivation response element*), est impliqué dans la transactivation médiée par Tat (30).

1.5.1. Facteur négatif du VIH-1 (*Nef*)

Nef est une protéine accessoire soluble de 27-35 kDa produite par le VIH-1 à partir d'un transcrit épissé à répétition. Elle est associée en partie à la membrane plasmique de la cellule via une molécule d'acide tétradécanoïque ajoutée à la partie N-terminus de la protéine post-traduction (31). Nef serait composée d'un centre globulaire, d'une région N-terminale et d'une boucle C-terminale et son fonctionnement exige un aspartate à l'acide aminé 123 requis pour l'homodimérisation (32). Elle agit principalement comme une protéine de liaison entre sa protéine cible et la machinerie endosomale/vésiculaire de la cellule, dirigeant la protéine cible vers l'appareil de Golgi ou un lysosome (33). Son importance dans la pathogenèse de l'infection au VIH-1 découle du fait que les souches ne codant pas pour Nef ou ayant une basse expression de celle-ci mènent à une plus basse charge virale et de plus hauts niveaux de lymphocytes T CD4⁺ chez les individus infectés et ces individus ne développent généralement pas le SIDA (34; 35). Des résultats similaires ont été observés chez les macaques infectés par des souches de SIV présentant une déficience en Nef (36).

Nef pénètre plusieurs populations de cellules (37) dont les cellules dendritiques (DC) ayant un effet sur leur fonction et leur maturation (38) et induisant une sécrétion distincte de cytokines et chimiokines (38). En fait, la protéine mène à l'augmentation des niveaux de *B lymphocyte stimulator* (BAFF) sur les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) chez les individus infectés au VIH en modulant la signalisation du *signal transducer and activator of transcription 1-3* (STAT1-3) (39). Nef soluble est propulsé par les

prolongements des macrophages ou absorbé par les lymphocytes B par endocytose ou pinocytose, causant la suppression des *class-switch recombination* (CSR) ou la permutation de classe des immunoglobulines en bloquant la signalisation de CD40 (figure 1). Cette interaction nuit à la réponse des cellules B mémoires T-dépendantes à haute affinité (40; 41).

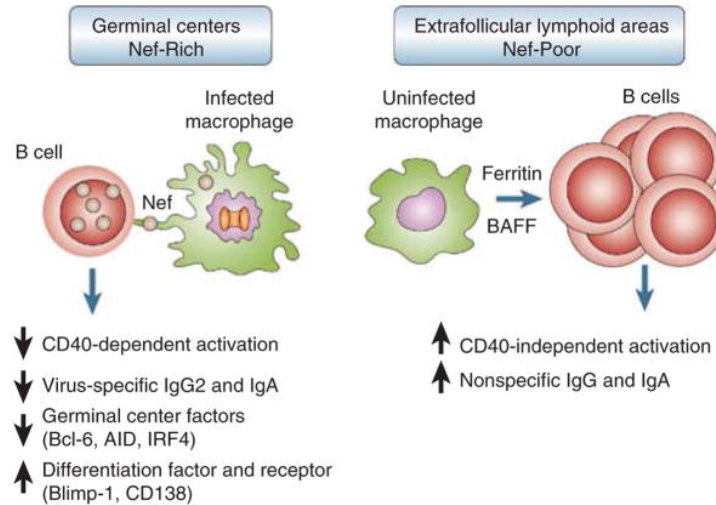


Figure 1. Effet de Nef sur les lymphocytes B (42). Représentation schématique des effets de Nef sur les lymphocytes B folliculaires. Nef livré aux cellules B par les macrophages infectés du centre germinatif inhibent la permutation de classe dépendante de CD40. De l'autre côté, les cellules B des zones extrafolliculaires contenant peu de Nef subissent une activation polyclonale en réponse aux hauts niveaux de ferritine et de BAFF.

1.5.1.1. Esquive du système immunitaire

Afin d'éviter la reconnaissance par le système immunitaire, Nef est capable de diminuer l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) en surface des cellules en causant leur internalisation. De plus, elle redirige les molécules CMH-I en chemin vers la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi. Une fois accumulées dans l'appareil de Golgi, les molécules CMH-I sont exportées dans des lysosomes et protéolysées. La perte de ces molécules en surface de la cellule prévient la lyse des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques. Nef diminue aussi l'expression des molécules *human leukocyte antigen* HLA-A et HLA-B responsables de la

présentation endogène d'antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques sans affecté HLA-C et HLA-E qui sont impliqués dans l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules *natural killer* (NK). La présence d'un résidu de tyrosine en position 320 de la queue cytoplasmique de HLA-A et HLA-B permet cette sélectivité (37).

1.5.1.2. Rôle dans l'inflammation

L'inflammation chronique observée chez les patients atteints du VIH serait entre autre liée à la persistance de Nef provenant des réservoirs du virus. Ceci suggère que le virus peut produire Nef indépendamment de sa réplication (43). Contrairement au SIV, la protéine Nef du VIH perd son habileté de diminuer l'expression de CD3 mais pourrait contribuer à l'état d'inflammation chronique. Par contre, plusieurs contradictions à cette hypothèse persistent (37).

1.5.1.3. Prévention de la surinfection

La surinfection, l'acquisition d'une 2^e souche du VIH après une infection primaire, est toxique pour les cellules et cause une diminution de la production de virions (37). Par moyen d'endocytose médiée par la clathrine (44; 45) et par une augmentation de rétention endosomale des molécules de CD4 (46; 47), Nef diminue l'expression de CD4 membranaires, le récepteur principal du VIH-1 (48). Cette action permet une libération plus efficace de nouveaux virions (49; 50), augmente l'infectiosité de ces virions (51) et prévient la surinfection (52). Cette habileté de Nef à diminuer l'expression de CD4 en surface est observée chez tous les types de cellules (53). Nef prévient aussi la surinfection en diminuant l'expression de récepteurs du VIH tels que CCR5 est diminuer de façon efficace tandis que CXCR4 n'est que légèrement affecté par la protéine du virus (37).

1.6 Cycle répliatif

1.6.1. Entrée dans la cellule

Afin d'entrer dans une cellule, le virion du VIH doit repérer une cellule permissive. Certaines molécules de surface telle les *pattern recognition receptors* (PRR) dont *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin related* (DC-SIGN) peuvent s'attacher de façon spécifique ou non avec les protéines de l'enveloppe virale. Ces interactions

améliorent l'efficacité de l'infection en rapprochant le virion de la cellule hôte et donc du corécepteur CD4, mais ne sont pas nécessaires pour l'établissement de l'infection (27).

60% des lymphocytes T, des précurseurs de lymphocytes T du thymus, des monocytes, macrophages, éosinophiles, DC et des microglies du système nerveux possèdent la glycoprotéine CD4 à leur surface. C'est à cette molécule que la gp120 du virus se lie afin d'entamer le processus de pénétration cellulaire. Suite à l'interaction entre gp120 et CD4, l'enveloppe virale du VIH subit un changement de conformation où il y a réarrangement des boucles V1 et V2 suivi de V3, ce qui expose le domaine de gp120 capable de lier des chémorécepteurs. Il existe plusieurs ligands capables d'agir comme corécepteurs du VIH facilitant l'entrée du virus dans la cellule, mais les plus communs sont CXCR4 et CCR5 (54). L'importance de ces corécepteurs est reflétée par le fait que les individus déficients en CCR5 sont résistants à l'infection au VIH-1 (55). CXCR4 se retrouve sur plusieurs cellules, dont les lymphocytes T, et se lie naturellement à *stromal cell-derived factor 1* (SDF1) tandis que CCR5, un récepteur de la famille des β -chimiokines, se retrouve sur les monocytes et macrophages, les DC et les lymphocytes T activés. Les souches du VIH peuvent être classifiées selon le corécepteur utilisé. Les souches R5 lient CCR5, les souches X4 lient CXCR4, et les souches R5X4 lient les 2 corécepteurs (56). Seules les souches R5 et R5X4 sont transmises entre individus (57) et les souches X4 ne deviennent prédominantes que plus tard dans l'infection (58).

Gp120 lié à CD4 ainsi qu'à un chémorécepteur permet une meilleure fixation du virus menant à l'insertion de gp41, une protéine de fusion hydrophobe, dans la membrane cellulaire cible. L'interaction des séquences HR1 et HR2 de gp41 permet le changement de configuration de la partie extracellulaire de cette glycoprotéine en épingle, et cette structure rapproche les membranes virales et cellulaires, permettant la fusion de celles-ci et ainsi l'entrée de la capsid virale dans la cellule via un pore de fusion (27). Une fois dans la cellule, la capsid se désagrège, libérant les deux brins d'ARN viral (25). Le génome viral se déplace ensuite vers le noyau de la cellule cible à l'aide de microtubules (59).

1.6.2. Décapsidation

Le processus de décapsidation du VIH est encore mal compris. Il implique probablement la phosphorylation de la matrice médiée par une kinase *mitogen activated protein* (MAP), l'action de la cyclophiline A et les protéines virales Nef et Vif. L'association de Nef à une pompe à proton (V-ATPase) pourrait produire des changements locaux de pH, promouvant la décapsidation (60).

1.6.3. Transcription inverse

Après l'entrée du virus dans la cellule et la décapsidation vient la transcription inverse où l'ARN viral est converti en ADN proviral grâce à la transcriptase inverse et à l'intégrase. Le complexe de transcription inverse est libéré de la membrane plasmique et accoste des microfilaments d'actine. Cette interaction est médiée par la matrice phosphorylée et est requise pour la synthèse adéquate de l'ADN viral. Vif permet la stabilisation du complexe de transcription inverse en maîtrisant les effets déstabilisants des protéines de l'hôte (60).

Le site actif de la ribonuclase H de la transcriptase inverse forme une double hélice hybride ARN/ADN et dégrade ensuite l'hélice d'ARN. Il y a ensuite complétion du brin complémentaire d'ADN, formant une molécule d'ADN à double brin (25). La terminaison de la transcription inverse résulte en la formation du complexe de préintégration (PIC). Ce dernier est composé d'ADN complémentaire (ADNc) à double brin, de l'intégrase, de la matrice, du Vpr, de la transcriptase inverse et du *high-mobility group DNA-binding protein* (HMGI[Y]). Le PIC se déplacerait vers le noyau à l'aide de microtubules, entrant par un pore nucléaire (60).

Une fois le PIC dans le noyau, l'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire en clivant des nucléotides de chaque extrémité 3' de l'ADN viral. L'intégrase clive aussi l'ADN cellulaire et catalyse la liaison de cette dernière avec l'ADN viral. Il est nécessaire que la cellule soit activée afin que ce processus ait lieu et que l'ADN provirale soit exprimé (25).

Avant d'être intégré dans le génome cellulaire, l'ADN viral peut être retrouvé dans le noyau sous forme linéaire ou circulaire 1-LTR ou 2-LTR (61). Ces formes ne produisent pas de virus infectieux, mais elles sont capables de produire des niveaux basaux de Nef, Tat et Rev par activation du promoteur LTR par certains facteurs cellulaires dont NF-kB (61; 62).

1.6.4. Transcription, assemblage et sortie

Le virion contient tout le matériel nécessaire à la synthèse de nouveaux virions infectieux. Les enzymes virales sont contenues dans la polyprotéine Gag-Pro-Pol, qui est générée lorsque les ribosomes s'occupant de la traduction se déplacent au cadre de lecture ouvert de *gag* à l'extrémité 3'. Ces ribosomes traduisent ensuite le gène *pol* (63).

La transcription de l'ADN proviral produit des protéines de régulation de l'expression des gènes tel Tat et Rev. Ceux-ci stimulent et facilitent la transcription et l'expression de gènes structuraux et enzymatiques, et inhibent la production de protéines de régulation. Ces actions stimulent la production de particules virales matures (25). Plus précisément, Tat est un activateur du promoteur du LTR et sa séquence cible, nommée *transactivation response* (TAR), est située à l'extrémité 3' du LTR (64). Sans Tat, le recrutement des facteurs de transcription cellulaires est suffisant pour initier la transcription, mais celle-ci produira peu de transcrits complets (65). Rev, lui, se lie à un *Rev responsive element* (RRE) afin de faciliter le transport de molécules d'ARN au travers la membrane nucléaire, permettant leur traduction dans le cytoplasme (66).

L'ARN messager viral migre vers le cytoplasme afin de synthétiser des protéines structurales et des virions. La protéine Gag du VIH dirige les événements majeurs liés à l'assemblage du virion (63). Le noyau du virion est formé par les protéines codées par *pol* et *gag* tandis que les glycoprotéines de l'enveloppe proviennent du gène *env*. Env et les protéines accessoires proviennent d'ARN épissés et ces ARNm quittent le noyau via la route d'exportation d'ARNm normale. En contraste, l'ARN non épissé ou épissé de façon incomplète quitte le noyau via une voie d'exportation dépendante de Rev. Gp120 et gp41 sont les produits du clivage de gp160. Ces protéines entourent deux brins d'ARN viral et

des enzymes de réplication formant la capsid virale qui se dirige ensuite vers la surface de la cellule. La scission de la polyprotéine Gag-Pol par les protéases virales produit des virions matures infectieux (67) qui bourgeonnent hors de la cellule hôte, obtenant de celle-ci leur nouvelle enveloppe. Le bourgeonnement, médié par *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT) qui est recruté par la protéine p6 de Gag (63), permet au virion de s'enrichir avec des protéines, des phospholipides et du cholestérol provenant de la cellule (25).

Afin d'éviter l'interaction de gp120 avec les molécules CD4 lors du bourgeonnement du virion, Nef accélère l'endocytose et la dégradation des CD4 et des molécules de CMH-I et II présentes à la surface cellulaire (68). Les molécules de CD4 sont ensuite captées dans le réticulum endoplasmique par gp160 et dégradées par Vpu, libérant la gp160 (69). Vpu s'occupe aussi de former des pores conducteurs afin de faciliter la libération des virions (70). Un schéma du cycle réplcatif est illustré à la figure 2.

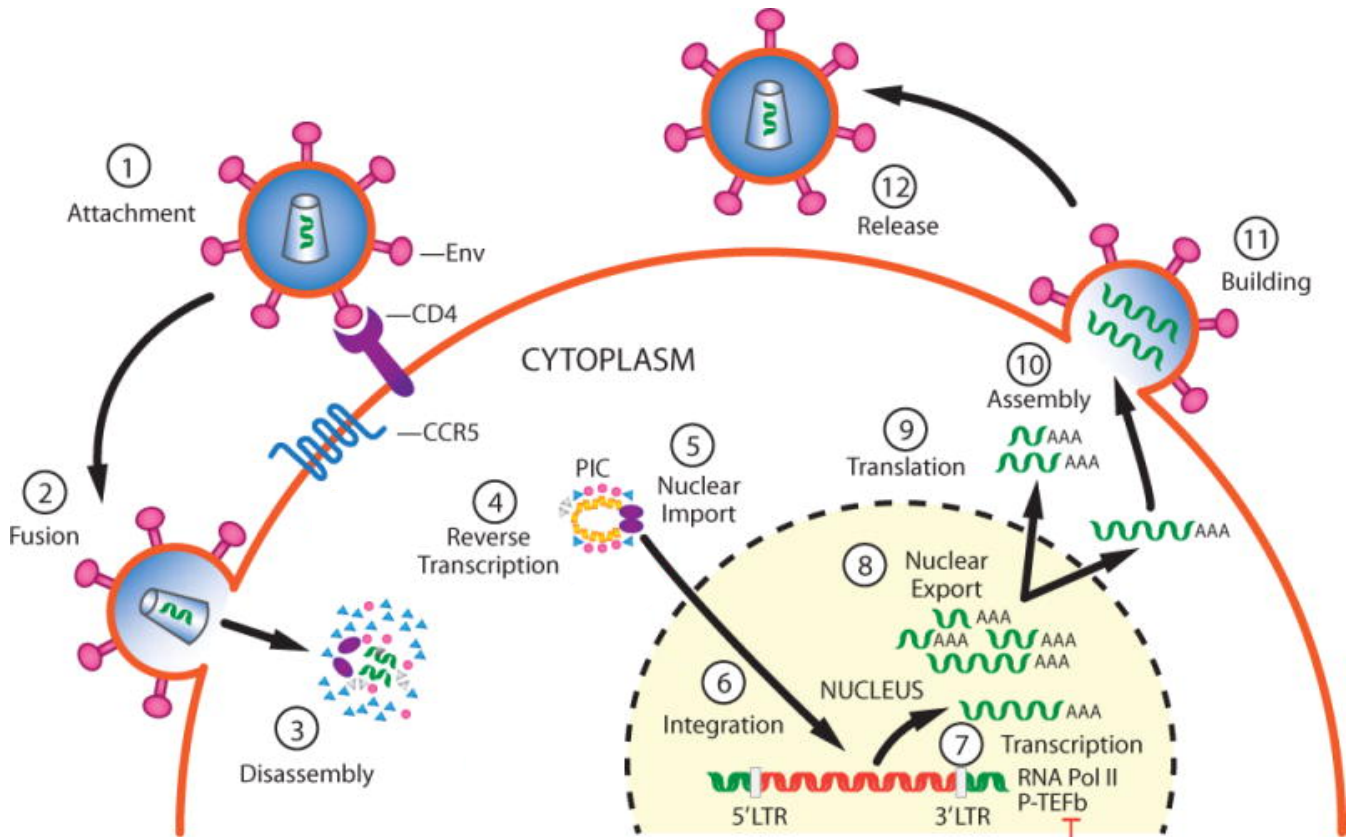


Figure 2. Cycle réplcatif du VIH (71). Les étapes de la réplication virale sont numérotés.

2. Pathogenèse du VIH-1

2.1. Transmission

Le VIH peut être transmis de plusieurs façons : la transmission se fait principalement par les muqueuses et par un contact avec des liquides et sécrétions contaminés tels le sang, le sperme, les sécrétions vaginales et de l'anus, et le lait maternel. Le virus se transmet aussi de mère à enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement ou par voie intraveineuse ou sous-cutanée lors de contact avec du matériel contaminé comme chez les utilisateurs de drogues injectables ou lors de procédures avec des instruments médicaux contaminés (72). Aujourd'hui, la transmission par voie hétérosexuelle est responsable de 85% des infections au VIH (73).

Certaines recherches suggèrent que la transmission vaginale du virus est le résultat de l'infection d'une petite quantité de macrophages, DC ou lymphocytes T CD4⁺ situés dans la lamina propria (74). Le virus s'infiltré dans ces cellules de plusieurs façons, dont par endocytose, transcytose, ou en s'attachant aux *mannose C-type lectin receptors* (CLRs) situés sur les macrophages et les DC (75). Chez le modèle animal du Macaque rhésus exposé au SIV, la pénétration de la barrière épithéliale de la muqueuse par le virus est observée après seulement quelques heures (76). Après avoir croisé cette barrière, la population fondatrice de cellules infectées subit une expansion locale durant une semaine, ce qui mène à une production suffisante de virus pour le déclenchement d'une infection systémique des organes lymphoïdes secondaires (77).

2.2. Phases cliniques de progression

2.2.1. Phase aigüe

Immédiatement après l'exposition et la transmission, le virus commence à se répliquer dans la muqueuse, la sous-muqueuse et les tissus lymphoréticulaires sans être détectable dans le plasma (78; 79). Les premières cellules cibles semblent être des lymphocytes T CD4⁺ principalement au repos n'exprimant pas de marqueurs d'activation (80), mais ayant une expression résiduelle de co-récepteurs, ce qui est nécessaire pour l'établissement d'une infection productive (81). L'intégrine $\alpha 4\beta 7$, présente dans l'intestin,

facilite l'entrée du virus et favorise l'infection de lymphocytes *T helper 17* (Th17) CD4⁺ ayant ce même phénotype (82). Les cellules Th17, cruciales pour le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale des muqueuses, pourraient être une source importante d'inflammation menant à la dissémination subséquente du virus (83). En effet, le tractus génital est enrichi de lymphocytes T CD4⁺ Th17 CCR6⁺ qui sont préférentiellement infectés par le VIH lors des 48 h suivant l'infection, et qui contribuent à la persistance virale au-delà de la thérapie antirétrovirale (83; 84). Il a aussi été démontré que le tractus génital, porte d'entrée principale du VIH à côté de la voie anale, contient des lactobacilles qui mènent à l'acidification du mucus cervico-vaginal par la production d'acide lactique. Cette acidification élimine la charge négative du virus sans lyser sa membrane, et ralentit sa diffusion de 1000 fois (85).

Le virus demeure indétectable pendant 7 à 21 jours (57; 86), période nommée phase éclipse, mais migre rapidement vers le *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) en passant par les ganglions lymphatiques (87), où il se retrouve après avoir traversé la barrière épithéliale des muqueuses par différents mécanismes dont les microfissures engendrées par des relations sexuelles (76; 88). De plus, seule une couche simple de cellules épithéliales protège l'endocol et constitue la zone de transformation entre l'ecto et l'endocol (89). Une fois dans les ganglions lymphatiques, le virus a accès à beaucoup plus de cellules qui lui sont susceptibles à proximité les unes des autres (81).

Lors de la phase éclipse, les titres viraux augmentent exponentiellement et peuvent atteindre 10⁸ copies d'ARN par millilitre de plasma 3 à 4 semaines après l'infection (90) menant à une réduction drastique des lymphocytes T CD4⁺ (91). Ces niveaux de virémie diminuent grâce à la réponse immunitaire de l'hôte dont l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ (92). Des anticorps spécifiques au VIH sont observés entre 3 à 5 semaines après l'infection (93). Ceux-ci se lient aux antigènes du virus, déterminent la prévention de l'infection cellulaire (94) et ont un fort potentiel *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), menant à l'élimination de cellules infectées par les lymphocytes T et les cellules NK (95). Malheureusement, le virus mène à la perte progressive de cellules effectrices fonctionnelles, dont les cellules NK, qui contrôlent la réponse ADCC. De plus,

les souches du VIH mutant afin d'évader la réponse ADCC, diminuant de façon importante l'efficacité de ce mécanisme (95).

50% des gens infectés demeurent sans symptômes lors des quatre semaines suivant l'infection, tandis que l'autre moitié développent des symptômes similaires à ceux de la mononucléose (66). Les symptômes peuvent consister d'une fièvre, de malaises et de douleurs musculaires, d'une perte de poids et d'une lymphadénopathie (96), et persistent généralement pendant 7 à 10 jours (25).

2.2.1.1. Importance de l'épithélium des muqueuses

Il est facile d'attribuer un rôle moindre à la barrière épithéliale des muqueuses, mais celle-ci a en fait un rôle actif dans la réponse immunitaire de l'hôte. Contrôlées par les hormones œstradiol et progestérone, les cellules épithéliales des muqueuses peuvent guider la réponse innée contre les microorganismes (97). À l'aide de Toll-like receptors (TLRs) qui reconnaissent et répondent aux *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), ces cellules épithéliales peuvent prévenir le système immunitaire de la présence de pathogènes afin que ces derniers orchestrent la réponse appropriée (98). La signalisation des cellules épithéliales des muqueuses par chimiokines et cytokines peut aussi mener au recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) (99) et autres cellules impliquées dans la réponse immune innée, dans la réponse immune adaptative, et dans l'inflammation (81).

2.2.2. Phase chronique

Après la phase aigüe vient la phase chronique de l'infection au VIH, où une réduction de la virémie mène à une période asymptomatique due à l'activation du système immunitaire inné et adaptatif (100). La majorité des individus entrent en phase chronique environ 6 semaines après avoir été infectés et peuvent y demeurer pendant plus de 10 ans (101). Une inflammation chronique systémique est établie dès le départ causée par la persistance de la réplication virale dans les compartiments du corps chez ces individus (25). Il y a réduction lente et graduelle de lymphocytes T CD4⁺ (100) et destruction du tissu lymphoïde due à la réplication virale et à l'activation immunitaire. Ces événements mènent à une dissémination virale aux lymphocytes T CD4⁺ environnants, entraînant une

dispersion du virus dans le système lymphoïde (25). La phase chronique voit une réplication virale marquée dans la lamina propria, la sous-muqueuse intestinale, et dans les ganglions lymphatiques de drainage (102; 103). La progression de l'infection au VIH est déterminée par la capacité de l'individu à rétablir sa population de lymphocytes T mémoires dans le *mucosa associated lymphoid tissue* (MALT) et dans les ganglions lymphatiques, ainsi que sa capacité à contenir la réplication virale. Si l'individu est incapable de limiter la réplication virale, il y a détérioration des tissus lymphoïdes et une chute des niveaux de lymphocytes T CD4⁺ (25).

Les tissus lymphoïdes contiennent plusieurs cellules cibles rapprochées permettant une propagation virale facile entre cellules avec une faible pénétration des composés antirétroviraux, créant un réservoir pour le VIH. Les lymphocytes T CD4⁺ étant susceptibles à la réplication virale et pouvant contenir le virus latent représentent un second réservoir viral (87). Le virus en latence se retrouve sous 2 différentes formes dans les lymphocytes T CD4⁺ soit sous forme de préintégration labile, ou sous forme de postintégration stable (104; 105).

Selon la durée de la phase chronique, les individus atteints du VIH peuvent être classés dans 1 de 3 sous-groupes de progression. Les progresseurs classiques représentent 70-80% des individus infectés au VIH et demeurent en phase chronique pendant 6-8 ans. Chez eux, le virus demeure actif et il y a perte progressive des lymphocytes T CD4⁺, mais ils auront peu de symptômes. Les progresseurs rapides représentent 10-15% des individus infectés, ceux-ci ayant une phase chronique de 2 à 3 ans. Finalement, les progresseurs lents, représentant moins de 5% des infections au VIH, peuvent vivre sans symptômes pendant une très longue période de temps. Ceux-ci maintiennent un niveau de lymphocytes T CD4⁺ de 500 cellules/uL ou plus (106). Un sous-groupe de progresseurs lents nommé les « contrôleurs élites » n'ont pas de virus détectables dans leur sang et donc demeurent sans symptômes (107).

2.2.3. SIDA

Lorsque l'individu ne peut continuer à contrôler la réplication virale du VIH, l'infection mène à la destruction du système lymphoïde et à une diminution drastique du nombre de lymphocytes T CD4⁺. La perte de ces lymphocytes rend l'individu vulnérable à plusieurs infections opportunistes par des bactéries, virus, champignons, et parasites et à des tumeurs. En fait, le SIDA est défini par l'apparition d'infections opportunistes communes causées par *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, Cytomegalovirus, Herpes zostère ou des parasites entérohépatiques (108) et par un taux sanguin de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200 cellules/uL (106).

Les symptômes associés au SIDA sont l'inflammation propagée des ganglions lymphatiques, une perte de poids importante, une fièvre, et des troubles respiratoires et gastro-intestinaux. Un risque élevé de mortalité est aussi indiqué par une encéphalopathie progressive (25). Les individus en phase SIDA peuvent développer des lymphomes et la maladie de Kaposi, accélérant la progression de la maladie (109).

2.3. Traitements antirétroviraux

En 1985, le premier traitement du VIH fut développé par une équipe de chercheurs au National Cancer Institute. L'inhibiteur de la transcriptase inverse, nommé zidovudine, démontra qu'un traitement était possible, et fut un point de départ pour le développement de thérapies antirétrovirales subséquentes. Aujourd'hui, une trentaine de médicaments antirétroviraux sont offerts pour traiter les individus atteints du VIH. Parmi eux se trouvent les inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, dont les analogues de nucléotide et les inhibiteurs liant la transcriptase inverse, les inhibiteurs de protéase, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs d'entrée et les inhibiteurs d'intégrase. Comme leurs noms l'indiquent, chacune des 6 classes d'antiviraux cible un procédé distinct dans le cycle répliatif du VIH (110).

Le risque du développement d'une résistance virale lors de la monothérapie mena à la *highly active antiretroviral therapy* (HAART) dans les années 1990, un traitement de combinaison de différentes classes d'inhibiteurs (110). La combinaison d'un inhibiteur de

protéase et de deux analogues de nucléotides de la transcriptase inverse fut le premier traitement capable de diminuer les titres viraux en bas de la limite de détection (111).

Lorsqu'un individu atteint du VIH commence un traitement antirétroviral, ses niveaux de lymphocytes T CD4⁺ augmentent, la charge virale diminue et dans la plupart des cas, la morbidité et mortalité liée au virus revient à la normale (112). Par contre, l'individu doit adhérer à son traitement pour le reste de sa vie, ce qui peut être difficile pour des raisons de coûts, de disponibilité, de facteurs socioéconomiques et d'effets secondaires (113) tels la lipodystrophie, la dyslipidémie et l'ostéoporose (114). Malgré les avancements incroyables dans le traitement de l'infection au VIH, une inflammation chronique et une dérégulation immune persistent chez les individus traités, et il n'existe toujours pas de remède (87). De plus, même si un individu est sous traitement, le VIH mène à l'accélération des problèmes en lien avec le vieillissement tel les maladies cardiovasculaires (115).

2.4. Facteurs immunologiques de l'hôte

2.4.1. Lymphocytes B

Vues en détail dans la section 3.

2.4.2. Cellules dendritiques (DC)

Aux sites d'infection des muqueuses, les DC sont parmi les premières cellules à être exposées au virus afin d'orchestrer une réponse immunitaire innée et adaptative. Elles ont la capacité de coordonner une homéostasie entre la tolérance et la protection, permettant un meilleur contrôle de l'infection. Il existe 2 sous-types majeurs de DC : les mDC et les pDC. Les mDC, spécialisées en présentation d'antigènes, gèrent la réponse adaptative et peuvent être identifiées par leur expression de CD11c et HLA-DR (116), tandis que les pDC gèrent la réponse innée en sécrétant des interférons de type α (IFN α) (38). Les deux sous-types expriment CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4 et sont donc susceptibles à l'infection au VIH, malgré qu'ils entretiennent une infection moins productive que les lymphocytes T CD4⁺ (117; 118). En fait, les mDC peuvent restreindre la réplication virale grâce à leur facteur de restriction *SAM domain and HD domain-containing protein 1* (SAMHD1) (119).

2.4.2.1. Cellules dendritiques myéloïdes (mDC)

Les mDC, composées de cellules de Langerhans et de DC du derme (120) capturent et internalisent le virus grâce à leur PRRs, mais les mDC immatures peuvent quand même être infectés par celui-ci. Le virus capté par les mDC et infectant les mDC immatures infecte les lymphocytes T CD4⁺ environnant, propageant l'infection (121). Lors d'une infection au VIH, la fréquence des mDC dans le sang est diminuée, possiblement due à une migration vers les ganglions lymphatiques, ou à une augmentation de l'apoptose (122). De plus, comparativement aux patients sains, les DC du sang périphérique de patients infectés au VIH sont moins aptes à stimuler les lymphocytes T allogéniques (123). La diminution d'expression de CD80 et CD86 chez les DC DC-SIGN⁺ des patients infectés en serait peut-être la cause (124). On observe aussi une augmentation de l'expression du ligand *programmed death ligand-1* (PD-L1) à la surface des mDC, ce qui entraîne l'expression de *programmed cell death protein 1* (PD-1) chez les lymphocytes T (125). Les mDC infectés au VIH n'atteignent pas leur état mature, et pourraient stimuler la production d'IL-10, une cytokine de régulation, par les lymphocytes T, causant une réponse immunosuppressive (121). L'infection au VIH affecte aussi la capacité des mDC à activer les cellules NK par poly(IC), diminuant leur activité lytique (126). Notre équipe a trouvé que le mauvais fonctionnement des mDC causant une augmentation de la production de BAFF semble jouer un rôle dans la dérégulation des lymphocytes B (107).

2.4.2.2. Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les pDC, caractérisés par l'expression de CLEC4C et ILT7 (127) ont une fréquence réduite dans le sang des patients progressifs infectés au VIH. Ceux-ci semblent jouer un rôle dans le contrôle de la virémie, puisque chez les patients avec une plus haute fréquence de pDC produisant une grande quantité d'IFN α , un plus haut taux de lymphocytes T CD4⁺ est aussi observé (120). En fait, les patients contrôlant le virus ont des taux de pDC supérieurs aux individus non infectés par le VIH (128). De hauts niveaux de pDC et d'IFN α semblent avoir un effet bénéfique lors de la phase aiguë de l'infection au VIH, mais sont quand même associés à une activation immune chronique et à des effets délétères lors d'une infection chronique (129).

2.4.3. Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ sont les principales cibles du VIH et jouent un rôle indispensable dans la réponse immunitaire. Ils recrutent les neutrophiles, éosinophiles, et basophiles aux sites d'infections, ils augmentent l'activité microbicide des macrophages, aident les lymphocytes B à produire des anticorps, et potentialisent une cascade de réponses immunitaires grâce aux cytokines et chimiokines qu'ils produisent (130). Avec l'aide des DC, les lymphocytes T CD4⁺ sont aussi cruciaux dans la maturation des lymphocytes T CD8⁺ menant à leur activité lytique (131). C'est la perte de ces cellules qui détermine la progression clinique de l'infection au VIH, et qui mène ultimement au SIDA (132).

La polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un profil cytokinique présentant une certaine plasticité dépend des signaux reçus lors de leur première interaction avec un antigène. Les lymphocytes T CD4⁺ Th1 et Th2 furent les premiers découverts, chacun produisant différentes cytokines et ayant une fonction distincte. Les cellules présentatrices d'antigènes sécrètent de grandes quantités d'IL-12 puis l'IL-12 induit la production d'IFN γ par les cellules NK, menant au développement des cellules Th1. Ces cellules produisent de l'IFN γ et sont plutôt impliquées dans la réponse aux pathogènes intracellulaires tel le VIH. Les cellules Th2 résultent des cytokines IL-2 et IL-4, produisent de l'IL-4 et IL-13 et favorisent la réponse aux pathogènes extracellulaires. Les cellules Th2, par leur production d'IL-4, contrôlent la production d'IgE par les lymphocytes B. Plus tard, les sous-groupes Th17 et iTreg (*induced T-regulatory cell*) furent découverts. Les lymphocytes T CD4⁺ Th17, cellules abondantes dans les muqueuses, induites par TGF β (*transforming growth factor beta*), IL-21 et IL-23, jouent un rôle critique dans la réponse immunitaire contre les microbes, dont les bactéries extracellulaires et les champignons, et sécrètent de l'IL21, IL-22, et IL-17. Les lymphocytes Th17 CD4⁺ sécrètent aussi des chimiokines capables de recruter des neutrophiles et macrophages au site d'infection (133). Les cellules iTreg, capables de sécréter de l'IL-10 et TGF β , se développent à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs stimulés par TGF β et IL-10 en absence de cytokines pro-inflammatoires et s'occupent de la tolérance et de la régulation des réponses immunitaires (130). Il existe aussi des cellules nTreg qui sont sécrétées du thymus exprimant déjà FOXP3, comparativement aux

cellules iTreg qui n'expriment FOXP3 qu'après avoir été en contact avec un antigène dans les organes lymphoïdes périphériques (134). Les cellules *T follicular helper* (Tfh) sont vues en détail dans la section 3.6.2.4. En bref, les différentes lignées de lymphocytes T CD4⁺ fournissent de l'aide aux lymphocytes T CD8⁺, aux lymphocytes B, aux macrophages et aux DC via des molécules de contact, telle CD40L, et des cytokines, chaque sous-groupe ayant une combinaison qui leur est propre.

Le VIH infecte préférentiellement les cellules exprimant CCR5 comme corécepteur. Cette cellule peut ensuite infecter des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ mémoires (135). Le tractus intestinal, un site de réplication virale important, contient des Th17 exprimant fortement CCR5, les rendants vulnérables à l'infection. La perte subséquente de ces cellules affecte l'intégrité de la barrière mucoale ainsi que la réponse immunitaire innée et adaptative locale. L'infection de ces lymphocytes T CD4⁺ dans le GALT résulte donc en une augmentation de l'inflammation des tissus mucoaux, ainsi qu'en une perte de l'intégrité mucoale menant à une augmentation de la translocation microbienne. Le rôle de la translocation microbienne dans l'inflammation chronique est discuté plus en détail dans la section 2.4.6. (136).

2.4.4. *Lymphocytes T CD8⁺ (CTL)*

La réponse immunitaire dépend aussi des lymphocytes T CD8⁺, aussi nommés *cytotoxic T lymphocytes* (CTL), pour le contrôle de l'infection virale, où ces cellules protègent l'hôte de microorganismes étrangers grâce à leur activité lytique et non lytique (131). En fait, il a été démontré dans les années 1990 qu'une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD8⁺, indiquée par le marqueur d'activation CD38, signale la progression de l'infection au VIH (137). Lors d'une infection au VIH, les cellules CD8⁺ reconnaissent les cellules infectées par un processus dépendant de CMH-I pour ensuite lyser les cellules contenant le virus en libérant de la perforine et des granzymes, ou en engageant des *death inducing ligands*. Les lymphocytes T CD8⁺ sont aussi capables d'inhiber la fixation du virus à la cellule hôte ainsi que sa transcription en sécrétant des β -chimiokines et des facteurs antiviraux CD8⁺ (CAF). Les β -chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) inhibent la

réplication virale du VIH en se liant à leur récepteur apparenté, bloquant l'accès aux corécepteurs nécessaires à l'entrée du virion dans la cellule (131).

L'activité antivirale des cellules CD8⁺ mène à une pression sélective sur la mutation du virus, permettant son évasion de la réponse CD8 en diminuant l'expression de CMH-I à la surface de leur cellule hôte. Le VIH est capable de perturber la signalisation des cellules CD8⁺ en modifiant la production de cytokines et l'activation des récepteurs cellulaires, rendant ces dernières incapables de susciter une réponse immunitaire appropriée. Il y a éventuellement diminution du nombre de cellules CD8⁺ capables d'avoir une réaction antivirale (131). Les lymphocytes T CD8⁺ perdent leur efficacité, et vivent un épuisement.

2.4.5. Cellules NK

Les cellules NK jouent un rôle dans l'immunité antivirale et antitumorale en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en causant la lyse de cellules infectées. Elles interagissent aussi avec les lymphocytes T et les DC afin de définir la réponse immune adaptative. Par contre, les cellules NK ne possèdent pas de récepteur capable de détecter directement le VIH. Elles réagissent plutôt en réponse à des signaux inhibiteurs et activateurs émis par les cellules infectées. Elles attaquent les cellules ne possédant pas de molécules CMH-I à leur surface (molécules importantes pour les récepteurs inhibiteurs des cellules NK), ou surexprimant le ligand pour leurs récepteurs activateurs.

Un récepteur inhibiteur connu des cellules NK, hautement polymorphique et spécifique aux molécules CMH-I, est le *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR). Le récepteur CD94-NKG2A, lui, est non polymorphique et reconnaît plutôt des molécules CMH non classiques tel HLA-E. Il existe aussi plusieurs récepteurs activateurs tel NKG2D, CD16 et NCRs (natural cytotoxicity receptors). CD16, un récepteur Fc, permet le déclenchement d'ADCC lorsque lié à la zone Fc d'un anticorps du VIH par la sécrétion de cytokines et de médiateurs cytotoxiques tel perforine et granzyme-A menant à l'apoptose de la cellule cible (138).

Les cellules NK infectées par le VIH grâce à leur expression de CD4 et de CXCR4 démontrent de plus bas niveaux de perforine et de granzyme A, ce qui pourrait être la source de leur perte de cytotoxicité. Le VIH serait aussi capable de duper les cellules NK à l'aide de sa protéine Nef. Cette dernière est capable de diminuer l'expression de HLA-A et HLA-B dans les cellules infectées, permettant l'évasion du virus des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK. Nef peut aussi diminuer l'expression de ligands de NKG2D tel MICA, ULBP1 et ULBP2 chez les cellules infectées, portant atteinte à la fonction des cellules NK (126).

2.4.6. Activation immune liée au VIH

Comme l'humain, les macaques rhésus infectés au SIV souffrent d'une perte progressive des lymphocytes T CD4⁺ menant éventuellement au SIDA, et démontrent une susceptibilité accrue aux maladies opportunistes. Au contraire, l'hôte naturel du SIV, le Singe vert mangabey, maintient une haute charge virale et une réponse antivirale limitée des lymphocytes T CD8⁺ sans avancer au SIDA. Ce dernier présente aussi des niveaux d'activation immune et d'apoptose beaucoup plus bas que ceux observés lors d'une infection pathogénique au SIV ou au VIH. Ces informations suggèrent que la cause ultime de la progression au SIDA ne serait pas la perte des lymphocytes T CD4⁺, mais plutôt l'activation immune (139) ce qui fut confirmé par d'autres études (140).

Dès le début de l'infection au VIH, on observe de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires tels BAFF, *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) et IL-6 dans le plasma et les ganglions lymphatiques, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des β chimiokines pro-inflammatoires MIP-1a, MIP-1B et RANTES. Cette inflammation a plusieurs causes telle la stimulation antigénique des lymphocytes T par le virus, la translocation microbienne et les produits viraux tel Nef (137). Les gènes du VIH pourraient aussi induire l'activation des lymphocytes et des macrophages ainsi que la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. En effet, la gp120 en serait capable en se liant à CD4 ou à des co-récepteurs, même sans infection directe. (141) Les lymphocytes peuvent aussi être activés par Nef directement (142), ou par l'entremise de l'infection des macrophages (143).

La translocation microbienne, définie comme le passage de microbes ou de produits microbiens du système gastro-intestinal (GI) aux sites extra-intestinaux tels les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine, est aussi suggérée comme cause principale de l'activation du système immunitaire inné. La déplétion rapide des lymphocytes T CD4⁺ dans les tissus lymphoïdes lors des semaines suivant l'infection affecte principalement le système GI. Les dommages subis par les muqueuses du système GI et les microenvironnements épithéliaux des intestins influencent l'activation immune systémique lors de la phase chronique du VIH due à l'augmentation de translocation microbienne qui accompagne ces événements. En fait, un indicateur de translocation microbienne qui corrèle directement avec l'activation immunitaire, les lipopolysaccharides (LPS), se retrouve à hauts niveaux dans le plasma des individus infectés au VIH (144).

L'activation immune liée au VIH entraîne une augmentation de sénescence et d'apoptose cellulaire. Afin de maintenir l'homéostasie, le système immunitaire doit produire de nouvelles cellules plus rapidement. Lorsque l'inflammation persiste, il peut y avoir diminution progressive de la capacité régénératrice du système immunitaire et immunosénescence. En même temps, plusieurs fonctions physiologiques sont aussi affectées due à la production élevée de cytokines pro-inflammatoires. Ces failles du système immunitaire sont accompagnées d'une perte de lymphocytes T naïfs et d'une population oligoclonale croissante hautement différenciée de lymphocytes T CD8⁺. Une réplication incontrôlable du virus s'ensuit, menant à la déplétion des dernières populations de lymphocytes T CD4⁺ puis à l'inefficacité du système immunitaire à combattre les pathogènes, phase nommée SIDA. Quant à l'expansion oligoclonale, celle-ci est reflétée par plusieurs changements, dont une diminution de sécrétion d'IL-2, une dérégulation de l'hématopoïèse, une activation immune et une inflammation systémique (137).

3. Lymphocytes B

3.1. Différenciation des lymphocytes B

3.1.1. Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

Chez tous les mammifères, les lymphocytes B se développent à partir du progéniteur lymphoïde commun de cellules souches hématopoïétique dans la moelle

osseuse. La phase de développement des lymphocytes B dépendante de la moelle osseuse est le résultat du processus de réarrangement fonctionnel des segments de gènes d'immunoglobulines (145). Il existe 5 classes d'immunoglobulines selon la région C-terminale de la chaîne lourde (Fc) dont IgM, IgD, IgG, IgA et IgE (146). IgM est codé par le gène μ tandis que les autres Ig font leur apparition plus tard via la permutation de classe. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H) avec un domaine variable et 3-4 domaines constants, et de deux chaînes légères (L), codées par les gènes λ et κ , avec un domaine constant et un domaine variable. Les copies des chaînes H et L sont les mêmes chez un anticorps (147). Les différentes combinaisons possibles des domaines variables de la chaîne H et L créent un répertoire de lymphocytes B exprimant des anticorps capables de reconnaître plus de 5×10^{13} antigènes (148).

3 stades développementaux sont définis par le réarrangement des segments de gènes des deux chaînes (148). Dans le premier stade, nommé pro-B, il y a réarrangement des segments D et J de la chaîne H par les cellules pro-B, suivi par un 2^e réarrangement qui lie la région V au segment DJ (148). Le 2^e stade, nommé stade pré-B, commence après le réarrangement fonctionnel du segment de gène μ de la chaîne H. Les lymphocytes pré-B se divisent 1-2 fois et réorganisent les segments de gène κ et λ codant pour la chaîne L. (149) Plus de 75% des lymphocytes B immatures sont autoréactifs et doivent donc être éliminés à divers points de contrôle dans la moelle osseuse et la rate lors de leur développement afin d'éviter une auto-immunité et d'atteindre l'autotolérance (146). La différenciation des cellules pro-B en pré-B s'accompagne d'une première vérification (150). Le complexe du pré-BCR est formé par deux substituts de chaîne L (composée de λ -like et de V-preB) et deux chaînes H liées aux molécules de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Le pré-BCR s'occupe d'interrompre l'activité et l'expression de la machinerie enzymatique qui catalyse le réarrangement des segments de gène de la chaîne H. Ce processus, appelé exclusion allélique, empêche l'expression de 2 chaînes H avec différentes spécificités par la même cellule. Le *pré-B cell receptor* (BCR) s'occupe aussi de provoquer le réarrangement des gènes de la chaîne L (148).

Ensuite, une autre sélection est faite via le BCR dans la moelle osseuse par un processus nommé tolérance centrale, un processus qui mène à l'élimination de 20 à 50% des cellules autoréactives. La reconnaissance d'auto-antigènes ainsi que la réactivité du BCR déterminent si les cellules B continuent de se différencier. Les cellules B immatures recevant des signaux toniques du BCR se différencient en cellules B transitoires tandis que celles ne recevant aucun signal via le BCR ou recevant un signal trop fort subissent une apoptose (146). Le lymphocyte B immature est ensuite généré au 3^e stade développemental lorsqu'une molécule IgM est formée et exprimée à sa surface. Les lymphocytes B immatures se transforment en lymphocytes B transitoires capables de quitter la moelle osseuse et de se diriger vers la rate où ils complètent leur développement et deviennent des lymphocytes B folliculaires ou de la zone marginale (MZ) (148). La différenciation des lymphocytes B est illustrée à la figure 3.

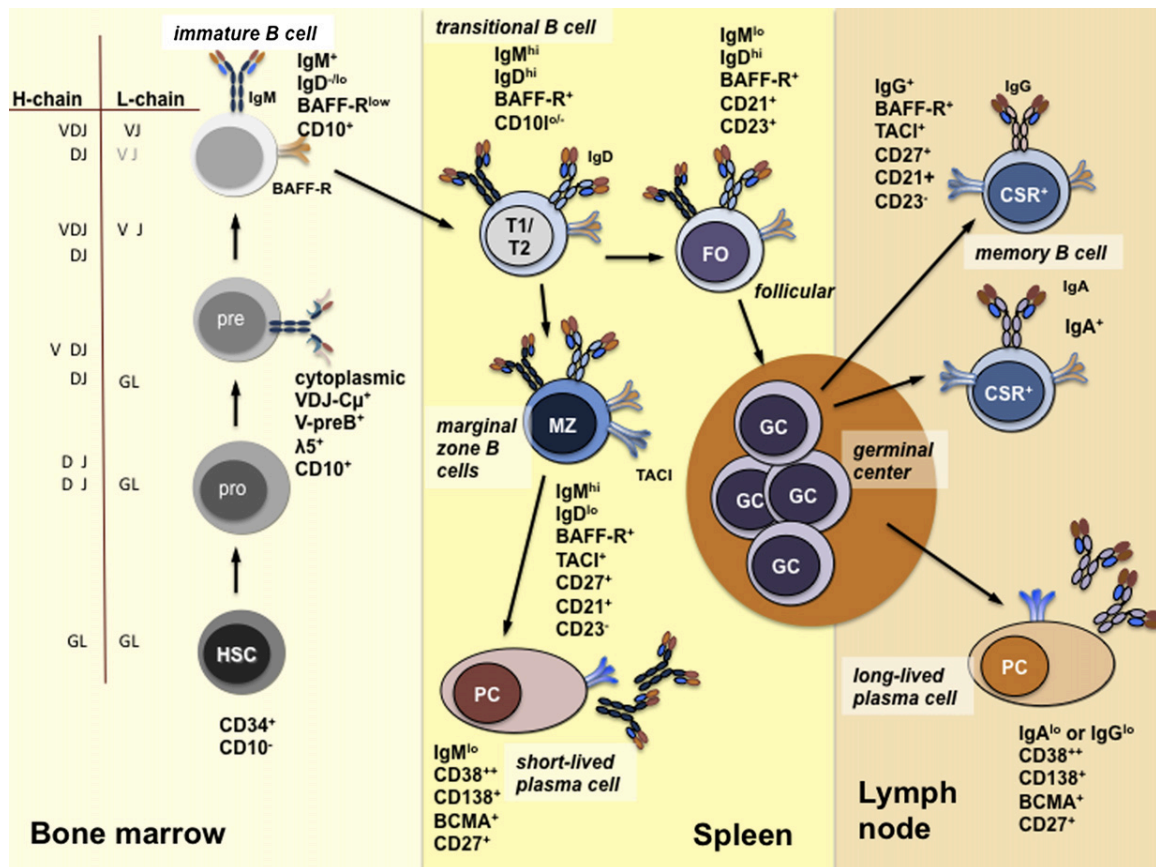


Figure 3. Différenciation des lymphocytes B (148). Les cellules B se développent dans la moelle osseuse à partir de cellules hématopoïétiques précurseurs (HSC). Le réarrangement des segments D et J de la chaîne H dépendant du *recombination-activating gene* (RAG)

commence au stade pro-B. Ensuite, le réarrangement du segment V commence au début du stade pré-B. Chez les cellules pré-B CD10⁺CD19⁺, les chaînes H se lient à des molécules formant le pré-BCR exprimé à l'intérieur de la cellule, donc non détectable à la surface. Les signaux induits par le pré-BCR bloquent l'expression de RAG menant à la prolifération. Les gènes de RAG sont réactivés afin d'initier le réarrangement des segments de la chaîne L menant à la formation d'IgM. Les cellules B immatures entrent dans la rate sous forme de cellule B transitionnelle, reçoivent des signaux de survie via BAFF-R, et se développent en cellule B de la zone marginale ou en cellule folliculaire, dépendamment de la spécificité de leur BCR. Les cellules B de la zone marginale qui entrent en contact avec un antigène se transforment en cellules plasmiques à courte durée. Les cellules folliculaires sont activées par les antigènes et se transforment en cellule B mémoire (CSR⁺) ou en cellule plasmique (PC) dans le centre germinatif.

3.1.2. Maturation dans les organes lymphoïdes secondaires

Les cellules immatures quittant la moelle osseuse se dirigent, via la circulation sanguine, vers la rate, où elles se différencient en cellules B transitaires T1 et T2 qui deviendront des cellules B MZ ou folliculaire selon plusieurs facteurs dont les signaux du BCR, BAFF, et l'expression de facteurs de transcription tels *neurogenic locus notch homolog protein 2* (NOTCH2) et *Bruton tyrosine kinase* (BTK) (151; 152; 153). Les cellules immatures se dirigent aussi, en moins grande quantité, vers les ganglions lymphatiques, les amygdales, et les plaques de Peyer, où cette population hétérogène de cellules B peut être retrouvée à différents stades de maturation (146).

Après l'élimination des cellules autoréactives dans la moelle osseuse, les cellules B restantes ayant une autoréactivité sont éliminées par un autre processus de sélection ayant lieu dans la rate où celles recevant de forts signaux via leur BCR sont ciblées pour apoptose ou deviennent anergiques, leur longévité étant réduite à 1 à 5 jours (154). Ce processus de sélection peut être dupé par de hauts niveaux de BAFF et par l'intervention de cellules T, ce qui résulte en la présence de cellules B autoréactives parmi la population de cellules B matures (155). Ces cellules B autoréactives peuvent toutefois être contrôlées par des cellules régulatrices dont les cellules T régulatrices (Tregs) et les cellules B régulatrices

(Bregs) et éliminées tardivement par des cellules T CD4⁺ via des interactions Fas receptor-Fas ligand et CD40-CD40L (156; 157). Plusieurs maladies auto-immunes sont fondées sur l'échec d'une de ces vérifications d'autotolérance tel le lupus érythémateux systémique (SLE) où un signal défectif du BCR dû à une mutation de BTK ou un polymorphisme de *protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22* (PTPN22) brise la tolérance centrale (155; 158). Comme expliqué plus haut, de hauts niveaux de BAFF sont aussi un mécanisme menant au bris de l'autotolérance en augmentant la survie des cellules autoréactives.

Plusieurs autres molécules contribuent à la maturation des cellules B dont des intégrines adhésives, des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines, tel Fms-like tyrosine kinase 3, thrombopoïétin, CXCL12 et IL-7, provenant des cellules stromales de la moelle osseuse (159).

3.2. Différentes populations de lymphocytes B

Il existe 3 classes principales de lymphocytes B chez l'humain et la souris, dont les lymphocytes B B1 et les lymphocytes B B2 qui incluent les cellules B MZ et folliculaires. Les lymphocytes B1, une population mieux définie chez la souris et encore controversée chez l'humain, proviennent de cellules du foie fœtal et font preuve d'autorenouvellement avec peu d'intervention de la moelle osseuse chez l'adulte (146). Les lymphocytes B B2, eux, proviennent des cellules T2 des follicules de la rate et continuent à être gérées par la moelle osseuse à l'âge adulte (146). La survie des cellules B T2 ainsi que leur différenciation en cellules B MZ ou folliculaires dépend de signaux provenant du BCR et de BAFF qui, une fois lié au *BAFF-receptor* (BAFF-R), active une voie alternative dépendante de NF-κB. Le rôle de BAFF dans la différenciation et la survie des cellules B est discuté en détail dans la section 5 (151).

3.2.1. Lymphocytes B B1

Les lymphocytes B B1, retrouvés dans les cavités pleurales et péritonéales chez la souris, produisent des anticorps IgM polyréactifs et poly-spécifiques qui s'attaquent à des antigènes T-indépendants et jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des tissus en se liant aux auto-antigènes exprimés par les cellules apoptotiques. Ces cellules

sont T-indépendantes puisqu'elles ne requièrent pas l'assistance de cellules Th afin de produire des anticorps, et la polyréactivité et polyspécificité de ces anticorps leur permet de lier des auto-antigènes ainsi que des antigènes microbiens. Les cellules B B1 produisent aussi des anticorps IgA polyreactifs contribuant à l'immunité mucoale, comme les IgA produits par les lymphocytes B folliculaires (146). Comme mentionné plus tôt, l'existence de cette population chez l'humain est l'objet de controverse, mais certaines études suggèrent qu'une population de cellules B exprimant CD5 chez la souris pourrait représenter l'équivalent des cellules B B1 chez l'humain (160; 161; 162). Chez la souris, 2 sous-populations peuvent être différenciées par leur expression de CD5 ; les cellules B B1 CD5⁺ (B1a) et les cellules B B1 CD5⁻ (B1b). Les cellules B1a s'occupent plutôt de la production d'IgM « naturels » polyréactifs tandis que les cellules B1b produisent des IgM « mémoires » non classiques (ne passent pas par le centre germinatif) T-indépendants de longue vie en réponse à certains pathogènes (162).

3.2.2. Lymphocytes B folliculaire

Les lymphocytes B folliculaires font partie du système immunitaire adaptatif et se retrouvent principalement dans les zones folliculaires de la rate et des ganglions lymphatiques où elles s'accumulent chez l'humain dans les centres germinatifs et le manteau folliculaire (163). Le centre germinatif fait l'objet de la section 3.3.1. où son fonctionnement est discuté en détail. Le rôle principal des cellules folliculaires, qui possèdent principalement un BCR monoréactif (164), est la production d'anticorps IgG ou IgA de longue durée et de haute affinité importants dans la réponse immune adaptative avec l'aide des lymphocytes T, et la production de lymphocytes B mémoires, mais elles sont aussi impliquées dans la réponse T-indépendante. Puisque la réponse des cellules folliculaires aux anticorps prend environ 7 jours, les cellules de première ligne B B1 et MZ s'occupent de la réponse immune initiale dans les 3 jours suivant l'infection (146).

3.2.3. Lymphocytes B de la zone marginale

Vues en détail dans la section 4.

3.2.4. Sélection des lymphocytes B folliculaires et de la zone marginale

Des signaux médiés par le BCR induisent une voie de signalisation dépendante de BTK menant à la différenciation de cellules B T2 de la rate en cellules B folliculaires. En fait, des signaux importants provenant du BTK pourraient bloquer la différenciation des cellules B T2 en cellules B MZ en inhibant les signaux de NOTCH2 (151). Au contraire, dans la zone marginale, une faible réactivité du BCR et un signal insuffisant provenant de BTK permettent la différenciation des cellules B T2 en cellules B MZ-précurseurs sensibles aux signaux de NOTCH2 (151). L'induction du facteur de transcription NOTCH2 et l'activation de son ligand *delta-like 1* (DLL1) sur les cellules endothéliales chez les lymphocytes B transitionnels mènent au développement de lymphocytes B de la zone marginale chez le rongeur et l'humain (165). Des signaux provenant de TLRs pourraient aussi contribuer au développement des cellules B MZ chez l'humain, mais le mécanisme reste encore à être élucidé (166).

3.3. Réponse T-dépendante

Le BCR permet la régulation de la maturation des lymphocytes B. Lorsqu'un lymphocyte B naïf interagit avec un antigène T-dépendant causant la réticulation du BCR, il y a signalisation à l'intérieur de la cellule afin de déclencher l'expression de gènes cibles, et il y a intériorisation de l'antigène qui est livré aux endosomes et dégradé en peptides. Ces peptides sont liés à des molécules CMH-II et recyclés à la surface des lymphocytes B. Le complexe peptide-CMH-II est reconnu par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques aux antigènes, activant leur *T cell receptor* (TCR). Cette interaction a lieu à la jonction des zones B et T. Plus précisément, CXCL13 produit par les DC folliculaires aide à la rétention des cellules B naïves exprimant CXCR5 dans les follicules lymphatiques primaires (167). Après avoir été exposées à un antigène via les DC ou sous forme soluble, les cellules B naïves augmentent leur expression de CCR7 afin de migrer à la frontière du follicule vers la zone T. C'est à la jonction B :T que le CD40 de la cellule B naïve se lie au CD40L du lymphocyte Tfh activé ; les cellules T au repos n'expriment pas CD40L, mais acquièrent plutôt la capacité de l'exprimer après avoir interagi avec un antigène (168; 169; 170). Il a aussi été démontré qu'un premier signal via le BCR donne aux cellules B la permissivité de recevoir un signal via CD40, ainsi que la capacité de migrer et de faire de la présentation antigénique (171). Ce contact apparenté T-B prend place dans les tissus lymphoïdes

secondaires (146) et est nécessaire à l'activation des cellules B (172). Les cellules T exprimant CD40L sont productrices de cytokines assistant la prolifération et la différenciation des cellules B tel IL-4, IL-21, et IFN γ (146) et émettent plusieurs signaux aux cellules B menant à la sécrétion d'anticorps, à la CSR et au secours de l'apoptose (173). Les cellules B activées, elles, peuvent soit suivre une voie folliculaire ou extrafolliculaire. Dans la voie extrafolliculaire, les cellules B activées se différencient en plasmablastes extrafolliculaires dans le sinus marginal et dans la pulpe rouge (174) tandis que dans la voie folliculaire, les cellules B activées qui expriment fortement *B-cell lymphoma 6* (Bcl6) retournent au follicule et y sont retenues par une forte expression de *sphingosine-1-phosphate receptor 2* (S1P2). La voie folliculaire mène à la formation de centres germinatifs qui dépendent aussi des liaisons CD40-CD40L pour leur formation et qui contiennent des cellules Tfh qui encouragent la CSR et la maturation de l'affinité des sites de liaison aux antigènes des immunoglobulines (169; 174).

3.3.1. Le centre germinatif

Les centres germinatifs représentent un microenvironnement spécialisé à l'intérieur de follicules des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules B qu'elles contiennent subissent de la prolifération, des hypermutations somatiques (SHM), et une sélection selon leur affinité aux antigènes qui leur sont présentés (175; 176; 177). Le jeune centre germinatif mène à la production de plasmablastes de courte durée et à de cellules B mémoires commutées ou non, tandis que le centre germinatif mature produit des cellules plasmatisques de longue durée où la majorité ont eu une CSR et une SHM (174). Lorsqu'observés par microscopie, les centres germinatifs ont 2 zones distinctes, dont la zone sombre et la zone claire (figure 4). La zone sombre contient de grosses cellules lymphoïdes, nommées centroblastes, étroitement organisées tandis que la zone claire contient de plus petites cellules lymphoïdes, nommées centrocytes, plus espacées et un réseau dense de DC folliculaires (177). Les centroblastes de la zone sombre se différencient constamment en centrocytes, qui migrent par la suite vers la zone claire. Les centrocytes ayant la plus forte réponse de leur BCR face à l'antigène présenté par le FDC se différencient en cellules mémoires, tandis que les autres retournent à la zone sombre, où elles subissent des SHM avant de retourner à la zone claire, la sélection étant dépendante

des FDC ainsi que des Tfh. Les cellules ayant cyclées le plus souvent entre la zone claire et la zone sombre, et donc ayant moins d'affinité pour les antigènes présentés, deviennent éventuellement des plasmablastes puis quittent le centre germinatif. Les cellules des centres germinatifs ont une inclination naturelle pour l'apoptose pouvant être prévenue par des signaux ou cytokines provenant de cellules environnantes (175). Cette propension pour l'apoptose secourue par différents signaux dont la stimulation antigénique serait un mécanisme de sélection de base de cellules B des centres germinatifs (178). Seules les cellules capables de produire des anticorps d'une haute affinité pour les antigènes seraient sauvées de l'apoptose. Des mécanismes peu connus mènent à la production de plasmablastes et de lymphocytes B mémoires de longue durée (177).

3.4. Réponse T-indépendante

Contrairement aux antigènes T-dépendants, les antigènes T-indépendants (TI) ne requièrent pas l'intervention de cellules T afin de provoquer une réponse chez les cellules B. Les antigènes TI, normalement des polysaccharides, se séparent en deux catégories dont les antigènes TI-1 comme les LPS et TI-2 qui consistent en de structures répétitives comme les polysaccharides de la capsule de bactéries liant plusieurs BCR polyspécifiques. Les antigènes TI-1 induisent la mitose des cellules B en entraînant une activation polyclonale non spécifique, et ne requièrent pas l'implication des cellules T_h. Les antigènes TI-2, eux, n'ont pas d'effet mitogène, mais activent les cellules B matures en causant la réticulation des immunoglobulines à leur surface, menant à la production d'anticorps spécifiques à l'antigène. Certaines populations répondent mal aux antigènes TI-2 dont les gens atteints du VIH, les enfants de moins de 2 ans, les adultes de plus de 65 ans, et les gens avec une BTK non fonctionnelle (179); (180). Au contraire, les enfants et les gens déficients en BTK répondent normalement aux antigènes TI-1 (181). Les cellules B ayant été activées par la réticulation d'un minimum de 10 à 20 récepteurs multivalents d'immunoglobulines (182) causée par un antigène TI-2, il y a enchainement d'une cascade de signalisation cytoplasmique où BTK, qui dépend de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pour son activation, est l'acteur principal (183). Le BTK activé co-localise avec le complexe réticulé du récepteur de la cellule B (184) ce qui mène à la prolifération de celle-ci. Plusieurs études suggèrent qu'un 2^e signal stimulant est nécessaire afin de mener à la production d'anticorps

(185). Ces signaux pourraient provenir des TLRs, du pathogène, des cellules B MZ due à leur capture rapide des antigènes et du système du complément. Certaines cytokines produites par des lymphocytes T, des cellules NK, des DC et des macrophages contribuent aussi à la sécrétion d'immunoglobulines, les plus importantes étant IL-2, IL-3, IFN γ et *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). L'important rôle de BAFF dans la CSR T-indépendante via *transmembrane activator, calcium modulator and cytochophilin ligand interactor* (TACI) est élaboré dans la section « Récepteurs de BAFF » (186).

3.5. Fonctions des lymphocytes B

3.5.1. Fonctions effectrices des anticorps

Comme mentionné à la section 3.1.1., les immunoglobulines sont divisées en 5 classes selon la région C-terminale de leur chaîne lourde (Fc) : IgM, IgD, IgG, IgA et IgE.

Lorsque sécrété, IgM peut être sous forme pentamérique ou, moins souvent, sous forme hexamérique. Cet isotype est le premier exprimé lors de l'ontogenèse des cellules B, permettant une réponse de première ligne, et est l'origine de toutes les autres immunoglobulines sauf IgD. Les IgM réticulés par leur antigène apparenté en surface des cellules B servent de récepteurs d'antigènes. La fonction principale de cet isotype est la phagocytose via l'opsonisation et la cytolysse du pathogène (187).

La structure d'IgD semble avoir été conservée pendant l'évolution afin d'assister aux fonctions d'IgM (188). Il a été découvert récemment qu'IgD est capable de se lier aux basophiles, monocytes, et neutrophiles circulants, ainsi qu'aux mastocytes des muqueuses (188). De plus, la réticulation d'IgD par un récepteur de flux de calcium encourage les basophiles à sécréter des cytokines menant à l'activation des cellules B tel IL-4, IL-13 et BAFF, menant à une augmentation de production d'IgM, d'IgG et d'IgA (189).

IgG, mesuré à 994 mg/dL chez l'adulte (190), abondant dans le sang et capable de traverser le placenta, possède deux classes générales de récepteurs, dont les activateurs (Fc γ Rs) et les inhibiteurs *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM-

containing). Lorsqu'un récepteur IgG activateur est engagé, celui-ci peut causer la phagocytose du pathogène où il y a opsonisation et destruction du pathogène à l'intérieur du phagosome, à l'ADCC et à la sécrétion de cytokines. Cette immunoglobuline participe donc à la réponse immune humorale mémoire par le combat de pathogènes, la neutralisation de toxines et la lyse médiée par l'activation de la voie classique du complément (187). Chez l'humain des sous-classes d'IgG à haute affinité, dont IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, peuvent aussi être produites par une CSR dépendante des cellules Th (187).

Chez l'humain, IgA est l'isotype le plus abondant et est constitué de 2 sous-classes très similaires, IgA1 et IgA2, le résultat de duplication génique (187; 191). Cet isotype se retrouve sous forme de monomère dans le sérum, mais des formes polymériques peuvent aussi être présentes à basse fréquence (187). Il se retrouve principalement dans les muqueuses sous forme sécrétoire et avec l'aide du mucus et de peptides antimicrobiens, bloque l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales sans déclencher une cascade inflammatoire (192). Plus précisément, IgA1 se retrouve plutôt dans les voies respiratoires et intestinales supérieures, tandis que IgA2 domine dans les sécrétions, l'iléon inférieur et le gros intestin (187). La forme sécrétoire d'IgA est la forme dominante aux surfaces des muqueuses, et est composée d'un dimère d'IgA, d'une chaîne polypeptidique et d'une composante sécrétoire. Le complexe dimère IgA-chaîne polypeptidique est produit par les lymphocytes B des couches sous-muqueuses, et la composante sécrétoire est produite par les cellules épithéliales mucosales. Quelques mécanismes permettent à l'IgA de réaliser sa fonction dont l'induction de l'agglutination bactérienne et la dissimulation des protéines bactériennes impliquées dans la fixation épithéliale de la bactérie (193).

Finalement, IgE, l'isotype le moins abondant du corps humain, s'occupe principalement de la réponse allergique et du contrôle de relations entre l'hôte et un parasite, permettant aux éosinophiles de reconnaître le pathogène opsonisé, menant à sa mort (194).

3.5.2. Cellules B régulatrices « Breg »

Les cellules Bregs, exprimant de hauts niveaux de CD1d chez l'humain et la souris (195), ne représentent qu'environ 1% de tous les lymphocytes B, mais on les retrouve dans toutes les sous-populations majeures des cellules B dont les lymphocytes B folliculaires et MZ. Un phénotype propre aux Bregs n'ayant pas encore été identifié, les chercheurs utilisent soit le phénotype CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi} ou CD19⁺CD21⁺CD23⁺ pour les cibler chez les souris (196; 197). L'équipe de Mauri, eux, utilise en fait le phénotype des lymphocytes B de la zone marginale CD19⁺CD21^{hi}CD23^{lo}CD24^{hi}IgM^{hi}IgD^{lo} afin de cibler les Breg chez la souris (198). Chez l'humain, les phénotypes régulièrement rapportés sont CD19⁺CD24⁺CD38⁺ (199) et CD19⁺CD24⁺CD27⁺ (200). Elles sont caractérisées notamment par leur production d'IL-10 et de TGF- β , où l'expression d'IL-10 leur permet d'avoir une régulation négative sur le système immunitaire adaptatif et inné (200; 201), et fonctionnent par un mécanisme immunorégulateur spécifique ou non à l'antigène (202). À l'aide d'IL-10 et d'IL-35, les Bregs peuvent moduler les cellules innées tels les DC, les cellules NK ou les macrophages, ils peuvent diminuer la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires dont IL-22, IL-17 et IFN- γ par les cellules T CD4⁺ (199), et augmenter la fréquence de lymphocytes Tregs. L'équipe de Mauri démontre aussi que la suppression de l'arthrite médiée par les Bregs est accompagnée d'une augmentation des fréquences de Treg et d'une diminution des fréquences de Th1 et Th17 dépendantes d'IL-10. IL-10 est aussi capable d'augmenter la fréquence de cellules Tregs *forkhead box P3* (FOXP3)⁺ (203). Le développement des Bregs et la production d'IL-10 semblent dépendre de la signalisation de BAFF par TACI, indiquant que ce sous-groupe de cellules B doit être considéré lors de l'utilisation d'une thérapie modulant BAFF. Le lien entre IL-10, CD39 et CD73 est abordé plus tard dans ce projet.

Lors de l'infection au VIH, les Breg semblent augmenter en fréquence et contribuer à la dysfonction immune par leur surproduction d'IL-10 et de PD-L1 causant une atteinte des lymphocytes T dont les CTLs (204). Dans ce contexte, les Bregs ont un effet de suppression de la réponse immune qui est associée à la prévalence systémique des ligands de TLR et de CD40, menant au maintien de la charge virale (202). Notre équipe suspecte que la source de l'augmentation de fréquence des Bregs serait les cellules B MZ-like, une population potentiellement plus susceptible d'acquérir ce phénotype, afin de contrôler

l'activation et la dérégulation chronique des cellules B associées au VIH (204). Un article récemment publié par notre groupe suggère qu'un potentiel Breg existerait chez une sous population ou un stage de différenciation des précurseurs de cellules B MZ-like, celles exprimant NR4A et CD83. Cette population exprime aussi fortement CD39 et CD73, marqueurs associés aux Bregs (201). Finalement, normalement un marqueur des Bregs chez les patients sains ou ayant autres maladies, CD1d n'est toutefois pas un marqueur des Bregs chez les individus infectés au VIH (205).

3.5.2.1. Adénosine

L'adénosine (ADO) est un nucléoside clé dans les réponses pathophysiologiques (206). À l'aide de ses récepteurs (ADOR), ADO est capable de transmettre de variables signaux à plusieurs cascades et systèmes biologiques dont le système immunitaire (207; 208). Aux sites inflammatoires, son rôle est mis en lumière lorsque 2 enzymes purinergiques, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) et ecto-5'-nucleotidase (CD73), hydrolysent un excès d'ATP exogène en ADO (figure 4) (209). CD39 catalyse l'ATP, molécule pro-inflammatoire, en ADP et AMP et CD73 catalyse l'AMP en adénosine, molécule anti-inflammatoire (210; 211). L'ATP et l'AMP extracellulaires proviennent de cellules mortes et mourantes dans le contexte d'une réponse inflammatoire, et peuvent être sécrétés par des bactéries commensales (212; 213). Les ectoenzymes CD39 et CD73 sont exprimées par plusieurs cellules, dont une sous-population de Bregs avec un phénotype CD39^{hi} (214). Des études démontrent aussi l'expression de CD73 par des cellules de la rate (215), des cellules B mémoires (216) et des cellules B B1 (213). Après avoir été sécrété, ADO se lie à un de ses récepteurs (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) exprimés par ses cellules cibles telles les cellules immunes qui expriment des ADOR impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (217). Il a été découvert que l'activation des récepteurs A_{2A} exprimés par les lymphocytes T par ADO mène à des signaux immunosuppresseurs (218; 219), et des études suggèrent que l'ADO produite par les Bregs CD39^{hi} serait responsable de la régulation négative de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (214). Lorsque l'ADO provenant des Bregs CD39^{hi} se lie aux récepteurs A_{2A} des lymphocytes T_h CD4⁺, il y a augmentation des niveaux de cAMP menant à une perte des fonctions effectrices, un mécanisme utilisé par les cellules T_h ainsi que les cellules Tregs (220). Une population de cellules B B1 CD73^{hi}

qui co-exprime CD39 peut aussi être considérée comme une sous-population de Bregs. Indépendamment d'IL-10, ces cellules suppriment l'inflammation associée à la colite *in vivo* par leur production d'ADO (213).

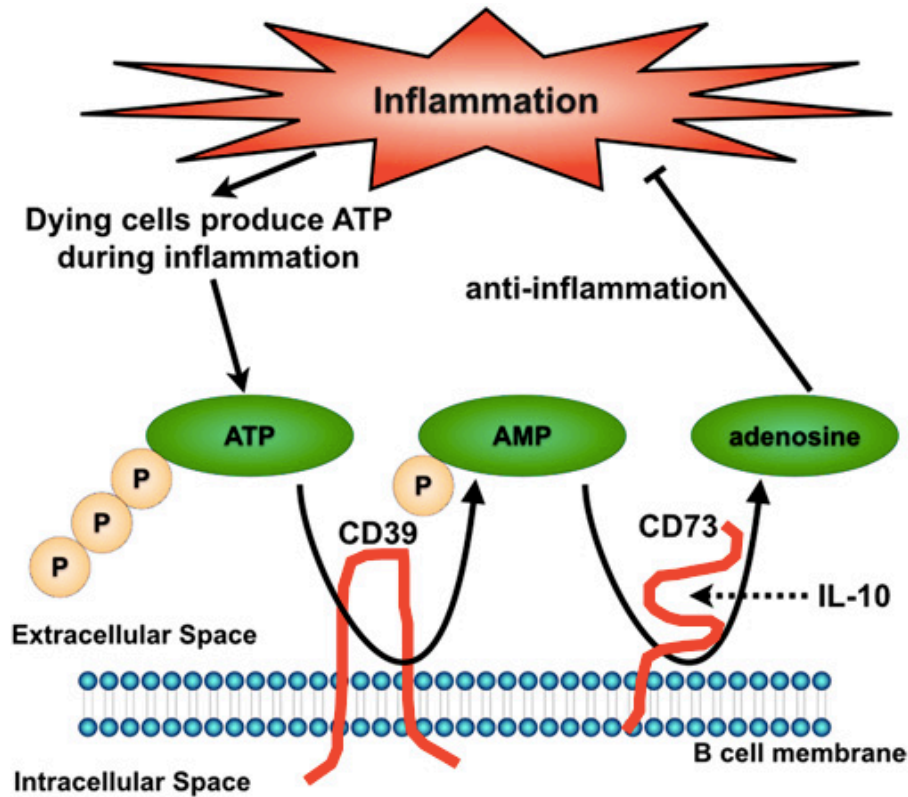


Figure 4. Rôle de CD39, de CD73 et de l'adénosine dans la modulation de l'inflammation (213). Modèle de médiation d'inflammation chez les cellules B par CD73 et l'adénosine. Dans les zones d'inflammation, les cellules mortes ou mourantes relâchent de l'ATP. L'ATP est convertit est AMP par CD39 puis en adénosine par CD73. L'adénosine extracellulaire peut ensuite moduler l'inflammation pour maintenir une homéostasie.

Dans un autre ordre d'idée, l'angiogenèse, composante essentielle de la guérison des tissus due à l'augmentation du transport d'oxygène, de nutriments et de cellules inflammatoires, peut être médiée par l'adénosine. Lorsqu'activée par son récepteur A_{2A} , il y a augmentation de sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et diminution de la protéine angiostatique matricellulaire thrombospondine 1 (TSP-1), ainsi que migration et prolifération de cellules endothéliales (221; 222).

Dans le contexte du VIH, une diminution de la fréquence de cellules B exprimant CD73 est observée chez les patients en phase chronique non traités comparativement aux contrôles sains. Cette diminution est associée à une activation des cellules B, à une réduction de la consommation d'AMP, à une perturbation du mécanisme de commutation de classe des Ig et à une légère augmentation de l'expression de CD39 (223). Les gens atteints du VIH démontrent également une corrélation entre de bas niveaux de cellules T CD4⁺, une augmentation de l'activation des cellules B et une diminution de la fréquence de cellules B co-exprimant CD39 et CD73. La diminution d'expression de CD73 par les cellules B corrèle aussi avec une augmentation d'expression de marqueurs de prolifération et d'épuisement tel Ki-67 et PD-1 (224; 225). CD73 pourrait être largué de façon soluble menant à une augmentation de ces niveaux dans le sérum. L'ADO se voit réduite en conséquence à la diminution de l'expression de CD73 menant à une activation immune chronique, phénomène observé chez les cellules B de patients infectés au VIH non traité (223; 226). Finalement, CD73 agit aussi comme un marqueur de migration et est impliqué dans l'adhésion des cellules B aux DC folliculaires du centre germinatif (227). Ces corrélations observées chez les patients non-traités virémiques ne sont pas observées chez les contrôles sains ou chez les contrôleurs élites. Il a été démontré que la restauration de l'expression de CD73 est possible après traitement ART (228).

3.5.2.2. *La sous-famille NR4A*

Il a été établi que plusieurs cytokines et facteurs de croissance jouent un rôle crucial dans l'inflammation chronique (229; 230). Certaines composantes restent à être élucidées, comme les facteurs de transcriptions en aval de ces signaux inflammatoires et leurs protéines co-régulatrices.

La superfamille des récepteurs nucléaires (NR) contient des facteurs de transcriptions modulant des cascades immunes et métaboliques. Un sous-groupe des NR, les récepteurs nucléaires orphelins (ONRs), n'a pas de ligand naturel identifié à date (231; 232). Comme les NRs, les ONRs modulent la transcription des gènes par des mécanismes activateurs ou inhibiteurs et sont susceptibles aux cascades de signalisation de cellules environnantes. Il existe des coactivateurs et co-suppresseurs capables de renforcer les

modulations transcriptionnelles des ONRs lors de leur association avec ceux-ci aux sites promoteurs de l'ADN, menant à l'activation ou à la répression du gène cible (233).

La famille de récepteurs nucléaires 4 sous-groupes A (NR4A) est une sous-famille des ONRs, et contient 3 membres dont NR4A1/NUR77, NR4A2/NURR1 et NR4A3/NOR1 (234). Faisant partie des ONRs, les NR4As modulent la transcription des gènes lorsqu'ils se lient aux sites promoteurs de l'ADN sous forme monomérique, homodimérique ou hétérodimérique (235). Elles se lient à l'ADN à l'aide de leur région centrale « domaine de liaison du ligand » (LBD) qui est plutôt conservée chez les 3 NR4As et qui reconnaît une séquence d'ADN conservée 'AAAGGTCA' (236). Les NR4As influencent une panoplie de gènes impliqués dans le contrôle de plusieurs processus biologiques affectant la survie cellulaire, la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, et la migration (237). De nombreux signaux apoptotiques, hormonaux et de croissance peuvent induire l'expression des NR4As (238), ce qui explique leur implication dans le cancer de la prostate, du sein, du poumon et du côlon (235). Leur délétion mène à la leucémie aiguë myéloblastique (LMA) chez les souris NR4A *knock-out* (KO) et une diminution d'expression des NR4As est observée chez les patients atteints de LMA (239). Plusieurs études démontrent que ces molécules pourraient être la cible de traitements contre le cancer, les maladies auto-immunes, la dyslipidémie, l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires (237; 240; 241; 242; 243).

Les NR4As semblent avoir un effet sur le fonctionnement des cytokines et des facteurs de croissance en régulant la réponse inflammatoire accompagnant plusieurs maladies, et se distinguent des autres NRs par leur capacité de réguler des gènes indépendamment du LBD (234; 244). En effet, il y a augmentation de l'expression des NR4As chez les cellules activées, ce qui suggère un rôle de ces récepteurs comme arbitres de la transcription de signaux inflammatoires (245; 246; 247; 248). Dans le cytoplasme, les activités mitochondriales qui activent l'apoptose sont régulées directement ou indirectement par les NR4As (235). Par contre, les fonctions des NR4As ainsi que les gènes qu'ils ciblent semblent dépendent des tissus et du contexte inflammatoire.

Il est possible de moduler l'activité de NR4A avec l'agent antinéoplasique 6-mercaptopurine (6-MP) (249). NR4A2 peut aussi être modulé *in vitro* et *in vivo* par methotrexate (MTX) et dexaméthasone, utilisés dans le traitement de maladies articulaires et de la peau (246; 250). De plus, le déhydroergotamine (DHE) est un ergot alcaloïde qui réactive l'expression des NR4As par le recrutement du *super elongation complex* (SEC) qui active le promoteur d'élongation de NR4A, Pol II, via la phosphorylation de Serine 2 (251). Donc, les effets bénéfiques de ces agents pourraient être attribués à leurs effets sur l'expression et l'activité des NR4As.

Il a été démontré que les propriétés anti-inflammatoires et d'immunosuppression de MTX découlent de sa capacité à augmenter les niveaux extracellulaires d'ADO (252). Les médiateurs transcriptionnels et les événements de transduction impliqués dans l'augmentation des réponses médiées par l'ADO dans le contexte de l'inflammation sont peu connus, mais des études démontrent que l'immunomodulation de NR4A2 par MTX est modulée par la sécrétion d'ADO et la modulation de son récepteur A_{2A} (250). Par contre, peu en est connu sur le rôle des récepteurs de NR4A dans le contrôle de l'inflammation.

En plus d'être impliqués dans les cascades anti-inflammatoires, les NR4As dévoilent aussi un rôle dans la médiation des signaux pro-inflammatoires en activant la cascade d'NF- κ B (253). L'expression ectopique de NR4A1 augmente l'expression de kinases activant NF- κ B dont *inhibitor of NF- κ B kinase i* (IKKi) et *NCK-interacting kinase* (NIK), IKKi étant une cible directe de l'activité transcriptionnelle de NR4A1 (247; 253). Donc de niveaux aigus ou chroniques d'expression des NR4As peuvent avoir de différents effets sur l'expression des gènes, menant à une augmentation ou à une diminution de l'inflammation (247; 253; 254; 255).

Comme décrits plus haut, les lymphocytes Tregs peuvent être ciblés par plusieurs marqueurs, dont CD4 et Foxp3. Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunes spécifiques aux pathogènes ainsi que dans le maintien de l'homéostasie (256; 257; 258; 259), et sont générées par la sélection positive de cellules T CD4⁺ via l'induction de la transcription du gène de Foxp3 (236). De ce fait, l'expression

de Foxp3 s'est prouvée indispensable pour le développement et la fonction des Tregs (260). Des études ont démontré que l'expression du gène de Foxp3 peut, entre autres, être régulée par les NR4As (261; 262) ainsi qu'activé par l'induction de NF- κ B (263) qui peut lui-même être induit par NR4A (247). La suppression individuelle des NR4As ne semble pas affecter l'expression de Foxp3, mais la perte simultanée de l'expression de NR4A1 et NR4A3 ou des 3 NR4As mène à un phénotype pathologique qui se caractérise par des dommages tissulaires importants (262). Un article publié par notre équipe suggère les NR4A1-3 comme marqueurs potentiels de populations Bregs de précurseurs de cellules B MZ-like. Chez ces cellules, une haute expression des NR4As semble être corrélée à une haute expression de CD83 qui possède des propriétés de modulation possiblement lié à leur fonction Breg (201).

3.6. Les lymphocytes B dans le contexte d'une infection au VIH

3.6.1. Infection des lymphocytes B et transmission

Malgré l'infection de cellules B *in vivo* n'ayant pas encore été démontrée, *in vitro*, le VIH est capable de se répliquer dans les cellules B ayant été stimulées par CD40 (264). Les virions peuvent aussi se lier aux cellules B à l'aide des récepteur CD21, DC-SIGN et α 4b7 exprimés par certaines populations (265; 266).

3.6.2. Perturbation de la dynamique des populations de lymphocytes B

Le VIH mène à une activation immune persistante impliquant les cellules mémoires activées et les cellules mémoires « tissue-like », des cytokines inflammatoires, IFN-I, et Foxo3a et l'augmentation de la fréquence des plasmablastes. Cette activation immune persistante mène à une augmentation de l'apoptose (267; 268) et de l'épuisement cellulaire (269) et à l'hypergammaglobulinémie (270). L'hypergammaglobulinémie, une augmentation des Ig totaux dans le sang, est une réflexion des effets de l'activation immune systémique polyclonale causée par le VIH sur la différenciation des cellules B (270; 271) tandis que les défauts des cellules B mémoires, qui consistent en une perte de la mémoire due à une atteinte des structures lymphoïdes et des centres germinatifs, sont une réflexion des défauts des cellules T_h CD4⁺.

3.6.2.1. *Lymphocytes B mémoires*

La cellule B mémoire est une cellule qui se réplique suite au contact renouvelé avec un antigène et qui peut exprimer ou non CD27. Celles qui ne l'expriment pas sont celles ayant eu contact avec un antigène et ont généralement un isotype commuté IgG ou IgA (272). Les cellules B mémoires exprimant CD27 peuvent ou non avoir subi une commutation de classe de leur Ig (273). Dans le centre germinatif, suite à la reconnaissance d'un antigène initial, la cellule subit une SHM afin que son BCR ait une meilleure affinité à l'antigène l'ayant activé. (274) Des sous-types de cellules B mémoires CD27⁺CD21^{lo} et CD27⁻CD21^{lo} sont retrouvés à haute fréquence chez les gens atteints du VIH (269). Les défauts des cellules B mémoires lors d'une infection au VIH incluent un changement de fréquence et de fonctionnalité des sous-populations circulant dans le sang et dans les tissus lymphoïdes et ceux-ci mènent à une diminution de la fréquence de cellules B T-dépendantes et de cellules B mémoires IgM⁺ résultant en une réponse virale moins efficace (275). Le déclin des cellules B mémoires dont les « tissue-like », une population minoritaire qui augmente dans un contexte inflammatoire, pourrait être due à une susceptibilité augmentée à l'apoptose due à des changements dans l'expression de molécules clés impliquées dans la survie et la mort de la cellule dont *Fas receptor* (FasR) et *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (268; 276; 277). Des changements chez les molécules qui guident les cellules B vers certains compartiments tels CXCR5 et CXCL13 peuvent aussi être responsables du déclin des cellules B mémoires (278). Finalement, dans le contexte du VIH, plus de cellules B mémoires se différencient en cellules plasmiques que chez un contrôle sain (279). Malheureusement, les individus ayant été traités avec ART n'ont qu'une restauration partielle de cette population (280).

3.6.2.2. *Hypergammaglobulinémie*

Dans l'hypergammaglobulinémie associée au VIH, IgG1 est l'Ig subissant l'augmentation la plus importante (281). L'augmentation d'Ig dans le sang pourrait mener à une augmentation de la formation de complexes immuns se liant et activant les cellules connues pour la sécrétion de facteurs inflammatoires associés à une haute virémie exprimant des récepteurs activateurs Fc (282; 283). Les complexes immuns peuvent activer les cellules B, mais plutôt via leur BCR puisque celles-ci expriment plutôt *Fc receptor*,

IgE, low affinity II (FcεRII) à la place de récepteurs Fc (284). La Gp120 du VIH peut également mener à l'activation polyclonale des cellules B des amygdales et de la rate (285). La protéine virale agit par l'entremise des *mannose C-type lectin receptor (MCLR)* qui favorisent la CSR. Elle favorise aussi la sécrétion de BAFF par les monocytes, menant à l'augmentation d'expression de MCLR sur les cellules B, complétant un cycle vicieux d'activation polyclonale (286).

3.6.2.3. *Perturbation de l'homéostasie et hypercytokinémie pro-inflammatoire*

Le VIH mène aussi à la perturbation de l'homéostasie et de la régulation causée par les changements du compartiment B, dont ceux affectant les cellules B immatures et transitionnelles. La perte d'homéostasie mène à une diminution de la fréquence des cellules B naïves (287), une augmentation de l'apoptose intrinsèque et à l'autoactivité (288). Le début de l'infection au VIH s'accompagne d'une hypercytokinémie pro-inflammatoire (289; 290; 291). Plusieurs cytokines impliquées contribuent à l'activation des cellules B, tel IL-15 qui joue un rôle dans l'activation polyclonale et dans la différenciation (292; 293) et IL-6 qui est impliquée dans la différenciation et la survie des cellules B (294) et qui a été associée à l'hypergammaglobulinémie (107). Les niveaux d'IL-6 semblent être directement contrôlés par les niveaux d'inflammation, plutôt que par le VIH (295). Les individus infectés au VIH ayant une déplétion de cellules T exhibent de plus hauts niveaux d'IL-7, une cytokine capable d'interférer avec la survie et la prolifération des cellules de façon non spécifique à l'antigène (286). IL-7 augmente l'expression de CD70 par les cellules T et leur production de BAFF ce qui mène à une augmentation de la production d'IgG par les cellules B (296). L'expression de la chimiokine inflammatoire IP-10 est induite par IFN-I (297), une famille de cytokines pro-inflammatoires liée à l'activation immune associée au VIH (298). L'expression d'IL-10, une cytokine associée à la virémie, vient un peu après les autres (289). Malgré qu'elle possède des propriétés anti-inflammatoires, cette cytokine induit la différenciation des cellules B et la production d'anticorps, contribuant à l'activation des cellules B (299; 300). De plus, IL-10 inhibe l'activité antivirale des cellules Th (301) et CD8⁺ (302) diminuant le contrôle du virus par le système immunitaire (303). L'activation des cellules B peut aussi être causée par la ferritine, une protéine produite par les macrophages qui expriment Nef (304). Les niveaux de

ferritine corrélerent directement avec la virémie et les niveaux d'IgG dans le sang (286). L'effet de la dérégulation de BAFF dans le contexte d'une infection au VIH est discuté en détail dans la section 5.

3.6.2.4. Rôle des cellules *Tfh* $CD4^+$

Les cellules *Tfh* $CD4^+$ stimulées par un antigène augmentent l'expression de CXCR5 puis migrent aux follicules de cellules B afin d'avoir des interactions bénéfiques avec ces dernières lors des réactions du centre germinatif (305). Les cellules *Tfh* $CD4^+$ sont capables d'aider les cellules B grâce à plusieurs molécules qu'elles expriment dont ICOS, CD28, CD40L, et grâce à de molécules qu'elles sécrètent tel IL-21 (306). Elles favorisent la survie des cellules B du GC et leur différenciation en cellules mémoires ou plasmiques (305). Les cellules B du GC stimulent les cellules *Tfh* à l'aide d'interactions cellulaires médiées par ICOSL et SAP (307; 308) et à l'aide de cytokines tel IL-6 et IL-27 (306). Dans le contexte du VIH, une haute expression de BAFF et l'accumulation des cellules *Tfh* et ainsi de leurs cytokines IL-10 et IL-21 dans les GC peut diminuer le seuil de sélection de cellules B, résultant en une accumulation cellules B de basse affinité dans les GC (279). Les cellules B de basse affinité peuvent ensuite se différencier en cellules plasmiques et contribuer à l'accumulation d'anticorps de basse affinité (286). L'augmentation de l'expression du ligand PD-1L chez les cellules B du centre germinatif pouvant lier PD-1, un marqueur hautement exprimé par les cellules *Tfh*, mène à une restriction fonctionnelle de ces dernières ainsi qu'à l'hyperplasie des tissus lymphoïdes (300; 309). Certaines études démontrent que les cellules B folliculaires des ganglions lymphatiques des individus infectés au VIH ont une déféctuosité face à leur capacité de subir une commutation de classe et de répondre au VIH, un changement associé à Nef, une protéine du VIH capable de bloquer la cascade de signalisation via CD40 (40) (41). Il est possible de soutenir cette information ainsi que celles discutées plus tôt dans ce paragraphe si l'on suppose qu'au moins une partie de l'hyperactivation des cellules B à lieu à des sites extrafolliculaires (294). Finalement, il a été démontré que les cellules *Tfh* peuvent être une source de réservoir importante pour le virus, une étude ayant réussi à extraire du VIH capable de répliquer chez des patients avec une basse virémie (< 1000 copies d'ARN VIH). Chez ces patients, les cellules *Tfh* contenaient le plus haut pourcentage de cellules T $CD4^+$

contenant de l'ADN VIH, et ces cellules étaient les plus efficaces en infection productive *in vitro* (310).

3.6.2.5. *Épuisement des lymphocytes B*

Lors d'une activation immune chronique dans le contexte du VIH ou d'une autre maladie inflammatoire, les cellules B peuvent avoir recours à un mécanisme d'épuisement afin de se protéger de leur environnement inflammatoire. Cette réponse est caractérisée fonctionnellement par une diminution de leur capacité de prolifération en réponse à un nouveau stimuli et phénotypiquement par l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs. L'épuisement de ces cellules est aussi reflété par une diminution de diversité d'épitopes.

Dans le contexte du VIH, PD-1, un récepteur inhibiteur associé à l'épuisement des cellules T CD8⁺ (311), semble être impliqué dans l'épuisement des cellules B (305). Les récepteurs inhibiteurs *Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1* (LAIR-1), *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4), Tim-3 (312; 313), FCRL4, *sialic acid-binding Ig-like lectin 6* (SIGLEC-6) et CD11c (224; 314) ont également été associés à l'épuisement des cellules B associée au VIH. (286). De plus, les individus atteints du VIH ont une population de cellules B exprimant de hauts niveaux de T-bet. Les circonstances dans lesquelles ce facteur de transcription aurait un rôle bénéfique est encore mal compris (315).

3.6.2.6. *Lymphocytes B des muqueuses*

Les cellules B des muqueuses sont également affectées par le VIH. Une augmentation d'apoptose des cellules B des ganglions lymphatiques mésentériques, de la lamina propria et des plaques de Peyer, et une augmentation de l'activation polyclonale sont observés lors de la phase aiguë du VIH (316; 317). Une hyperplasie folliculaire des GC, résultat possible d'une accumulation de cellules B, est suivie par une dégénération des réseaux de FDC et la perte de l'intégrité des GC (316; 318). Chez les cellules B des muqueuses des individus en phase chronique, la réponse d'IgA au VIH et aux pathogènes des muqueuses est affectée (319). L'effet de Nef sur la commutation de classe des Ig pourrait être responsable de ce problème (41). La progression de la maladie mène au

changement de l'isotype dominant des Ig qui passe de IgA, une Ig non inflammatoire favorisant l'homéostasie, à IgG, une Ig inflammatoire, ce qui est en accord avec un profil antiviral de type Th1 et un bris d'homéostasie du profil Th17 (320). Ces changements ont aussi été observés par un membre de notre laboratoire, leur article démontrant un compartiment B dérégulé caractérisé par une augmentation d'IgG1 et un plus haut ratio IgG⁺/IgGA⁺ chez des travailleuses du sexe VIH-séropositives (321). Ce changement d'isotype reflète un mécanisme par lequel le VIH engendre de l'inflammation dans la muqueuse intestinale (322).

3.6.3. Effet de la thérapie sur la restauration du compartiment B

Suivant l'introduction de la thérapie antirétrovirale pour les gens atteints du VIH, des études ont été conduites afin de déterminer l'état des cellules B post-traitement. Il a été démontré qu'un traitement initié lors de la phase aiguë ou lors de la phase chronique de l'infection au VIH mène à une diminution des réponses polyclonales spontanées des cellules B (323). La fréquence de plasmablastes dans le sang, haute lors de la phase aiguë, revient à la normale chez les individus VIH⁺ après 1 an de traitement ART mais avec des ratios IgA et IgG inversés (280). Par contre, les populations de cellules B mémoires et 'tissue-like' n'atteignent pas une restauration complète après cette même période de traitement, et l'hypergammaglobulinémie n'est pas non plus complètement normalisée par ART (280; 324). Certains chercheurs suggèrent que la cause de cette restauration incomplète réside dans la persistance d'une activation immune post-traitements chez les individus infectés (325). D'un autre côté, le phénotype et la fonction des cellules B mémoires 'resting' subissent une restauration plus complète si ART est administré lors de la phase aiguë plutôt que lors de la phase chronique (280). Globalement, l'administration de ART rapidement après l'infection au VIH mène à une restauration plus complète des populations de cellules B.

3.7. Importance de la réponse B dans le contexte d'une infection au VIH-1

Chez les gens en santé, les anticorps sont produits soit par les cellules plasmiques plasmocytes de longue durée se retrouvant dans la moelle osseuse (326) ou par les plasmablastes de courte durée qui migrent au sites effecteurs et qui prolifèrent et se

différencient en plasmocytes de façon transitoire lors d'une infection (327). La réponse primaire au VIH, avant la formation des centres germinatifs et avant l'implication des cellules T, implique la production de plasmablastes. Les plasmablastes sont des cellules B s'étant différenciées en cellules sécrétant des anticorps en continuant de proliférer. Ces cellules peuvent être retrouvées dans les tissus lymphoïdes ou en circulation dans le sang périphérique et expriment CD38, CD27 et Ki-67, qui indique le changement de cycle des cellules (274). Le flux de plasmablastes, la plupart étant spécifiques à l'antigène, vient 5-7 jours après l'infection au VIH (327), ce qui corrèle avec la présence d'IgM spécifiques au VIH retrouvés dans le sang dans les premières semaines suivant l'infection (328). Les plasmablastes non spécifiques au VIH sont une réflexion des effets directes et indirectes d'activation polyclonale du virus sur les cellules B (329). Les plasmablastes peuvent, peu après l'infection, représenter 50% des cellules B circulant dans le sang périphérique (271) et leur présence corrèle avec la virémie, chose démontrée par leur disparition après initiation d'ART (323).

Selon l'équipe de Liao, la gp41 du VIH serait l'une des premières cibles de la réponse immune après l'infection (328) et les anticorps monoclonaux ciblant cette protéine virale proviendraient entre autres des plasmablastes (330). Ces anticorps sont hautement permutés, polyréactifs (330) et non neutralisants, suggérant qu'ils proviennent de cellules B mémoires de 1^{ère} ligne ou présentes avant l'infection au VIH et visant des antigènes bactériens du microbiote. Les BCRs de ces cellules mémoires ont donc une réactivité croisée avec la gp41 du VIH et lorsqu'ils entrent en contact avec cette dernière, les cellules mémoires subissent une expansion clonale (330). L'infection au VIH ne semble pas affecter le cycle des cellules plasmatiques incluant leur tendance de s'accumuler dans la moelle osseuse, et la sécrétion d'anticorps dans la circulation. Par contre, la qualité des anticorps sécrétés par ces cellules n'a pas encore été déterminée (274).

La réponse primaire au VIH implique aussi un enrichissement en IgG3 (331) qui serait le résultat de la commutation de classe de cellules B immatures, indépendamment du centre germinatif (332; 333; 334). L'enrichissement en IgG3 est rapidement suivi d'une déplétion de ces Ig chez les individus infectés au VIH (331). La réponse initiale impliquant

les anticorps non neutralisants est suivie par une réponse au virus, puis, lors de la phase chronique, la fréquence des anticorps diminue (mais demeure élevée comparée aux individus non infectés) et l'isotype dominant change d'IgA à IgG (271), la réponse des cellules B s'élargit, et une fraction des gens infectés développent une réponse large et puissante (335).

Les cellules plasmiques, eux, sont plus difficiles à étudier dû à leur nature non cyclique et à leur différenciation. Ces cellules commencent sous forme de plasmablastes puis subissent une différenciation finale avant de devenir des cellules plasmiques productrices d'anticorps. De plus, elles se retrouvent généralement dans des tissus difficiles d'accès telles la rate et la moelle osseuse (336). L'étude des anticorps neutralisants des cellules plasmiques de la moelle osseuse démontre qu'elles ressemblent de près aux anticorps retrouvés dans le sang périphérique, indiquant une association entre les compartiments (337). Les cellules plasmiques des tissus muqueux sont connues pour leur production d'IgA chez les gens en santé (167). Ces cellules B IgA⁺ spécifiques au virus ont été détectées dans les tissus muqueux des femmes exposées au VIH séronégatives, suggérant leur importance dans le contrôle de l'infection (338).

La restriction de la réplication virale et de la progression de la maladie par la réponse des cellules B et des anticorps au VIH n'est pas supportée par la littérature. En fait, certaines études démontrent une corrélation entre une haute fréquence d'anticorps neutralisants (bNAbs), une haute virémie et une diminution de cellules T CD4⁺ (339). Le rôle des anticorps sécrétés par ces cellules dans le contrôle de l'infection n'est pas encore bien compris (274). D'un autre côté, des études démontrent qu'une distribution normale de populations de cellules B dans la circulation des individus avec VIH (similaire à celle des individus sains) est associée à une réponse des cellules B mémoires ou à des bNAbs (340). En fait, une basse virémie et une normalisation du compartiment B seraient nécessaires à la sécrétion de bNAbs, aussi retrouvés chez des individus atteints du VIH sous traitements (340). Une plus grande réponse des cellules B spécifiques au VIH est observée chez les individus traités avec ART même si la fréquence de ces cellules diminue avec le traitement

(275). Donc, un compartiment de cellules B mémoires intact serait associé à une forte réponse humorale (274).

4. Lymphocytes B de la zone marginale

4.1. Zone marginale

La zone marginale, découverte initialement chez le rat, se retrouve entre le tissu lymphoïde de la pulpe blanche de la rate et la circulation sanguine, et contient des lymphocytes B résidents ayant une réponse T-indépendante T2 (341) enchevêtrés avec des DC, des macrophages et des granulocytes dans un réseau réticulaire stromal (342).

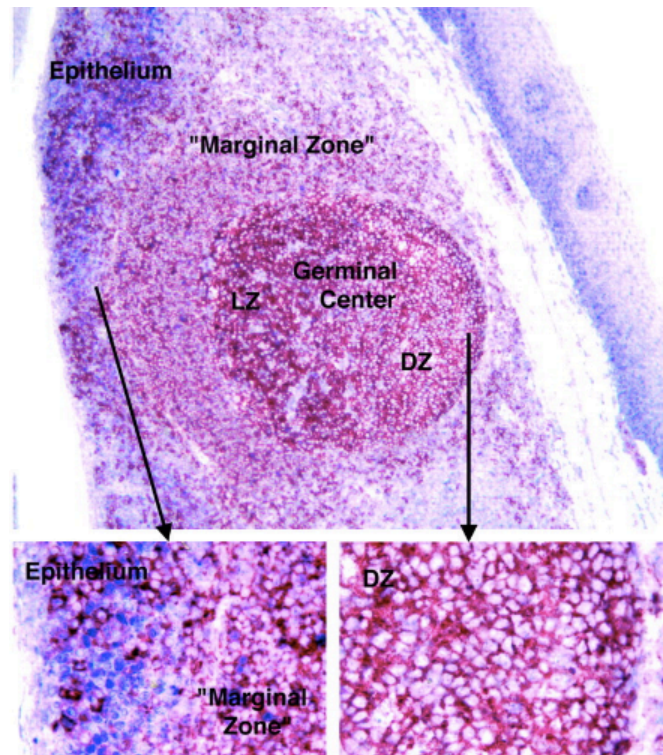


Figure 5. Analyse immunohistochimique d'une section d'amygdale illustrant l'épithélium, la zone marginale, le centre germinatif, la zone claire (LZ) et la zone sombre (DZ) (343)

4.1.1. Découverte de la zone marginale et des cellules B MZ

MacNeal fut l'un des premiers chercheurs à décrire l'anatomie de la zone marginale chez le rat en 1929. Initialement, il était cru que cette zone fût peuplée par des granulocytes, des macrophages et des cellules plasmiques précurseurs lors de la réponse immune innée

ou adaptative (344). Dans les années 1980, le groupe de MacLennan démontra que les cellules B de la zone marginale « naïve », provenant de précurseurs transitoires de la lymphe du rongeur, ont tendance à rester dans cette zone marginale (345; 346). Il fut ensuite découvert que ces cellules B MZ sont indépendantes des cellules T et des antigènes exogènes (347), et qu'elles participent dans la réponse immune (348), les antigènes leurs étant présenté par des macrophages spécialisés de la rate (349).

4.2. Rétention des cellules B MZ dans la zone marginale

CXCL13, produit par les DC folliculaires, se lie à CXCR5 menant à la migration et à la rétention des cellules B dans le follicule (350). Chez les rongeurs, les cellules MZ expriment les récepteurs lysophospholipides S1P1 et S1P3 qui, lorsque lié à la sphingosine-1-phosphate (S1P), interfèrent avec les signaux de CXCR5 (350) permettant la rétention des cellules MZ dans la zone marginale, zone riche en S1P, lors du passage du sang (342; 351). En fait, S1P est un lipide produit par les plaquettes, les érythrocytes et les cellules endothéliales vasculaires qui attire les lymphocytes B (352). Les cellules folliculaires, n'exprimant pas les récepteurs de S1P, peuvent donc facilement traverser la zone marginale sans y rester prises et s'accumulent dans le follicule, suivant le gradient de CXCL13 (350; 353). Le récepteur cannabinoïde 2 (CNR2) joue aussi un rôle dans la migration des lymphocytes B immatures de la rate vers la zone marginale (354). Ce récepteur joue aussi un rôle dans la rétention sinusoïdale des lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse (355). De plus, l'interaction entre les intégrines α LB2 et α 4B1 des cellules B MZ avec les molécules d'adhésion des cellules stromales *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) et *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), respectivement, s'agit d'une autre composante de rétention des cellules B MZ dans la zone marginale (356). En parallèle, CXCR7, exprimé par les cellules B MZ mais non par les cellules folliculaires, se lie à CXCL12, un modulateur de l'activité de CXCR4 participant à la rétention des cellules B MZ dans la MZ (357).

4.2.1. Cellules MZ transitoires

Malgré les multiples facteurs assurant la rétention des cellules B MZ dans la zone marginale de la rate, ces cellules peuvent aussi être transitoires et passer par la MZ avant

d'entrer dans la circulation systémique chez l'humain (358). En fait, une étude de Weller et coll. démontre que les cellules mémoires $IgM^+IgD^+CD27^+$ retrouvées dans la circulation sanguine humaine sont plutôt des cellules MZ transitoires de la rate capables d'exprimer des Ig diverses (359). Lors d'une réponse T-dépendante, des cellules B à haute affinité de la circulation et du centre germinatif transitent vers la MZ. Ces cellules sont ensuite capables de réagir comme les MZ lors d'une réponse T-indépendante induite par un polysaccharide (360). Ce phénomène de recirculation défini chez l'humain n'a pas été observé chez les rongeurs, chez qui les cellules B MZ semblent rester dans la MZ de la rate (361).

4.3. Présentation antigénique aux cellules B MZ

Dans le sinus marginal du rongeur, où il y a ralentissement du débit sanguin favorisant l'interaction entre les antigènes et les cellules MZ, les macrophages de la zone marginale et les macrophages métallophiles captent les antigènes à l'aide de leurs PRRs dont les récepteurs éboueurs et les CLR et les internalisent dans des vésicules intracellulaires qui migrent à la surface de la cellule afin d'exposer les antigènes aux cellules B MZ qui les reconnaissent avec leur BCR (362). Les antigènes peuvent aussi être captés par les DC et les granulocytes et transportés au sinus marginal afin d'être présentés aux cellules B MZ (363). Chez la souris, les plus gros antigènes sont captés par les DC ou les granulocytes dans la circulation périphérique, ou par les macrophages de la zone marginale dans la rate (363; 364). Les plus petits antigènes, à l'aide d'un complément opsonine, sont capables d'interagir et d'activer directement les cellules B MZ (365). Les lymphocytes B MZ ayant interagi avec un antigène via leur BCR peuvent ensuite sortir de la zone marginale et se déplacer vers les follicules afin de transporter leur antigène aux DC folliculaires, ce qui aide à l'élaboration d'un centre germinatif (350). Après activation par leur BCR par un antigène, les cellules B MZ peuvent aussi se déplacer vers la zone T afin d'activer les lymphocytes T ou, à l'aide de signaux co-stimulateurs provenant de cellules immunes innées ou adaptatives, se différencier en plasmablastes sécrétant des anticorps non mutés via une cascade dépendante (*TD pathway*) ou indépendante (*TI pathway*) des cellules T (362). Ici, la cascade T dépendante implique la présentation de peptides aux cellules Th $CD4^+$ via des complexes CMH-II (366). Chez l'humain, la zone marginale n'est

pas séparée des follicules de lymphocytes B par un sinus marginal, elle est plutôt divisée en partie interne et externe par une couche de fibroblastes. De plus, la zone marginale ne contient pas les macrophages spécifiques retrouvés chez le rongeur (367). Dans ce cas, les antigènes pourraient venir en contact avec les cellules B MZ au travers de la zone périfolliculaire (367), qui contient entre autres des neutrophiles ayant un fort potentiel *B-helper* et des DC (368).

4.4. Différenciation en plasmablastes

Chez les souris, lorsqu'une cellule B MZ se transforme en plasmablaste à court terme après activation par un antigène, il y a migration subséquente de cette cellule vers la pulpe rouge en réponse à CXCL12, un ligand de CXCR4, exprimé par des cellules stromales, dendritiques, neutrophiles et macrophages de la pulpe rouge et de la zone périfolliculaire (368; 369; 370). La stimulation des cellules B MZ par un ligand microbien d'un TLR mène à la diminution de l'expression des intégrines, des récepteurs de S1P, de CXCR5, et de CCR7, des changements nécessaires à leur migration (353; 369). Chez la souris ainsi que chez l'humain, des cellules innées (DC, macrophages, neutrophiles, cellules stromales de la pulpe rouge, cellules tapissant le sinus) produisent BAFF et *a proliferation-inducing-ligand* (APRIL), ce qui engage les récepteurs TACI et *B-cell maturation factor* (BCMA), supportant la maturation et la survie des plasmablastes (363; 368; 371; 372; 373; 374). Chez l'humain, des ligands d'un TLR microbien et des cytokines tel IFN-I et IFN γ stimulent la production de BAFF et de APRIL par les DC (375; 376; 377). Les DC des souris, elles, produisent BAFF en réponse à IFN γ par une cascade dépendant de STAT-1 régulée négativement par *autoimmune regulator* (AIRE) (378). Les plasmablastes humains reçoivent des signaux de maturation et de survie additionnels d'IL-6, d'IFN-I et de CXCL10 (379; 380). CXCL10 est un ligand de CXCR3 qui stimule la production d'IL-6 par les cellules B activées, augmentant la production de CXCL10 par un sous-type de macrophages exprimant CD163, un récepteur d'hémoglobine (380).

4.5. Molécules exprimées par les lymphocytes B MZ

Les cellules B MZ des rongeurs expriment plusieurs molécules dont *complement receptor type 2* (CD21), *complement receptor type 1* (CD35), CD1d, CD80, CD86 et CMH-

II (146; 381), avec un phénotype typique $IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{+}CD22^{hi}CD23^{-}CD1^{hi}$ (381). Via leurs molécules CD21 et CD35, les cellules B MZ des souris sont spécialisées dans la reconnaissance d'opsonines complémentaires (365). CD1d, une molécule CMH-I, permet une reconnaissance spécialisée de glycolipides microbiens (382). CD80, CD86 et CMH-II, eux, sont requis pour l'activation des cellules folliculaires Th, permettant une polyvalence fonctionnelle des cellules B MZ (366). En fait, il existe une sous-population chez la souris nommée cellules B MZ précurseurs T2 (T2-MZP) distingués par le phénotype $CD19^{+}CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}IgM^{hi}IgD^{hi}CD1d^{hi}$ produisant une grande quantité d'IL-10. Ces cellules, par leur fonction Breg, semblent même alléger les symptômes associés à l'arthrite en augmentant la fréquence de Treg et en diminuant la fréquence de Th1 et de Th17, et ce, par leur production d'IL-10 (198).

Les cellules B MZ expriment aussi des BCRs polyreactifs capables de se lier à plusieurs PAMPs (164) comme le font les TLRs. Ces cellules sont donc capables de répondre aux ligands de TLRs endogènes ou associés à un pathogène avec ou sans la reconnaissance d'un antigène via leur BCR. En fait, l'activation simultanée d'un BCR et TLR par une molécule microbienne tel un lipopolysaccharide ou un peptidoglycan permet aux cellules MZ d'avoir une réponse immunitaire T-indépendante de basse affinité jusqu'à ce que les cellules folliculaires aient le temps de générer une réponse de haute affinité (383). Les cellules B MZ se développent rapidement au cours des 3 premiers jours suivant l'infection en cellules plasmiques extrafolliculaires sécrétant IgM (363) qui forment un complexe avec le pathogène. À l'aide de l'enzyme *activation-induced cytidine deaminase* (AID), des IgG et IgA sont produits par CSR via TACI, récepteur de BAFF, et contribuent à la réponse immune (368).

4.6. Réponse des cellules B MZ aux antigènes T-indépendants

Le temps requis avant le développement d'une réponse T-dépendante consistante par les cellules B folliculaires, 5 à 7 jours, peut mener à la mort si une réponse plus rapide n'est pas engendrée. C'est dans cet intervalle que les cellules B MZ mènent la réponse de première ligne en ayant une réponse T-indépendante. Pendant les 3 premiers jours suivants l'infection, les cellules B MZ se développent en plasmablastes qui résident dans la pulpe

rouge de la rate puis en plasmocytes sécrétant des IgG, des IgA, et des IgM de basse affinité (362; 384; 385). Rapidement, ces cellules produisent des anticorps en réponse aux antigènes T-indépendants de type 1 qui se lient au BCR et peuvent co-activer des TLRs, ou qui se lient aux antigènes T-indépendants de type 2, qui induisent la réticulation du BCR et co-activent plusieurs PRRs (386; 387; 388). L'interaction entre les cellules B MZ et les antigènes peut se faire de plusieurs façons décrites dans la section '*Présentation antigénique aux cellules B MZ de la zone marginale*'. Chez l'humain et la souris, l'antigène T-indépendant se liant aux molécules BCR et TLR permet l'activation des cellules B MZ par coopération avec TACI, un récepteur capable de lier BAFF et APRIL qui sera décrit en détail plus loin (371). Chez la souris, des opsonines complémentaires se lient aux antigènes T-indépendants, et, via CD21 et CD35, permettent la production de plus de signaux activateurs dirigés vers les cellules B MZ. Les récepteurs complémentaires CD21 et CD35 fonctionnent en augmentant la signalisation du BCR par l'interruption de l'expression de PD-1 (365; 387; 389).

4.7. Réponse des cellules B MZ aux antigènes T-dépendants

Il a été démontré chez la souris que les cellules B MZ expriment de hauts niveaux de CD80, de CD86, et de molécules CMH-I et II à leur surface permettant une forte activité de présentation antigénique (390; 391). La notion la plus véhiculée dans la littérature est celle qui stipule que les cellules T naïves sont d'abord stimulées par les DC dans les gaines lymphoïdes périartériolaires (PALS). Les cellules B folliculaires stimulées migrent et interagissent avec les cellules T au bordure du follicule et des PALS formant un centre germinatif. Les cellules B MZ, elles, sont importantes pour la transportation des complexes immuns aux cellules dendritiques folliculaires dans la zone folliculaire. Il a été rapporté que l'activité des cellules B MZ joue un rôle dans la régulation des centres germinatifs en amplifiant l'activation des cellules NK par les DC (392). Un article de Mauri démontre que lorsqu'il y a déplétion des cellules B MZ, les cellules B MZ précurseurs continuent d'induire la différenciation des cellules iNKT (195). Les populations des cellules B MZ sont hétérogènes; ces cellules sont capables de migrer à la jonction follicule-PALS et pourraient ainsi engendrer le centre germinatif. Des centres germinatifs secondaires pourraient aussi être formés par des cellules B mémoires qui transitent par la zone

marginale (393). Par contre, le rôle des cellules B MZ dans la formation du centre germinatif n'est pas tout à fait élucidé (366; 391). Une hypothèse consiste en la différenciation de ces cellules naïves $T_h CD4^+$ en cellule Tfh classique avec ou sans l'aide de DC locaux (366; 394). Les cellules Tfh stimulent les cellules B spécifiques aux antigènes à subir des CSR et SHM par l'expression de CD40L et de cytokines dont IL-4, IL21 et IFN- γ . Cette cascade dépendante de CD40 mène à la production de cellules B mémoires et de cellules plasmatiques exprimant des anticorps IgG commutés de haute affinité (366; 394).

Les cellules B MZ de la souris pourraient amplifier la réponse aux anticorps folliculaires T-dépendants en amenant continuellement des antigènes liés à des complexes immuns au follicule. Les antigènes, captés par les DC folliculaires, facilitent la sélection des cellules B du centre germinatif où celles ayant une haute affinité pour ces antigènes sont sélectionnées (152). Les cellules B MZ de la souris ont aussi une réponse T-dépendante extrafolliculaire menant à la production de plasmablastes sécrétant des IgM et IgG de basse affinité (395; 396).

4.8. Différences entre cellules B MZ et cellules mémoires humaines

Les cellules B MZ humaines présentent des mutations somatiques du récepteur IgM, poussant plusieurs chercheurs à les nommer 'cellules mémoires IgM', mais elles représentent deux populations distinctes. De plus, les lymphocytes B mémoires produits par la réponse T-dépendante peuvent se retrouver dans la zone marginale, causant encore plus de confusion entre les cellules B MZ de l'humain et de la souris. (361; 397; 398; 399) Les cellules B MZ humaines ont de plus hauts niveaux d'auto-réactivité que les cellules B naïves, sûrement dû à leurs BCR polyréactifs et mutations somatiques (400). Au contraire, les cellules B MZ de la souris expriment des gènes de chaînes variables d'immunoglobuline (IgV) non mutés où certains d'entre eux encodent des BCRs polyréactifs (381). Des structures moléculaires conservées exprimées par des auto-antigènes ainsi que des antigènes étrangers sont reconnus par ces BCRs, permettant l'élimination de bactéries provenant de l'environnement ainsi que de cellules endommagées (381).

Comme les cellules B MZ de la souris, les cellules B MZ humaines seraient capables de produire des anticorps spécifiques aux polysaccharides microbiens d'une façon T-indépendante, mais une réponse T-dépendante serait aussi possible (359). La population de cellules B $IgM^{hi}IgD^{low}CD1c^{+}CD21^{hi}CD23^{-}CD27^{+}$ exprime plusieurs traits normalement retrouvés chez la population de cellules B mémoires $IgM^{-}IgD^{-}CD1c^{-}CD21^{med}CD21^{-}CD27^{+}$ dont la recirculation, l'expression de CD27, un membre de la famille des récepteurs TNF, un gène V(D)J muté et des empreintes moléculaires d'un séjour dans un centre germinatif (273; 401; 402). Ces caractéristiques ont mené certains chercheurs à supposer que les cellules B MZ humaines seraient équivalentes à des cellules B mémoires qui, en sortant du centre germinatif avant l'induction de CSR, auraient retenu leur capacité de produire IgM (403). Par contre, certaines distinctions existent. Contrairement aux cellules B mémoires permutées et non permutées, les cellules B MZ humaines expriment IgD, elles ont un mécanisme distinct de diversification de répertoire de gène IgV lors de l'ontogénie, un modèle d'utilisation des gènes IgV différent, moins de mutations des gènes IgV, une accumulation plus lente de mutations des gènes IgV, elles sont moins dépendantes des centres germinatifs et des cellules T $CD4^{+}$ exprimant CD40L pour la production de mutations des gènes IgV, et ont moins de division cellulaire antérieure comparée aux cellules B mémoires (404; 405; 406). De plus, les cellules B MZ récupèrent plus lentement que les cellules B mémoires après un traitement de déplétion et dépendent moins des signaux de CD40 et plus des signaux TLR (166; 404; 407). En fait, une déplétion sélective des cellules B MZ humaines est observée chez les individus manquant de molécules signalisant TLR (166). Il peut être utile de voir ces deux groupes de cellules comme appartenant à une population hétérogène de cellules B $IgM^{hi}IgD^{low}CD1c^{+}CD21^{hi}CD23^{-}CD27^{+}$ où les cellules B MZ se développent à l'extérieur du centre germinatif et les cellules B mémoires non commutées se développent à l'intérieur du centre germinatif (152).

4.9. Cellules MZ-like humaines

Des cellules MZ-like humaines sont aussi retrouvées dans la paroi interne du sinus sous-capsulaire des ganglions lymphatiques, dans la crypte de Lieberkühn des amygdales, et sous l'épithélium en dôme des plaques de Peyer du GALT (361; 408; 409; 410; 411).

Comme les cellules B MZ de la rate, ces cellules MZ-like sont hautement exposées aux antigènes. Par contre, ces cellules MZ ne semblent pas jouer un rôle aussi important dans la réponse immune que celles de la rate (412; 413; 414). De plus, des cellules B MZ humaines ont été retrouvées dans la circulation sanguine, démontrant leur capacité de circuler (359).

4.9.1. Cellules d'amygdales

Les ganglions lymphatiques contiennent des cellules similaires aux lymphocytes B MZ de la rate (415). Plus spécifiquement, le MALT contient une *mixed cell zone* qui représente la zone marginale de la rate (416). Dans cette zone, les cellules se distinguent par une taille et un noyau ressemblant les centrocytes de la zone claire du centre germinatif (417). Dans les amygdales, les lymphocytes B de la zone sous-épithéliale sont l'équivalent des lymphocytes B MZ (417). Ces cellules sous-épithéliales ne semblent pas répondre aux antigènes TI-1 et ont une réponse aux antigènes TI-2, mais seulement en présence d'IL-2, ce qui n'est pas observé chez les cellules des centres germinatifs et des manteaux folliculaires. La réponse aux antigènes TI est observée chez les cellules B MZ de la rate du rongeur et de l'humain, renforçant l'idée que les cellules B sous-épithéliales des amygdales ayant cette même réponse représentent leur équivalent. Comme les cellules B MZ de la rate, les cellules sous-épithéliales ne semblent pas circuler puisque la majorité des lymphocytes B du sang en périphérie ont un phénotype ressemblant aux cellules du manteau folliculaire et ne semblent pas pouvoir générer une réponse aux antigènes TI-2. De plus, les cellules sous-épithéliales, tout comme les cellules B MZ, ne répondent pas aux activateurs polyclonaux, dont CD40. Elles peuvent toutefois avoir une activation polyclonale lors d'interaction avec des cellules T activées. La capacité de réponse aux antigènes TI-2 en absence de cellules T et la nécessité des cellules T pour l'activation polyclonale suggère l'hétérogénéité des cellules B sous-épithéliales (418).

Les cellules sous-épithéliales des amygdales se distinguent aussi du fait qu'elles n'ont pas une propension naturelle à l'apoptose comme les cellules des centres germinatifs et ne produisent pas d'anticorps polyspécifiques comme les cellules du manteau folliculaire. Après exposition à anti- μ -ab, un activateur polyclonal de cellules B, elles sont

capables de stimuler la réaction leucocytaire mixte des deux types de lymphocytes T répondeurs par présentation antigénique presque aussi efficacement que les DC, une caractéristique que l'on ne retrouve pas chez les cellules B du manteau folliculaire. Ces différences suggèrent que les cellules sous-épithéliales sont une sous-population distincte de cellules B (418).

Les amygdales contiennent aussi d'autres populations, dont des cellules épithéliales (EC) de l'épithélium réticulaire des cryptes. Ces EC forment des pochettes contenant des cellules B exprimant *paired box protein Pax5* (Pax5), une protéine nucléaire qui permet la régulation des gènes d'immunoglobulines (419). Ces pochettes épithéliales contiennent aussi des mDC CD11c⁺ et des pDC CD123⁺ pouvant induire une CSR (375). Une enzyme associée à la CSR continue, AID, pourrait être exprimée par les cellules B intraépithéliales (420). L'expression de AID par une sous-population de cellules B dans l'épithélium réticulaire de l'amygdale appuie cette hypothèse (376).

5. B-cell activating factor (BAFF)

BAFF, aussi connu sous le nom de *B lymphocyte stimulator* (BLyS), est un membre de la superfamille de ligands TNF et un facteur de survie et de différenciation primordial pour les cellules B (421). Cette protéine transmembranaire de type 2 se retrouvant à la surface des cellules sous forme d'homotrimère peut être clivée par la protéase furine et libérée sous forme soluble et active de 17 kDa afin d'assurer l'homéostasie des cellules B (422; 423). À des conditions physiologiques, BAFF a aussi été retrouvé sous forme de 60mer formé de multimers de 20 trimères capables de se lier à TACI, un de ses trois récepteurs décrits en détail plus bas (figure 6) (424). Il existe aussi Δ -BAFF, un isomère de BAFF incapable de se lier aux récepteurs de BAFF due à un peptide manquant. Celui-ci est toutefois capable de réguler l'activité de BAFF en formant un trimère inactif avec celui-ci (425).

5.1. Cellules exprimant BAFF

BAFF est principalement produit par les cellules stromales, les neutrophiles, et plusieurs cellules myéloïdes dont les DC, les macrophages, et les monocytes (426), surtout

ceux stimulés par *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) ou IFN (427). Il peut aussi être produit par les cellules T (428) et B activées (429) et les mastocytes (430), surtout en conditions inflammatoires créant des niches où l'inflammation est importante. La production de BAFF est régulée par plusieurs molécules, incluant l'estrogène (431), des IFNs de type I et II, TGF β , IL-10, CD40L et G-CSF (431; 432). Sa production peut aussi être induite par l'activation de TLRs tel TLR4, TLR7 et TLR9 (432), ainsi que par des LPS provenant de bactéries (433).

Des études démontrent aussi la production de BAFF par les cellules épithéliales des glandes salivaires dans le contexte du syndrome de Sjogren (434), par les cellules épithéliales de la voie respiratoire (435), par les cytotrophoblastes de placenta (436), par les synoviocytes 'fibroblast-like' du liquide synoviale de gens atteints d'arthrite rhumatoïde (431; 437), par les adipocytes des seins (438), par les ostéoclastes de patients atteints du myélome multiple (439; 440) et par les astrocytes de gens souffrant de la sclérose en plaques (441; 442). Les cellules épithéliales peuvent aussi produire *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) qui augmente encore les niveaux de BAFF (294).

5.2. Récepteurs de BAFF

Sous forme transmembranaire ou soluble, BAFF peut se lier à 3 récepteurs dont BAFF-R, TACI et BCMA (443). Ces trois récepteurs, tous exprimés différemment selon le stade de développement des cellules (444), forment un système ligand-récepteur qui inclut APRIL, capable de se lier à TACI et BCMA, mais non à BAFF-R (148). BAFF ayant trois récepteurs principaux a une affinité particulière pour TACI et BAFF-R, et ne se lie que faiblement à BCMA (445).

BAFF-R est une protéine transmembranaire de type 1 retrouvé sur les cellules naïves et mémoires. Les lymphocytes B immatures de la moelle osseuse sont les premières cellules à exprimer BAFF-R après le développement d'un BCR (444) et son expression augmente lorsque les cellules B transitionnelles se différencient en lymphocytes B folliculaires et MZ (148). BAFF-R est le récepteur principal dans la survie et la maturation des cellules B naïves et transitionnelles. Ce récepteur est aussi retrouvé à la surface de

cellules T mémoires effectrices suggérant un rôle de BAFF-R et de BAFF dans la fonction des cellules T (446).

TACI, une protéine membranaire de type III, peut se lier de haute affinité avec BAFF et APRIL. Le trimère de BAFF peut se lier à TACI, mais seulement le 60-mer de BAFF active la cascade de signalisation (447). Chez les souris, TACI est plutôt exprimé chez les cellules B innées matures comme les cellules B MZ, où son expression est augmentée en réponse aux ligands microbiens de TLR (371), tandis que chez l'humain, il est principalement exprimé par les cellules B MZ et mémoires (448). Ce ligand est important pour les réponses T-indépendantes (449). Via une cascade TLR-like impliquant MYD88, IRAK1, IRAK4 et des protéines adaptatrices de TRAF, TACI induit une CSR et la production d'anticorps (371; 450). La coopération de TACI avec le BCR et CD40 (371) pourrait indiquer que les cellules B MZ conçoivent leur réponse immune rapide par de cascades de signalisation innées et adaptatives classiques (152). TACI peut aussi réguler la fonction des cellules B en limitant l'expansion clonale de celles-ci par un mécanisme dépendant de *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (Blimp-1) et en produisant des cellules plasmiques de longue vie sécrétant des anticorps (451).

BCMA, comme TACI, est une protéine membranaire de type III. Il a une plus grande affinité pour APRIL que pour BAFF, mais se lie aux 2 molécules avec plus haute affinité chez l'humain que chez la souris (452). Les sous-populations de cellules B du sang périphérique et de la rate expriment de hauts niveaux de BAFF-R et de TACI, tandis que l'expression de BCMA qui a comme rôle la promotion de la survie des cellules plasmiques à long terme (453) est restreinte aux cellules B du centre germinatif et aux cellules plasmiques de la moelle osseuse (454). BCMA semble aussi jouer un rôle dans la régulation des cellules T-helper folliculaires et dans l'accroissement de la présentation antigénique par les cellules B matures (455), indiquant sa participation dans le maintien de la réponse humorale. Finalement, BCMA ne semble pas être impliqué dans le développement et la survie des cellules B, puisque les cellules B des souris BCMA KO ont un développement normal et une bonne réponse humorale aux antigènes (452; 456; 457).

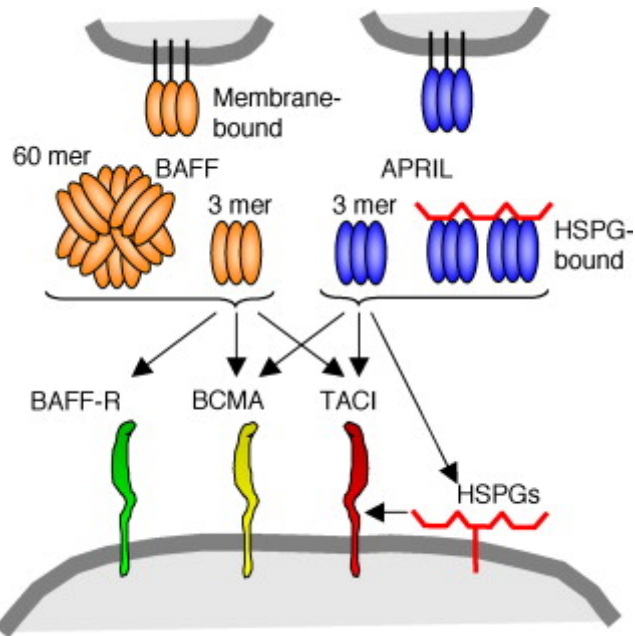


Figure 6. Formes existantes de BAFF et de APRIL et leurs récepteurs respectifs (458). Cette figure démontre les différentes formes de BAFF et APRIL ainsi que les récepteurs pour lesquels ces formes ont une affinité.

5.3. Fonction de BAFF

En premier lieu, BAFF joue un rôle crucial dans la sélection, la maturation et la survie des lymphocytes B de la zone marginale (459). L'importance de ce rôle fut mise en lumière par plusieurs publications, dont celle de Schiemann et coll. qui illustre qu'en absence de BAFF, les souris étudiées démontrent une perte de lymphocytes T folliculaires et B MZ (456). Chez la souris ainsi que chez l'humain, l'activation des molécules BCR et TLR par un antigène active les cellules B MZ via TACI, un des récepteurs de BAFF. Comme décrit plus haut, TACI, avec l'aide de TLRs, induit une CSR et la production d'anticorps (152).

BAFF semble promouvoir la commutation de classe des immunoglobulines puisque des souris BAFF transgéniques démontrent une augmentation d'Ig dans le sérum (460), tandis que des souris BAFF KO démontrent une diminution de niveaux d'Ig (461). Cerutti a aussi démontré que BAFF a un effet direct sur la CSR des Ig via TACI (462). BAFF pourrait avoir effet directement sur les cellules B, ou indirectement en incitant les cellules

B à produire des cytokines telles IL-10 et IL-4 qui mènent à la commutation d'IgG et d'IgA, ainsi qu'à IgE respectivement (375; 463; 464).

BAFF a aussi un effet sur l'activation des cellules T, démontré par une accumulation de cellules T activées chez les souris BAFF Tg (460). BAFF livre des signaux co-stimulants aux cellules T menant à la sécrétion d'IL-2 et à la division des cellules T ainsi qu'à une faible stimulation de TCR (462). BAFF peut aussi promouvoir la différenciation des cellules T en cellules effectrices L-selectin^{lo}/CD44^{hi}, polariser les cellules T vers un phénotype Th1 et être produit lui-même par des cellules T activées dont les cellules Tfh du centre germinatif, menant à une augmentation de l'expression de BAFF-R (428).

Plusieurs effets de BAFF sont observés chez les monocytes et les DC. Cette molécule favorise l'activation et la différenciation des monocytes, menant à la production de cytokines inflammatoires dont IL-6 (465) et augmente l'expression de molécules co-stimulantes à la surface de DC dérivées de monocytes humains. BAFF mène à la sécrétion de plusieurs autres cytokines et chimiokines tel IL-8, MCP-1, CXCL-1, CCL-5 et TNF α (466), et la prolifération de cellules T CD4⁺ est plus importante en présence de DC stimulées par BAFF (462). De plus, les DC stimulées par BAFF sécrètent plus d'IL-12p70, une cytokine menant à la production de cellules T Th1 (466). Ces divers effets de BAFF suggèrent une régulation du système immunitaire adaptatif par la promotion de la maturation et des fonctions innées des DC (462).

5.3.1. Survie des cellules B

En diminuant l'expression de molécules pro-apoptotiques tel Bak, Blk et Bim et en augmentant l'expression de molécules anti-apoptotiques tel Al, bcl-2, bcl-xL et Mcl-1, BAFF augmente la prolifération et la sécrétion d'immunoglobulines des cellules B activées par leur BCR (385; 453; 467; 468; 469; 470). Par contre, BAFF semble seulement avoir cet effet chez les cellules B transitoires et matures (467; 471), les récepteurs de BAFF n'étant pas exprimés chez les cellules pro-B et pré-B (467; 472). Les premiers récepteurs de BAFF se développent au stade transitionnel des cellules B et celles-ci peuvent recevoir

des signaux de BAFF jusqu'à ce qu'elles se différencient en cellules plasmiques (473). Ainsi, BAFF provenant de cellules Tfh (474) et une activation du BCR aident à la sélection positive de cellules B transitoires, à leur maturation (467; 475), et à la survie des clones de cellules B à haute affinité.

5.4. Implications dans l'auto-immunité

5.4.1. Inflammation causée par un excès de BAFF

Lors d'un stimulus inflammatoire, les cellules épithéliales ou hématopoïétiques de la région affectée génèrent une réponse inflammatoire via NFκB (476). En réponse à l'activation d'NFκB, il y a augmentation d'expression d'adhésines et de chimiokines par les cellules endothéliales et subséquemment recrutement et activation de cellules effectrices (462). Une augmentation de la production de molécules antimicrobiennes et de la survie de cellules immunes sont aussi associées à l'activation de NFκB (476).

La famille de facteurs de transcription NFκB peut être activée de façon canonique ou non de plusieurs manières dont par de cytokines pro-inflammatoires, des PAMPs, des ligands associés aux cellules, et des stress physiques (385). Il a été démontré que chez les cellules lymphoïdes (477; 478) et myéloïdes (465), les cascades d'activation canoniques et non canoniques peuvent être déclenchées par BAFF. En fait, l'activation de la cascade non canonique s'agit d'un aspect majeur de la signalisation de BAFF chez les cellules B. Cette cascade implique les 3 récepteurs de BAFF dont BCMA, TACI et BAFF-R et mène au recrutement des protéines *TNF receptor-associated factor* (TRAF) capables de se lier directement ou indirectement à plusieurs membres de la famille de récepteurs TNF (477; 479); (462). Une fois liées à leur récepteur, les protéines TRAF activent NIK (477; 479).

TRAF3 est une molécule capable d'inhiber l'activation non canonique d'NFκB en dégradant NIK après s'être liée à BAFF-R (480; 481). Lorsque BAFF se lie à BAFF-R, il cause la protéolyse de TRAF3 et ainsi une accumulation de NIK menant à l'activation non canonique d'NFκB (462). BAFF peut aussi mener à l'activation non canonique d'NFκB en se liant à BCMA (482; 483). Moins importante que l'activation non canonique, l'activation

canonique peut aussi être activée par BAFF via TRAF6 libérant des hétérodimères de RelA(p65) /NFkB1(p50) (484).

Comme mentionné dans les sections précédentes, BAFF mène à la production de cellules T Th1 via des DC exprimant BAFF et donc à la production de cytokines pro-inflammatoires (485). La surexpression de BAFF peut aussi mener à la production de cellules T Th17 comme il a été observé chez les souris BAFF tg (486). L'augmentation de cellules T Th17 mène ensuite à une surexpression d'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire (487). La souris BAFF tg développe aussi des symptômes de maladies auto-immunes tel SLE (460; 488) due à l'augmentation de signaux de survie aux cellules B autoréactives. D'autre part, BAFF via TACI mène à l'activation des *nuclear factors of activated T cells 2 et 1* (NFATC2 et NFATC1) (489). Ces molécules, régulées par la phosphatase calcineurine (490), ont plusieurs rôles dont la régulation de la réponse immune des cellules T en activant la transcription d'IL-2 (491; 492). Elles modulent plusieurs molécules impliquées dans la régulation de l'expression de cellules T tel IL-3 (493) et TNF α (494). La transcription d'IFN γ et d'IL-4, cytokines polarisantes responsables de la différenciation des cellules T Th1 et Th2 est aussi régulée par NFATC1 (495; 496). Chez la souris portant un mutant de NFATC1 (NFATc1^{nu}), une amplification de la réponse inflammatoire globale est observée et accompagnée d'une activation des cellules T et d'une surproduction de cytokines par les cellules T Th1 et Th2 (497). Finalement, une augmentation de la transcription de BAFF est enclenchée par NFATC2 et NFATC1, créant une boucle de rétroaction positive (498).

L'implication de BAFF dans l'auto-immunité est aussi solidifiée par les niveaux élevés retrouvés dans le sérum de gens souffrant de maladies auto-immunes, dont SLE, le syndrome de Sjogren et l'arthrite rhumatoïde (499; 500). De plus, la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires est accompagnée de hauts niveaux de BAFF dans des tissus cibles. La muqueuse de patients atteints de gastrite chronique avec présence d'*Helicobacter pylori* est enrichie de BAFF et d'IL-17 tandis que ces molécules sont très peu exprimées chez un patient atteint de gastrite chronique sans présence d'*H. pylori*. Dans ce contexte, les macrophages produits après stimulation par *H. pylori* sécrètent BAFF qui

favorise la sécrétion de cytokines pro-Th17 dont IL-23, IL-1B et TGFB. Il y a donc production indirecte de cellules T Th17 due au milieu et production directe par la différenciation de cellules T naïves en cellules Th17 (501). Plusieurs polyorphismes de BAFF existent, un ayant déjà été lié avec le développement de la maladie de Basedow, maladie auto-immune, dans une population taiwanaise (502), et un autre ayant été lié avec SLE chez les Égyptiens (503).

Des traitements anti-BAFF existent déjà pour le traitement de maladies auto-immunes dont belimumab et ataccept, et de nombreux essais cliniques ont été faits pour ces médicaments dans le contexte de plusieurs maladies auto-immunes. Ces traitements ont été approuvés par la FDA pour le traitement de SLE, mais un essai clinique démontre que ces composés ont un effet moindre chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Une différente étude sur ataccept démontre que ce dernier a peu d'effet chez les patients atteints de la sclérose en plaques. Chez l'humain, le blocage de BAFF mène à une diminution des fréquences de cellules B naïves et transitionnelles tandis que les cellules B mémoires permutées et les cellules plasmatiques de longue durée sont peu affectées. Lorsque BAFF seul est bloqué, les niveaux d'Ig, dont IgM, du sérum sont moins affectés que lorsque BAFF et APRIL sont tous deux bloqués (504).

5.5. Implication dans le VIH

Dans le contexte du VIH, BAFF favorise l'activation polyclonale des cellules B produisant des Ig menant à une hyperglobulinémie et à la réponse des IgG et IgA à plusieurs protéines du VIH dont des protéines de l'enveloppe (Env) gp41 et gp120, et des protéines structurales (Gag) p17 et p24 (329). Au contraire, l'infection mène aussi à une commutation de classe non spécifique d'IgM à IgG, IgA et IgE (324). Lors de la progression de l'infection, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ mène à une déféctuosité du mécanisme de commutation de classe des Ig, mais cette déféctuosité n'affecte que les Ig ayant une réponse aux protéines structurales (106; 505). La réponse non spécifique et spécifique à l'enveloppe des Ig demeure intacte (505). Ces observations démontrent que le VIH pourrait induire la commutation de classe des Ig indépendamment des lymphocytes T CD4⁺, et donc indépendamment de CD40L. En fait, l'accumulation de Env dans les

follicules lymphatiques peut activer les cellules B sans l'aide de cellules T CD4⁺ (506). Une fois lié à un macrophage, un monocyte ou une DC, Env est capable de livrer des signaux au travers DC-SIGN, *mannose receptor* (MR) et *langerin*, trois *DC-associated* MCLRs qui se lient à des saccharides de mannose de la portion glycosylée de gp120 (507; 508). L'activation par gp120 mène en la commutation de classe des IgG, IgA et IgE via TACI (158). Cette réponse peut ensuite être rehaussée par BAFF, produit en excès dû à la stimulation de monocytes et de macrophages par Env résultant en une plus grande production d'IFN α et d'IL-10, cytokines menant à la production de BAFF, qui augmente encore plus la production d'IL-10 (176; 375; 509). Les niveaux de LPS contribuent aussi au profil inflammatoire des patients progressifs en modulant BAFF (510). Une étude de notre équipe démontre que le LPS agit en synergie avec Nef, menant à une production de BAFF encore plus importante que Nef seule (511). Des niveaux élevés de BAFF sont aussi associés à la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et à la progression de la maladie (512), renforçant ces propos. L'implication de BAFF dans la commutation de classe des Ig, la différenciation plasmacytoïde menant à la sécrétion d'anticorps indépendamment de CD40 (18) pourraient contribuer à la pathogenèse de l'hypergammaglobulinémie, de l'auto-immunité et du syndrome hyper-IgE (maladie immunitaire caractérisée par l'eczéma, des abcès cutanés à Staphylocoque, des infections pulmonaires et des hauts niveaux d'IgE) chez les individus infectés avec peu de cellules T CD4⁺ (324). BAFF contribuerait au syndrome hyper-IgE en incitant les cellules B à produire des cytokines telles IL-10 et IL-4 qui mènent à la commutation d'IgG et d'IgA, ainsi qu'à IgE respectivement. De plus, en présence de gp120 et de BAFF, les cellules B exprimant les MCLRs augmentent leur expression d'AID, une enzyme qui favorise la translocation chromosomique oncogène. AID encourage le développement de lymphomes en jouant un rôle dans la CSR et la SHM (176; 375; 513).

Les cellules affectées par ce mécanisme ressemblent aux cellules B MZ ainsi qu'aux cellules sous-épithéliales, l'équivalent des cellules B MZ dans les organes lymphoïdes secondaires telles les amygdales, puisqu'elles sont IgM⁺IgD⁺CD1c⁺CD21^{hi}CD27⁺ (359; 411). Effectivement, des lymphocytes B IgD⁺ exprimant DC-SIGN, MR et *langerin* ont été retrouvées dans la région sous-épithéliale des

amygdales et la zone marginale de la rate (285). De plus, ces cellules augmentent leur expression de DC-SIGN, MR et langerin lorsqu'elles sont stimulées par BAFF, amplifiant l'activation polyclonale des IgG, IgA et IgE (285).

6. Modèle murin VIH transgénique

La souris VIH-Tg exprime les régions codantes pour les protéines Rev, Env, ou Nef du VIH-1 sous le contrôle d'un promoteur humain de CD4 (514; 515; 516). Ces souris développent une maladie dépendante de Nef comparable au SIDA chez l'humain (514; 515). Elles présentent une augmentation de lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques et la rate, cette dernière ayant expansion de la zone marginale (514; 515; 517). Une hyperglobulinémie, une accumulation d'autoanticorps dsDNA dans le sérum et une hyper-réactivité spontanée *in vitro* démontrent une activation polyclonale des cellules B (517). Il a été démontré que l'accumulation de mDC aux points d'entrée des organes lymphoïdes secondaires mène à l'activation polyclonale et le bris de tolérance des cellules B, ainsi qu'à la prolifération de la population de cellules B MZ (517; 518). Ces souris VIH-Tg démontrent aussi une augmentation de la fréquence de BAFF dans le sérum.

Chez les souris BAFF transgéniques, de hauts niveaux de BAFF sont accompagnés d'une augmentation de lymphocytes B matures, et peuvent mener à de maladies auto-immunes progressives (460). Ces souris développent le syndrome de Sjögren avec une expansion du compartiment de cellules B et des organes lymphoïdes et une hyperglobulinémie (460). Elles démontrent aussi une expansion de leurs zones marginales, une hyperactivité des cellules B et une diminution de fréquence des cellules T (460; 514; 517; 518). Leur phénotype rappelle celui de la souris VIH transgénique, chose sensée vu l'implication de BAFF dans l'activation polyclonale médiée par la gp120 chez l'humain (285), et l'augmentation de BAFF dans le sang périphérique des individus atteints du VIH (519; 520). Il a aussi été démontré qu'une haute concentration sanguine de cette molécule corrèle avec une haute concentration d'auto-anticorps dans le sérum (512).

Les études réalisées préalablement par les membres de notre équipe de recherche ont mené aux questions au centre de mes travaux. Un résultat clé fut celui du RNAseq

(Raphaëlle Lambert, analyse par Patrick Gendron, purification d'ADN par Josiane Chagnon-Choquet, IRIC) de cellules B de la zone marginale matures et précurseurs de patients sains, de patients atteints du VIH et d'élite contrôleurs (figure 7).

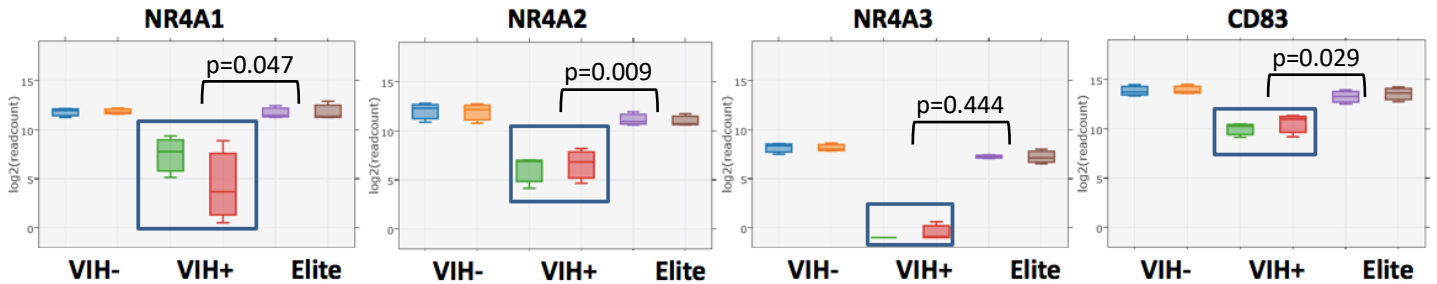


Figure 7. Expression des NR4As et de CD83 chez les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs d'individus VIH⁻, VIH⁺ et élites contrôleurs (Doyon-Laliberté et al; en préparation). Les VIH⁺ sont des progressateurs classiques infectés depuis 5-8 mois. Chaque groupe comporte 3 patients.

Hypothèse

Les résultats observés dans le RNAseq de la figure 7 furent la diminution de l'expression des gènes NR4A1-3 dans les cellules B MZ matures et précurseurs des patients atteints du VIH comparé aux patients sains et aux élites contrôleurs. Une diminution d'expression de CD83 fut aussi observée chez les cellules de ces mêmes patients VIH⁺ comparativement aux patients sains et aux élites contrôleurs, chose sensée puisque la littérature suggère que les NR4As jouent un rôle dans l'expression de ces molécules (521).

Plusieurs facteurs ont mené à la formulation de notre hypothèse. D'abord, les résultats du RNAseq démontrant la diminution d'expression des NR4As et de CD83 chez les patients progresseurs ainsi que les observations indiquant une augmentation de BAFF chez les patients atteints du VIH comparé aux patients sains. Ensuite, les études sur les souris VIH-Tg qui démontrent l'importance de Nef sur la pathogénicité du VIH. De plus, un article récemment publié par notre équipe souligne la co-expression des NR4As 1 et 3 avec CD83 chez les cellules B MZ précurseurs. Ces cellules exprimant NR4A1 et CD83 sont majoritairement CD39⁺CD73⁺ suggérant un potentiel Breg chez ces dernières, CD39 et CD73 étant impliqué dans la synthèse de l'adénosine (201). Finalement, notre hypothèse suppose que de niveaux élevés de BAFF et de Nef contribuent à la modulation de l'expression des NR4As chez les cellules B MZ.

Objectifs

Afin de tester cette hypothèse, l'objectif principal de ce projet est d'étudier *in vitro* si des niveaux élevés de BAFF seul ou en présence de la protéine Nef du VIH agissent directement sur l'expression des NR4As au niveau de populations de cellules B MZ ainsi que dans d'autres populations de cellules B des amygdales humaines. L'impact du DHE sur l'expression des NR4As sera aussi étudié. De plus, puisque nous avons démontré que les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs jouent un rôle Breg (201), l'effet de Nef sur l'expression d'IL-10 par ces populations de cellules B d'amygdales humaines sera mesuré. L'IL-10 est ciblé puisqu'il pourrait jouer un rôle dans le développement d'un potentiel régulateur chez ces populations de cellules B.

Matériels et méthode

Récolte et préparation des échantillons

Consentement

Un consentement informé écrit fut obtenu de tous les participants de cette étude. L'étude fut menée en accord avec la déclaration d'Helsinki. Les méthodes décrites dans ce travail fut exécutées en accord avec les lignes directrices pertinentes et tous les protocoles furent approuvés par le Comité d'éthique de la recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

PBMC

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) furent isolées du sang par centrifugation sur un gradient de Ficoll, lavées et resuspendues dans un milieu de congélation (90% sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur [hi-FBS], 10% diméthylesulfoxyde [DMSO]). Ces cellules furent ensuite conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation. Le plasma et le sérum furent stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Amygdales

Les amygdales prélevées de donneurs VIH-séronégatifs atteints de conditions mineures furent coupées en morceaux et écrasées mécaniquement puis le tout fut filtré afin d'éliminer les débris des capsules. Le Percoll et le Ficoll ainsi que la digestion enzymatique ne sont pas utilisés. Les cellules d'amygdales furent ensuite lavées quelques fois afin d'éliminer les débris et globules rouges puis congelées rapidement dans l'azote.

Décongélation et mise en culture des cellules d'amygdales

Les PBMC et les cellules d'amygdales furent décongelées et lavées avec du Iscoves' Medium (IMDM, Gibco by Life Technologies, NY, USA) supplémenté avec du hi-FBS (Fetal Bovine Serum, Winsent inc, Qc, Canada) à 10%, de la Pénicilline et Streptomycine à 1% (Pen/strep, Gibco by Life Technologies, NY, USA) et du β -2mercaptoethanol à 10^{-4} M (Sigma-Aldrich). Elles furent suspendues dans du tampon d'isolation (composé de PBS

1x [Phosphate Buffered Saline, Gibco by Life Technologies, NY, USA], de 2% FBSi et 0,002 M UltraPure EDTA [Invitrogen by Life Technologies, CA, USA]) et les échantillons furent enrichis en cellules B comme décrits dans la prochaine section.

Isolation des lymphocytes B et conditions de cultures

L'isolation de cellules B de sang et d'amygdales fut réalisée à l'aide du kit Dynabeads Untouched Human B Cells (Invitrogen Life technologies, Eugene, USA) en suivant le protocole fourni avec celui-ci. Le protocole consiste en un enrichissement par sélection négative à l'aide d'une technologie immunomagnétique (Invitrogen Life technologies, Eugene, USA). Les cellules B isolées furent ensuite mises en plaque de 24 puits à une concentration de 1×10^6 cellules/mL avec l'IMDM supplémenté et incubées à 37°C pendant 3 ou 18 heures avec différentes combinaisons des traitements suivants : IMDM supplémenté, PMA/ionomycine, qui imite la voie du BCR à 2 μ L/mL (eBiosciences Cell Stimulation Cocktail 500x, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), BAFF recombinant humain à 1 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 125 ng/mL, et 250 ng/mL (R&D Systems A Biotechne Brand), Nef à 1 ng/mL (NIH AIDS Reagent Program), et 1000 ng/mL, Δ Nef à 1000 ng/mL (NIH AIDS Reagent Program), et DHE à 1 mM et à 10 mM (Toronto Research Chemicals). Le réactif Δ Nef est un Nef muté inactivé qui permet de valider l'effet de Nef. Le Nef utilisé a été purifié de LPS par filtration afin d'isoler son effet.

Marquage extracellulaire et intracellulaire

Afin de marquer les cellules mortes pour les exclure de nos analyses, les cellules furent marquées avec AQUA Live/Dead Fixable (Invitrogen Life Technologies, Eugene, USA) dans du PBS. Par la suite, les sites de liaison d'Ig non spécifiques furent bloqués par incubation de 10 minutes sur glace avec le tampon Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (1X PBS, 2% FBSi et 0,1% azoture de sodium) supplémenté de FBSi à 20% et de 10 μ g d'IgG provenant de la souris (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) par 10^6 cellules. Les cellules furent ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux souris anti-humains conjugués à un fluorochrome: APC anti-CD19, Alexa Fluor700 anti-CD27, BB515 anti-IgM, PE anti-CD21, BV421 anti-CD10, BUV395 anti-CD73, BV786 anti-CD39, PE-Cy7

anti-CD83, BUV395 anti-IgM (BD Biosciences), PerCP-eFluor 710 anti-CD1c (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA). Le marquage intranucléaire fut effectué à l'aide du Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen eBiosciences). Les cellules furent perméabilisées, les sites de liaison d'Ig non spécifiques furent bloqués en incubant avec du hi-FBS à 30% et du FC block ([5 μ L/10⁶ cellules] Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA) 30 minutes et les cellules furent marquées avec un anticorps humain anti-souris anti-NR4A1 PE (Miltenyi Biotec), un anticorps souris anti-humain NR4A3 PE (Santa Cruz Biotechnology), ou un contrôle isotypique. L'anticorps humain anti-souris anti-NR4A1 PE fut préalablement testé chez la souris et ensuite chez l'humain avec ou sans activation par PMA/ionomycine (eBioscience Cell Stimulation Cocktail 500x, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) qui augmente l'expression des NR4As afin de s'assurer de leur fonctionnalité. Cet effet est démontré dans les figures supplémentaires de notre article (201). Après une incubation de 3 heures avec PMA/ionomycine, les lymphocytes B démontrent bel et bien une augmentation d'expression de NR4A1. Les cellules furent fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 1,25 % et stockées à 4°C pour un minimum de 12 heures avant l'analyse par cytométrie en flux (FACS). Un minimum de 10⁴ évènements furent acquis par échantillon avec le FACS LSR IIB (BD Biosciences) et analysés avec le logiciel FlowJo7.6.3 (TreeStar, Ashland, OR, USA). Tous les marquages aux anticorps furent comparés à la valeur de leurs contrôles isotypiques et valeurs *fluorescence minus one* (FMO). Des CompBeads anti-souris Ig (κ) furent utilisées afin d'optimiser les paramètres de compensation de fluorescence du LSR IIB. Différents fluorochromes furent utilisés afin de voir la proportion des différentes populations (voir ci-haut) ainsi que l'efficacité de l'enrichissement des lymphocytes B. Pour vérifier l'enrichissement des lymphocytes B et les proportions des différentes populations, nous avons utilisé les marqueurs : BV605 anti-CD19 (BD Biosciences), APC anti-CD56 (eBiosciences, San Jose, CA, USA), Alexa Fluor700 anti-CD3 (Cedarlane, eBiosciences) et PE-Cy7 anti-CD66b (Cedarlane, eBiosciences). Les autres populations furent vérifiées par l'absence de ces marqueurs et avec FSC et SSC.

Détection de Nef dans les lymphocytes B

Les lymphocytes B des PBMC et des cellules d'amygdales furent enrichies et incubés à 37°C pendant 1 heure avec différentes combinaisons des traitements suivants : IMDM supplémenté, BAFF 50 ng/mL et Nef 1000 ng/mL. Le marquage extracellulaire commençant par l'exclusion live/dead fut effectué comme décrits ci-dessus puis les cellules furent marquées avec les anticorps énumérés plus haut sauf BB515 anti-IgM (BD Bioscience) et le BUV395 anti-CD73 (BD Bioscience) qui furent remplacé par BUV anti-IgM pendant le marquage extracellulaire et FITC anti-Nef (Cedarlane, Biobyte) pendant le marquage intracellulaire. Le marquage intracytoplasmique fut effectué à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization et du tampon perm/wash BD 1X (BD Biosciences). Les cellules furent fixées et perméabilisées puis les sites de liaison d'Ig non spécifiques furent bloqués par incubation sur glace 10 minutes avec du FC-block (BD Biosciences). Les cellules furent ensuite marquées avec FITC anti-Nef puis fixées dans du PFA 1,25%. Les cellules marquées furent comparées à la valeur de leur contrôle isotypique et FMO. Un minimum de 10^4 évènements furent acquis par échantillon par FACS et l'analyse fut effectuée comme décrits ci-dessus.

Détection d'IL-10 dans les amygdales

Les lymphocytes B des cellules d'amygdales furent isolées et incubés à 37°C pendant 16 heures avec une combinaison d'IMDM supplémenté, de BAFF à 250 ng/mL et de Nef à 1000 ng/mL, les derniers 4 heures avec de la Brefeldin A à 0,5 μ L/ 10^6 cellules (BD Biosciences). Les cellules furent récoltées et le marquage extracellulaire fut fait comme décrits plus haut avec les anticorps habituels (cocktail identifié ci-dessus). Ce dernier fut suivi d'un marquage intracytoplasmique effectué avec le kit Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization et du tampon perm/wash BD 1X (BD Biosciences) où les cellules furent fixées, perméabilisées, les sites de liaison d'Ig non spécifiques furent bloqués avec de l'IgG provenant du rat puis les cellules furent marquées avec l'anticorps de rat anti-IL-10 humain (Biolegend). Les cellules furent fixées dans du PFA 1,25% et comparées à la valeur de leur contrôle isotypique et FMO. Un minimum de 10^4 évènements furent acquis par échantillon par FACS et l'analyse fut effectuée comme décrits ci-dessus.

Analyses statistiques

La significativité des données a été déterminée par le test de Student. Les analyses furent faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.00 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Résultats

Notre projet devait débuter par une étude exploratoire des cellules d'amygdales. Les cellules mortes et les doublets furent éliminés puis le pourcentage de différents marqueurs distinguant les populations d'intérêts fut étudié. Sans enrichissement, les cellules d'amygdales sont déjà constituées en grande majorité de lymphocytes B (70,7%), suivi de lymphocytes T (29,3%). Ensuite, de petites populations de cellules NK et de granulocytes furent aussi observées. Des DC constituent aussi l'échantillon d'amygdales non enrichi selon des tests effectués par mes collègues.

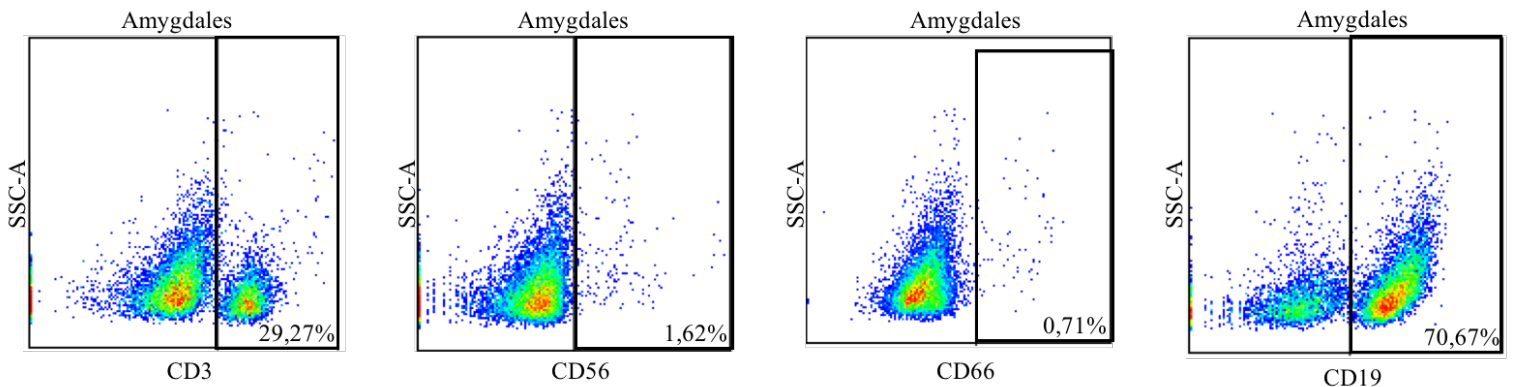
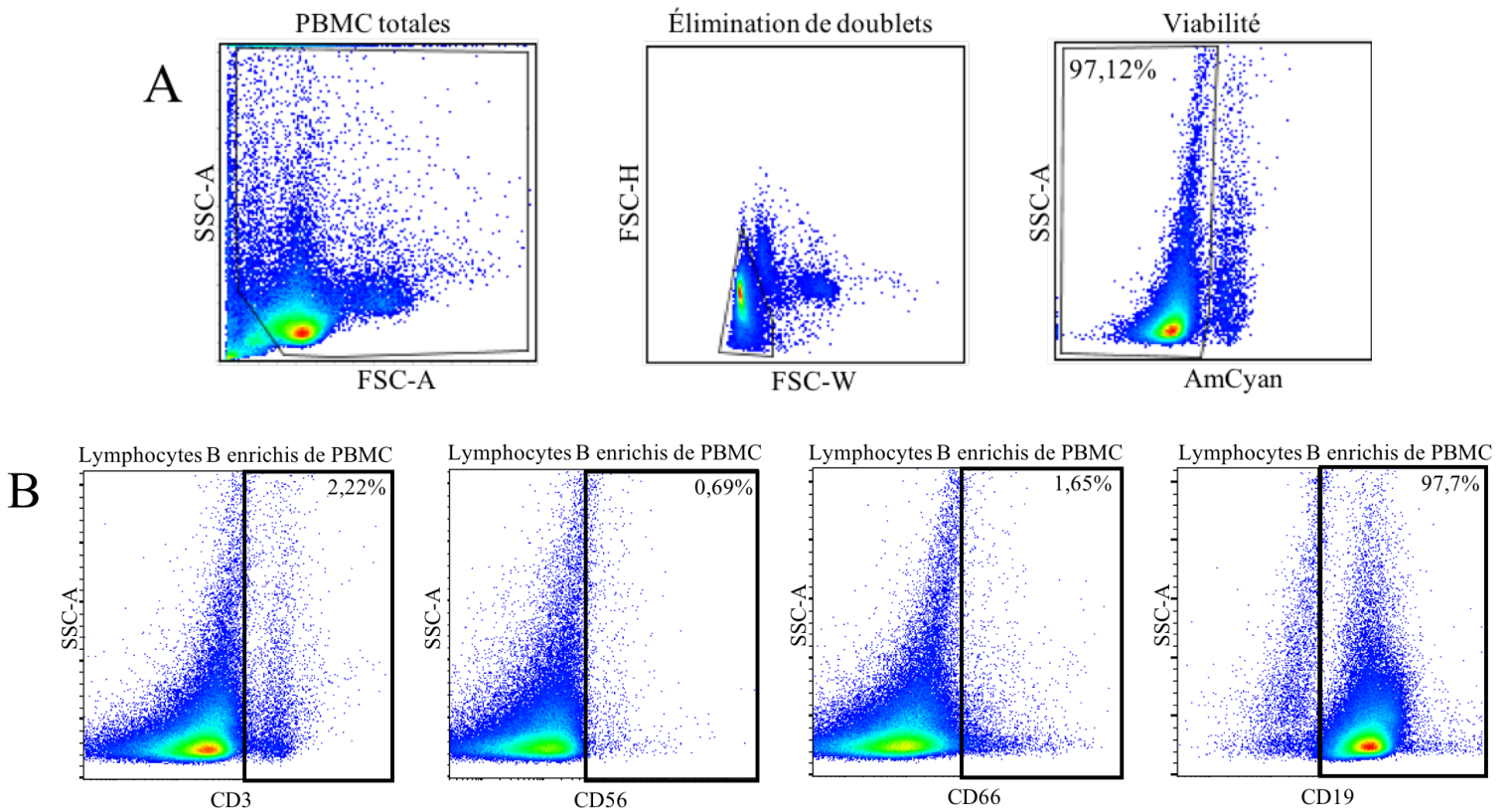


Figure 8. Populations retrouvées dans les cellules d'amygdales non isolées. Les cellules T furent distinguées par le marqueur Alexa Fluor700 anti-CD3 (Cedarlane, eBiosciences), les cellules NK par le marqueur APC anti-CD56 (eBiosciences, San Jose, CA, USA), les granulocytes par le marqueur PE-Cy7 anti-CD66b (Cedarlane, eBiosciences), et les cellules B par le marqueur BV605 anti-CD19 (BD Biosciences). Avec ce marquage, les cellules myéloïdes sont $CD3^{-}CD56^{-}CD66b^{-}CD19^{-}$ et $SSC^{hi}FSC^{hi}$. Cette expérience fut répétée 2 fois avec 2 différents donneurs afin d'obtenir une vue globale de la distribution des populations dans les cellules d'amygdales.

Ensuite, nous avons enrichi les lymphocytes B de PBMC et de cellules d'amygdales afin de comparer la distribution des populations chez celles-ci. Les figures 9B et 10B démontrent l'efficacité de l'enrichissement de lymphocytes B, avec des traces de lymphocytes T, de cellules NK et de cellules myéloïdes restantes. En observant les figures 9C et 10C, nous pouvons noter que les cellules B d'amygdales humaines contiennent

presque 4 fois plus de cellules $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ (16,2 %) que les PBMC (4,7 %). Elles contiennent aussi plus de cellules B MZ ($\text{IgM}^+\text{CD27}^+\text{CD1c}^+$) (15%) et MZ précurseurs ($\text{IgM}^+\text{CD27}^+\text{CD1c}^+\text{CD10}^+$) (10 %) que les cellules B des PBMC (3,7 % et 1,4 %, respectivement). Finalement, les figures 10D et 10E nous démontre que l'expression de NR4A1 et de CD83 est beaucoup plus importante chez les cellules B MZ et MZ précurseurs comparativement aux cellules B totales.



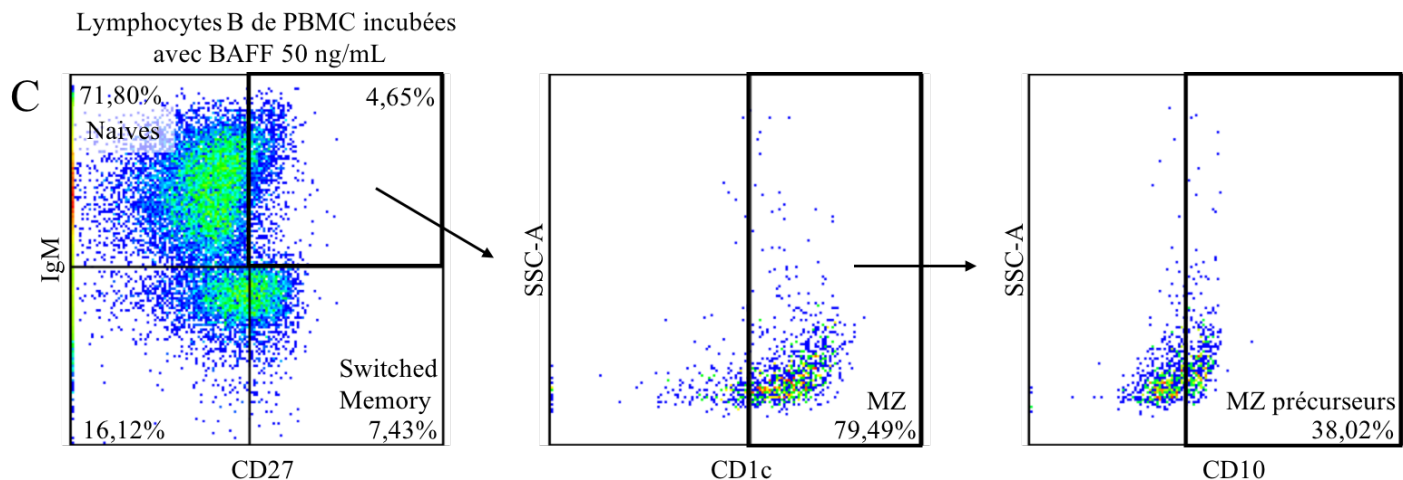
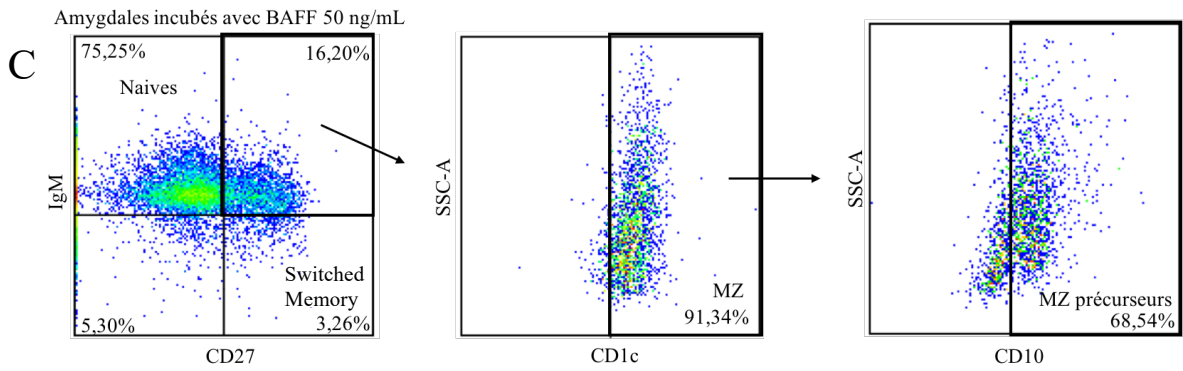
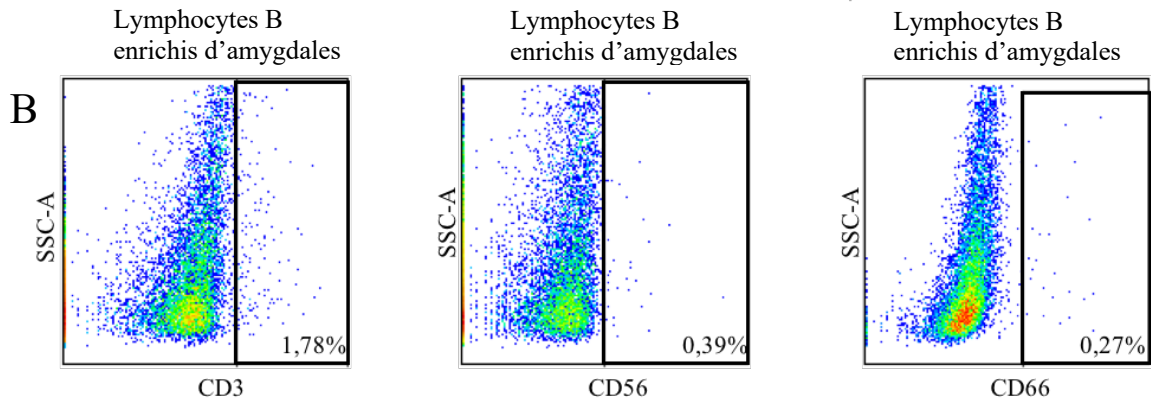
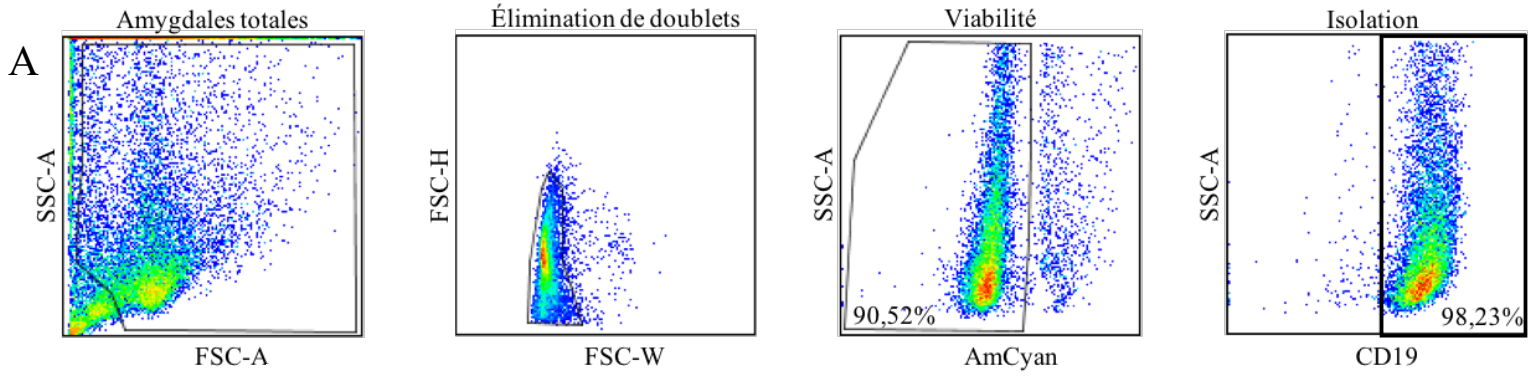


Figure 9. Efficacité de l'enrichissement de lymphocytes B chez les PBMC. Les doublets et les cellules mortes furent éliminés (figure 9A) puis le pourcentage de différents marqueurs distinguant les populations d'intérêts fut étudié. Les cellules T furent distinguées par le marqueur Alexa Fluor700 anti-CD3 (Cedarlane, eBiosciences), les cellules NK par le marqueur APC anti-CD56 (eBiosciences, San Jose, CA, USA), les granulocytes par le marqueur PE-Cy7 anti-CD66b (Cedarlane, eBiosciences), et les cellules B par le marqueur BV605 anti-CD19 (BD Biosciences). Les cellules de la zone marginale furent ciblées avec les marqueurs Alexa Fluor700 anti-CD27 (BD Biosciences), BB515 anti-IgM (BD Bioscience), PerCP-eFluor 710 anti-CD1c (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA) puis, à partir de cette population, les cellules précurseurs de la zone marginale furent ciblées avec BV421 anti-CD10 (BD Bioscience). L'enrichissement des lymphocytes B fut répété 3 fois avec 3 différents donneurs. Les puits où les cellules étaient incubées en milieu seul étaient aussi utilisés pour marquer les FMOs, donc les puits avec BAFF contenaient généralement plus de cellules, rendant la visualisation des populations plus facile.



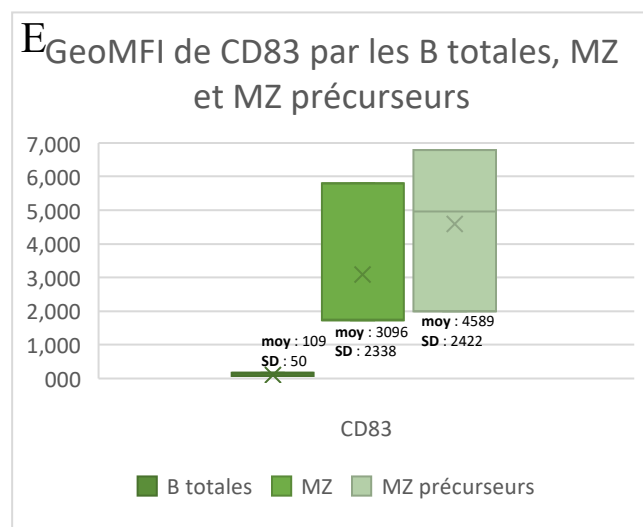
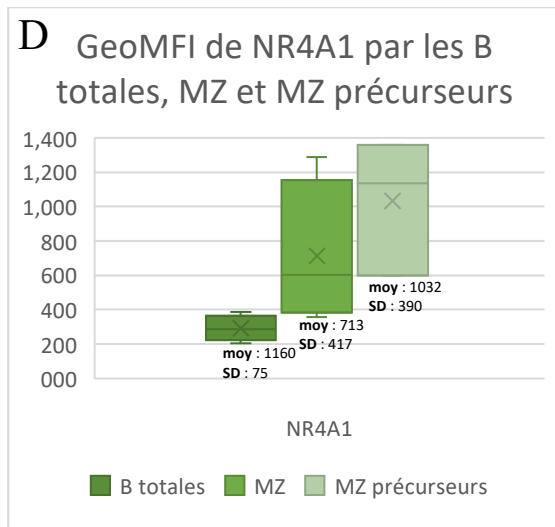


Figure 10. Efficacité de l'enrichissement de lymphocytes B chez les cellules d'amygdales. Analyse par cytométrie en flux où les doublets et les cellules mortes furent éliminés (figure 10A) puis les pourcentages de différents marqueurs distinguant les populations d'intérêts furent étudiés. Les cellules T furent distinguées par le marqueur Alexa Fluor700 anti-CD3 (Cedarlane, eBiosciences), les cellules NK par le marqueur APC anti-CD56 (ebiosciences, San Jose, CA, USA), les granyocytes par le marqueur PE-Cy7 anti-CD66b (Cedarlane, eBiosciences), et les cellules B par le marqueur BV605 anti-CD19 (BD Biosciences). Les cellules de la zone marginale furent ciblées avec les marqueurs Alexa Fluor700 anti-CD27 (BD Biosciences), BB515 anti-IgM (BD Bioscience), PerCP-eFluor 710 anti-CD1c (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA) puis, à partir de cette population, les cellules précurseurs de la zone marginale furent ciblées avec BV421 anti-CD10 (BD Bioscience). Les figures 10D et 10E démontrent l'intensité d'expression (GeoMFI) de NR4A1 et CD83 de 3 différentes expériences chez les cellules B totales, les MZ et les MZ précurseurs après incubation en milieu seul, ainsi que les moyennes et les déviations standards associées. L'isolation de lymphocytes B (figures 10A-C) fut répétée 22 fois avec 6 différents donneurs.

Il est important de noter que les résultats obtenus avec les échantillons d'amygdales lors de cette étude dépendant grandement des niveaux de base de BAFF chez les donneurs. Un collègue en fut l'étude et réalisa la figure 11 avec ses résultats. Les échantillons

d'amygdales des 4 donneurs de la figure 11 furent utilisés pour divers expériences lors de ce projet. On observe une variation importante entre l'intensité d'expression de BAFF chez ces donneurs.

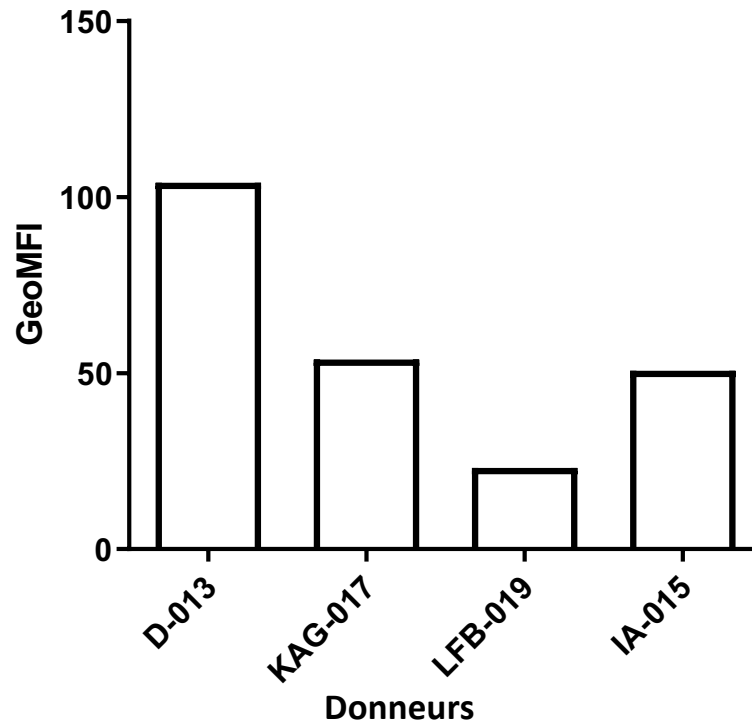


Figure 11. Niveaux de BAFF dans les amygdales de chacun des donneurs utilisées lors de cette étude. Les cellules d'amygdales totales des différents donneurs furent marquées et triées au FACs afin de déterminer l'intensité d'expression (GeoMFI) de BAFF de chacun. Les doublets et les cellules mortes furent éliminées avant l'analyse. Ce test fut fait une fois avec 4 différents donneurs. La significativité de ces résultats est encore à déterminer, puisque ce test n'a été effectué qu'une fois.

Après avoir terminé l'exploration de base des cellules d'amygdales, nous avons observé l'expression de différentes molécules par ces lymphocytes en présence ou en absence de BAFF recombinant humain, facteur de différenciation et de survie des cellules B, et de Nef recombinant, protéine accessoire du VIH. Les concentrations de BAFF utilisées furent déterminées en partie à l'aide d'articles publiés par Dr Andrea Cerutti qui utilise souvent BAFF à des concentrations variant de 100 à 500 ng/mL (373; 522). De plus, Dr Cerutti utilise Nef à des concentrations de 1 ng/mL jusqu'à 1000 ng/mL (40). Après

avoir testé l'effet de ces deux concentrations, nous avons décidé de poursuivre nos expériences avec une concentration de Nef de 1000 ng/mL. Il est important de noter que chez les individus infectés au VIH, les concentrations physiologiques de Nef mesurées dans le sérum varient entre 1 et 10 ng/mL (523), mais les concentrations réelles de Nef sont difficiles à anticiper. En effet, Nef est aussi relargué dans des microvésicules et est détecté dans certaines populations circulantes, telles les mDCs (523) et les concentrations de Nef dans les tissus et les structures lymphoïdes tels les centres germinatifs risquent d'être beaucoup plus élevées. Le même raisonnement s'applique pour les concentrations physiologiques de BAFF.

La figure 12A nous démontre qu'une concentration de BAFF de 50 ng/mL engendre une plus grande expression de CD83, NR4A1 et CD73 chez les lymphocytes B d'amygdales comparativement à une concentration de BAFF de 1 ng/mL. Nous voulions ensuite voir l'effet d'une incubation avec BAFF en présence de Nef sur l'expression de NR4A1 par les lymphocytes B. La figure 12B illustre qu'après une incubation avec BAFF 250 ng/mL et Nef 1000 ng/mL, le pourcentage et le GeoMFI de NR4A1 diminuent comparativement au milieu seul tandis que les cellules incubées avec BAFF 50 ng/mL et Nef 1000 ng/mL démontrent une plus grande expression de NR4A1 que les cellules du milieu seul. Lors des incubations avec Nef seul ou avec Δ Nef, les niveaux de NR4A1 obtenus étaient similaires aux niveaux obtenus en milieu seul.

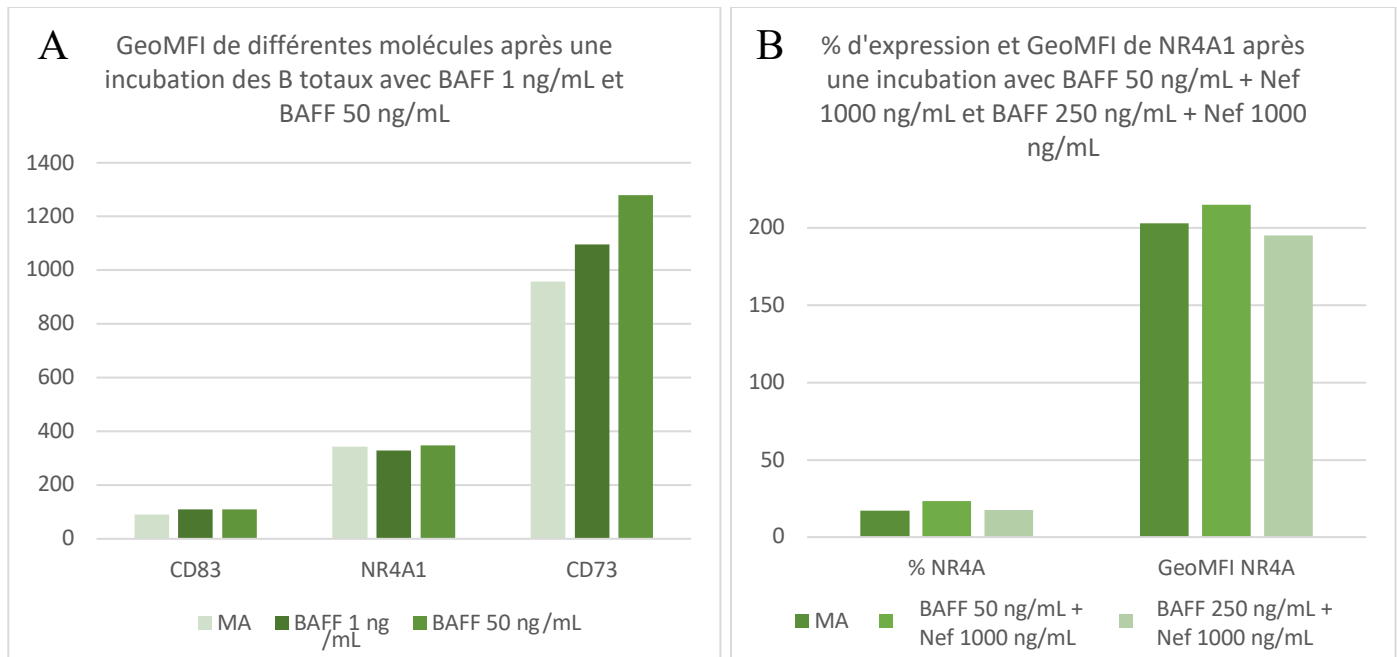


Figure 12. Culture de lymphocytes B d'amygdales avec différentes concentrations de BAFF recombinant en présence ou en absence de Nef. A) Les cellules mortes et les doublets furent éliminés puis les intensités d'expression (GeoMFI) des marqueurs d'intérêts furent étudiés suivant une incubation de 16 h en milieu seul (MA), ou avec BAFF 1 ng/mL ou BAFF 50 ng/mL. Les marqueurs utilisés sont BUV395 anti-CD73 (BD Bioscience), PE-Cy7 anti-CD83 (BD Bioscience) et PE anti-NR4A1 (Miltenyi Biotec). (B) Le même processus d'analyse a été fait mais cette fois-ci l'incubation est de 3 h et les traitements utilisés sont BAFF 50 ng/mL ou BAFF 250 ng/mL avec Nef 1000 ng/mL. Ces tests furent fait une fois chacun avec 2 différents donneurs (IA-015 et BJJC-018) donc leur significativité n'a pas encore été évaluée. Les figures A et B démontrent les résultats obtenus avec le donneur BJJC-018 puisque ceux-ci sont aussi représentatifs du donneur IA-015. Nous avons observé les effets de BAFF et de Nef à différents temps d'incubation au long de cette étude puisque NR4A1 et CD83 augmentent en expression à différentes vitesses (NR4A1 augmente plus rapidement après incubation et CD83 plus tard).

Nous avons ensuite observé l'effet de BAFF recombinant humain et de Nef recombinant sur l'expression de NR4A1, CD83, CD73 et CD39. CD73 et CD39 sont des molécules d'intérêt due à leur implication dans la synthèse de l'adénosine qui elle, joue un rôle régulateur. La modulation des NR4As par l'adénosine a aussi été démontrée. La figure

13A démontre l'augmentation du pourcentage de l'expression de CD39 par les cellules B MZ précurseurs après incubation avec BAFF 50 ng/mL avec ou sans Nef 1000 ng/mL comparé au milieu seul. Lorsque les cellules sont incubées avec BAFF seul, il y a augmentation de l'expression de CD39 tandis qu'après une incubation avec BAFF et Nef, l'expression de CD39 est plus basse comparativement à BAFF seul. Cette diminution d'expression lors de l'ajout de Nef peut aussi être observée chez le GeoMFI de CD83 et de NR4A1 des cellules B MZ précurseurs (figure 13B et 13D) et chez le pourcentage de l'expression de CD39 par les cellules B totales (figure 13C). Cette tendance où Nef diminue l'expression de certaines molécules lorsqu'ajouté à BAFF pendant l'incubation de lymphocytes B est observé dans les 4 figures, et fut observée dans d'autres expériences de notre laboratoire avec différentes concentrations de BAFF. Par contre, il y a une grande variabilité entre les résultats obtenus, possiblement due aux différents niveaux de base de BAFF chez les différents donneurs. Les niveaux d'expression obtenus après une incubation avec Nef seul demeurent similaire aux niveaux d'expression après incubation en milieu seul, mais des études supplémentaires sont nécessaires.

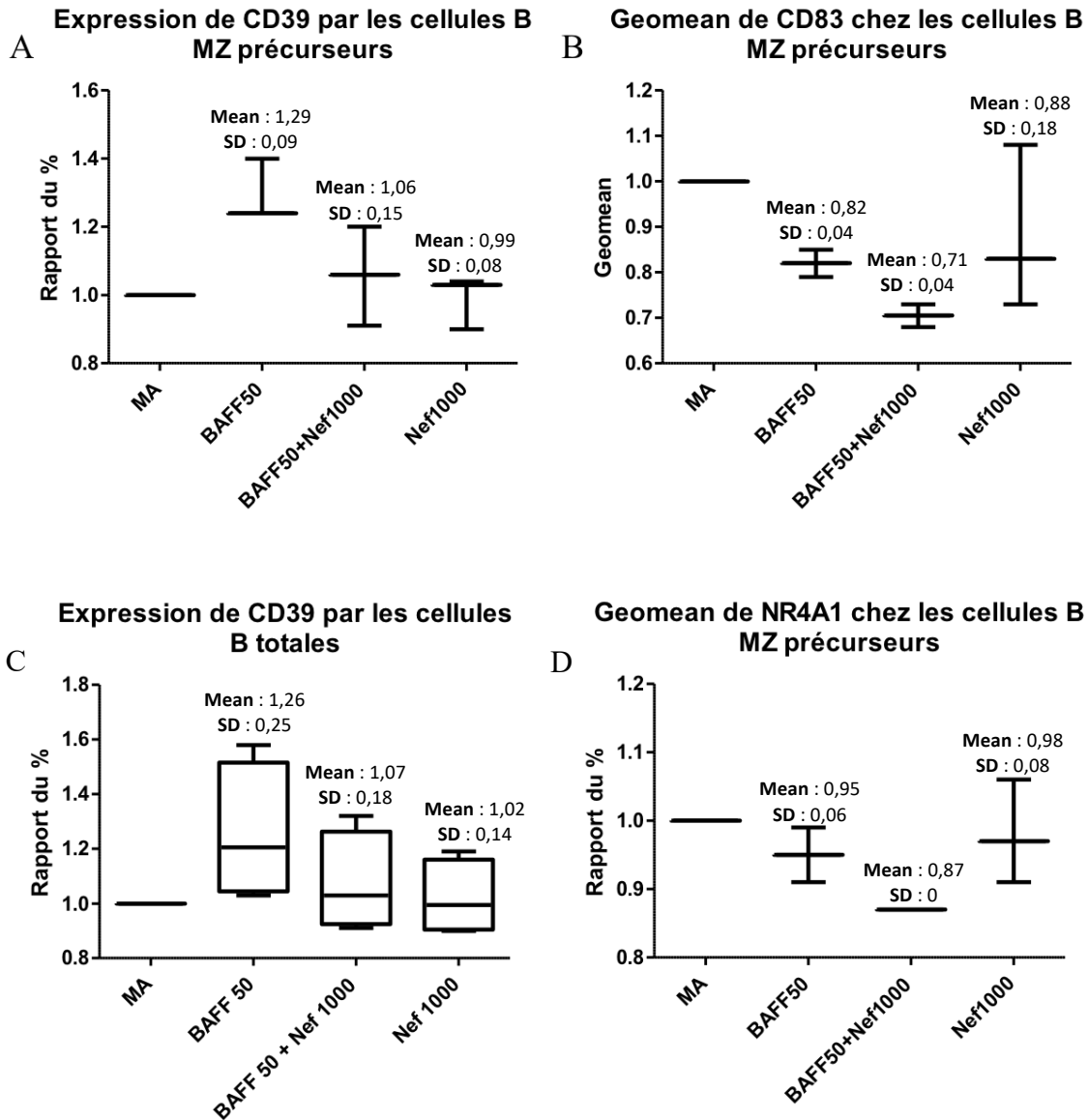
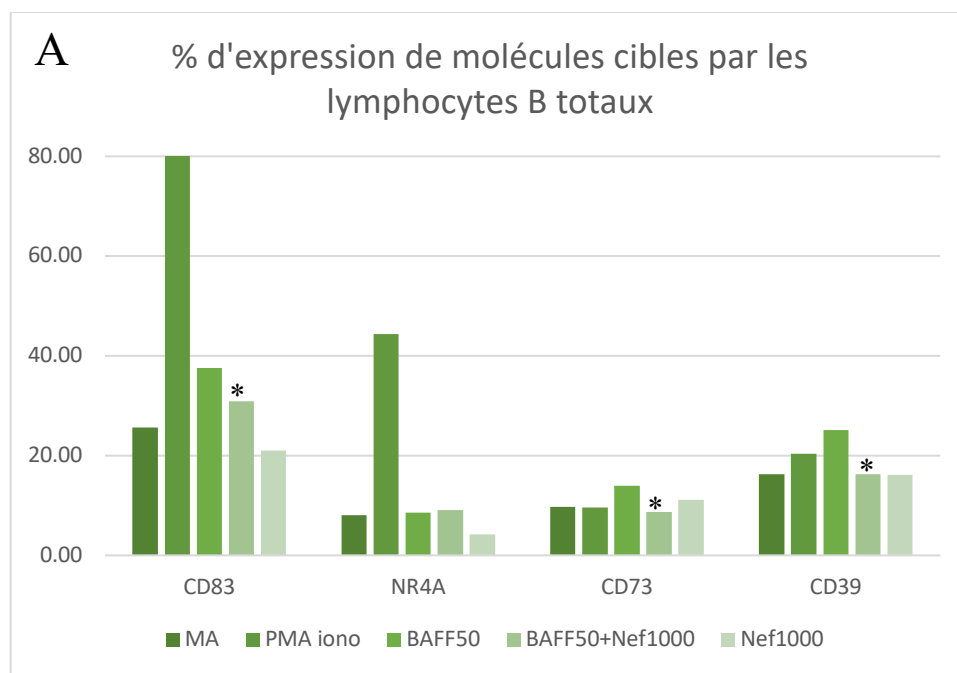


Figure 13. Effets de BAFF recombinant et de Nef sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 chez les lymphocytes B totaux, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales. Afin de comparer les différentes expériences, nous avons divisé chaque valeur d'expression obtenue par la valeur du milieu seul, donc les valeurs indiquées dans les graphiques sont des rapports. Les données représentent le rapport du pourcentage de l'expression et le GeoMFI de différentes molécules comparativement aux valeurs des cellules incubées en milieu seul. Les données des figures 13A-D ont été obtenues suite à l'incubation des cellules B avec ou sans BAFF 50 ng/mL et Nef 1000 ng/mL effectuée quatre fois. Les

figures comportent les données combinée des quatre expériences avec les cellules de 2 donneurs. Puisqu'il s'agit d'une analyse préliminaire, la significativité n'est pas indiquée.

Les figures 14A-C démontrent la même tendance observée à la figure 13. Après incubation avec BAFF et Nef, il y a diminution d'expression de CD83, CD73 et CD39 (dénnoté par * aux figures A, B et C) comparativement à l'expression après incubation avec BAFF seul. Par contre, cette diminution d'expression touche seulement NR4A1 chez les lymphocytes B MZ. Ces observations sont attendues chez les MZ puisque ce sont ces populations exprimant NR4A1 et CD83 *ex vivo* qui démontrent un potentiel Breg (201). En ce qui concerne les lymphocytes B totaux, ceci pourrait être expliqué par le fait que NR4A1 est une molécule d'expression rapide (524), donc après 16 h d'incubation, son augmentation par BAFF serait déjà redescendu. De plus, dépendamment du donneur, BAFF augmente NR4A1, mais à de fortes concentrations, il le diminue, c'est ce qui semble se passer ici.



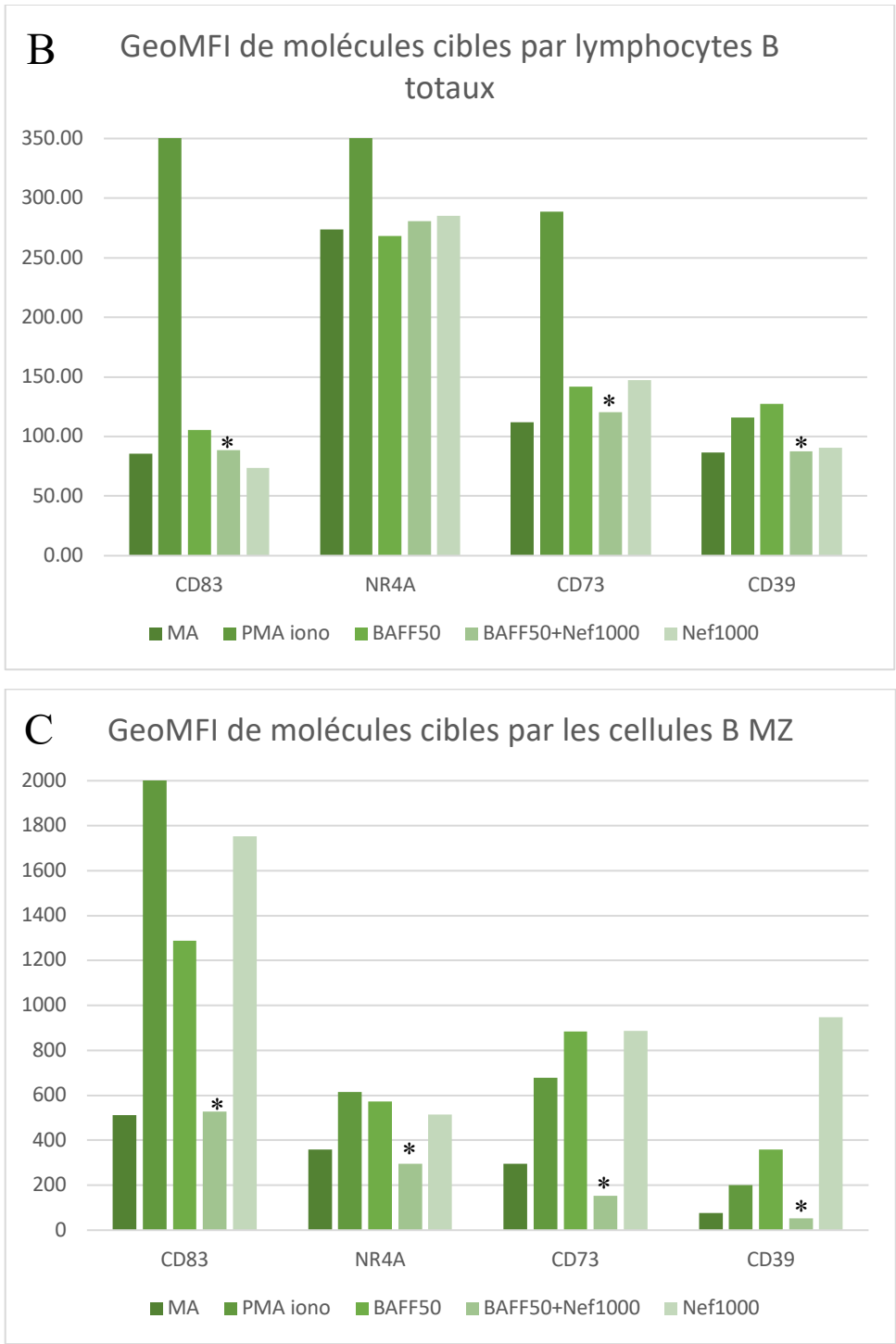


Figure 14. Effets de BAFF et de Nef sur l'expression de CD83, NR4A1, CD73 et CD39 par les lymphocytes B totaux. Les cellules mortes et les doublets furent éliminés puis l'expression de CD83, NR4A1, CD73 et CD39 par les lymphocytes B d'amygdales fut observée après incubation de 16 h en milieu seul (MA), avec PMA/ionomycine, avec BAFF 50 ng/mL avec ou sans Nef 1000 ng/mL, et Nef 1000 ng/mL seul. PMA/ionomycine sertit

d'un contrôle d'activation. Cette expérience fut répétée 8 fois avec 2 différents donneurs (D-013 et IA-015). Les figures 14A-C contiennent les données d'un des essais avec le donneur IA-015, puisque cet essai démontrait les tendances plus clairement.

Nous avons donc posé la question : Nef est-il bel et bien absorbé par les lymphocytes B? Et si oui, quelles populations l'absorbent? À l'aide du marqueur FITC anti-Nef, nous avons pu déterminer qu'environ 3,33% des cellules B d'amygdales intériorisent Nef (figure 15A). Les cellules CD10⁺, marqueur caractéristique des cellules B MZ précurseurs, des cellules B transitionnelles immatures, et des cellules B post-centre-germinatif, semblent tous absorber Nef, donc ce dernier serait capté par les cellules actives. Un peu moins de la moitié des cellules CD83⁺ intériorisent aussi cette molécule. Les cellules IgM⁺, CD27⁺ et CD1c⁺ démontrent une absorption modérée de Nef et finalement, les cellules CD39⁺ ne semblent pas du tout absorber Nef.

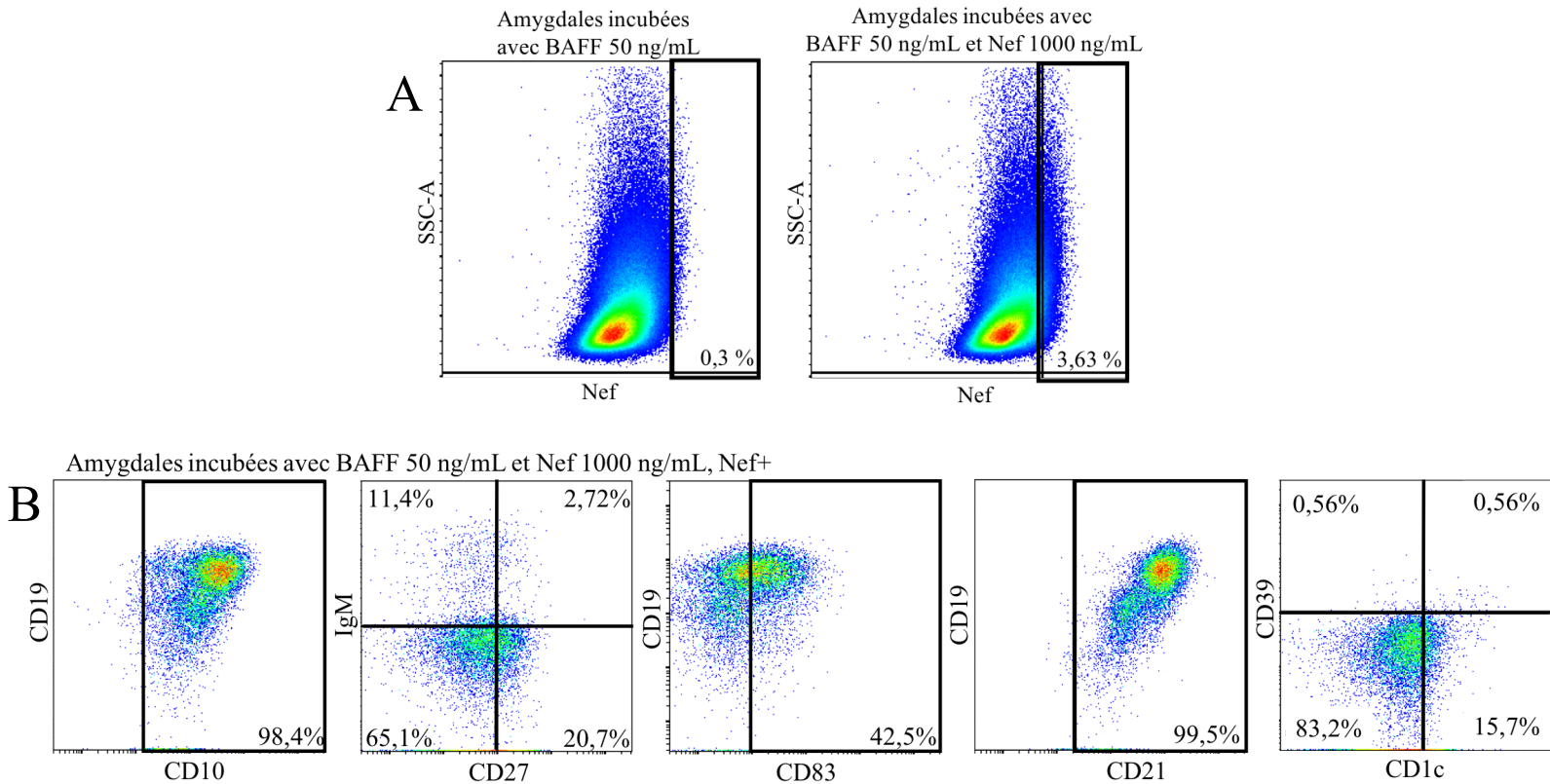


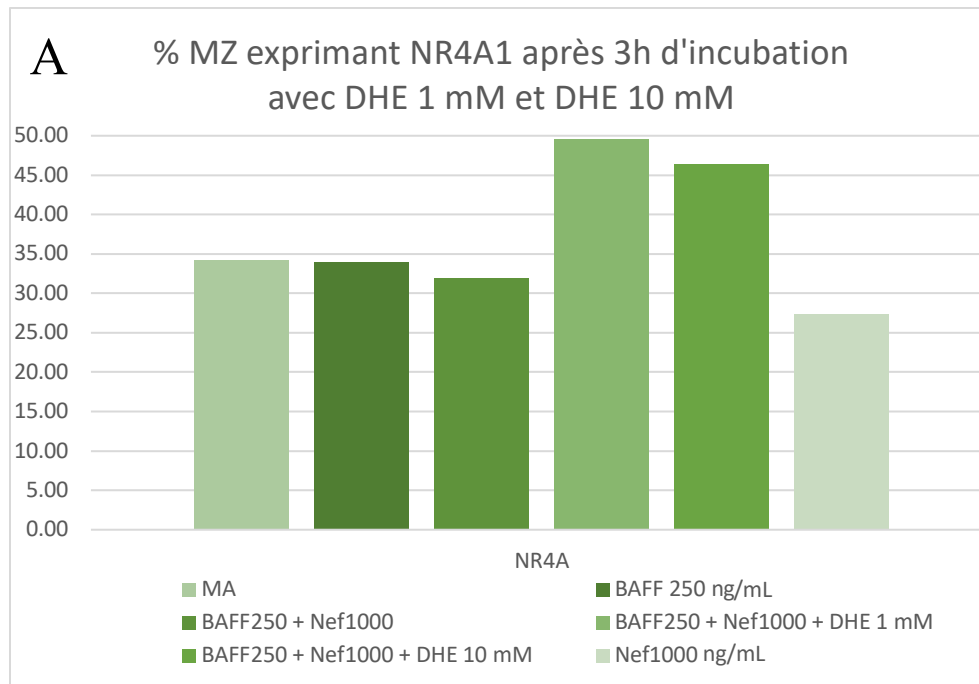
Figure 15. Entrée de Nef dans les populations de lymphocytes B d'amygdales après 3 h d'incubation. Les doublets et les cellules mortes furent éliminés. Les cellules ayant été incubées 3 h avec BAFF 50 ng/mL et celles ayant été incubées 3 h avec BAFF 50 ng/mL

et Nef 1000 ng/mL furent étudiées pour déterminer l'expression de FITC anti-Nef (Cedarlane, Biobynt). Ensuite, les populations exprimant Nef furent étudiées avec les marqueurs suivants : APC anti-CD19 (BD Biosciences), PE anti-CD21 (BD Biosciences), Alexa Fluor700 anti-CD27 (BD Biosciences), BB515 anti-IgM (BD Biosciences), PerCP-eFluor 710 anti-CD1c (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA), BV421 anti-CD10 (BD Biosciences), PE-Cy7 anti-CD83 (BD Biosciences). Cette expérience fut répétée 3 fois avec le même donneur. La figure 15A démontre l'entrée de Nef dans les cellules B, et la figure 15B démontre quelles populations absorbent Nef.

Après avoir complété les tests précédents avec BAFF et Nef, nous voulions étudier l'effet du DHE sur l'expression de nos molécules d'intérêts puisque des études ont déjà démontré la capacité du DHE à réactiver l'expression de NR4A (251). À noter que ces expériences ne ciblaient que NR4A1 et 3 puisque les autres molécules auraient eu besoin d'au moins 6 h d'incubation avant d'observer un effet du DHE tandis que le NR4A fluctue en expression plus rapidement. D'abord, la concentration de DHE à utiliser devait être déterminée. Nous nous sommes basés sur les travaux de Dr Orla Conneely qui utilise le DHE de 0,001 à 0,1 mM (251). À la figure 16A, nous pouvons observer une augmentation d'expression de NR4A1 légèrement plus haute après incubation avec BAFF 250 ng/mL, Nef 1000 ng/mL et DHE 1 mM comparativement aux cellules incubées avec BAFF, Nef et DHE 10 mM (colonne rouge de la figure 16A). La différence d'expression de NR4A1 aux deux concentrations de DHE était très petite, donc les expériences subséquentes furent faites avec une concentration de DHE de 10 mM ce qui ne semblait pas affecter la viabilité des cellules.

La figure 16B démontre que le GeoMFI de NR4A1 est plus haut chez les cellules B totales, les MZ et les MZ précurseurs après une incubation de 3 h avec BAFF 50 ng/mL et BAFF 50 ng/mL en présence de Nef 1000 ng/mL qu'après 1 h d'incubation. Au contraire, le GeoMFI du NR4A1 est plus bas après 3 h d'incubation avec BAFF 50 ng/mL en présence de Nef 1000 ng/mL et de DHE 10 mM qu'après 1 h d'incubation.

Ensuite, la figure 16C illustre l'effet du DHE sur NR4A1 après 3 h d'incubation en comparant deux concentrations de BAFF. La modulation de NR4A1 par le DHE est beaucoup plus évidente lorsque BAFF est utilisé à une concentration de 250 ng/mL (dénoté par * à la figure 16C) qu'à une concentration de 50 ng/mL. Nous pouvons aussi noter qu'à BAFF 50 ng/mL en présence de Nef, il y a diminution de l'expression de NR4A1 comparativement à BAFF seule, tandis qu'à BAFF 250 ng/mL en présence de Nef il y a augmentation de l'expression de NR4A1 comparativement à BAFF seul. Il ne faut pas oublier ici que de hautes concentration de BAFF ainsi que Nef peuvent mener à la diminution d'expression des NR4As ce qui contrecarre l'effet du DHE. Nous utilisons le DHE pour cette raison; son augmentation de l'expression des NR4As.



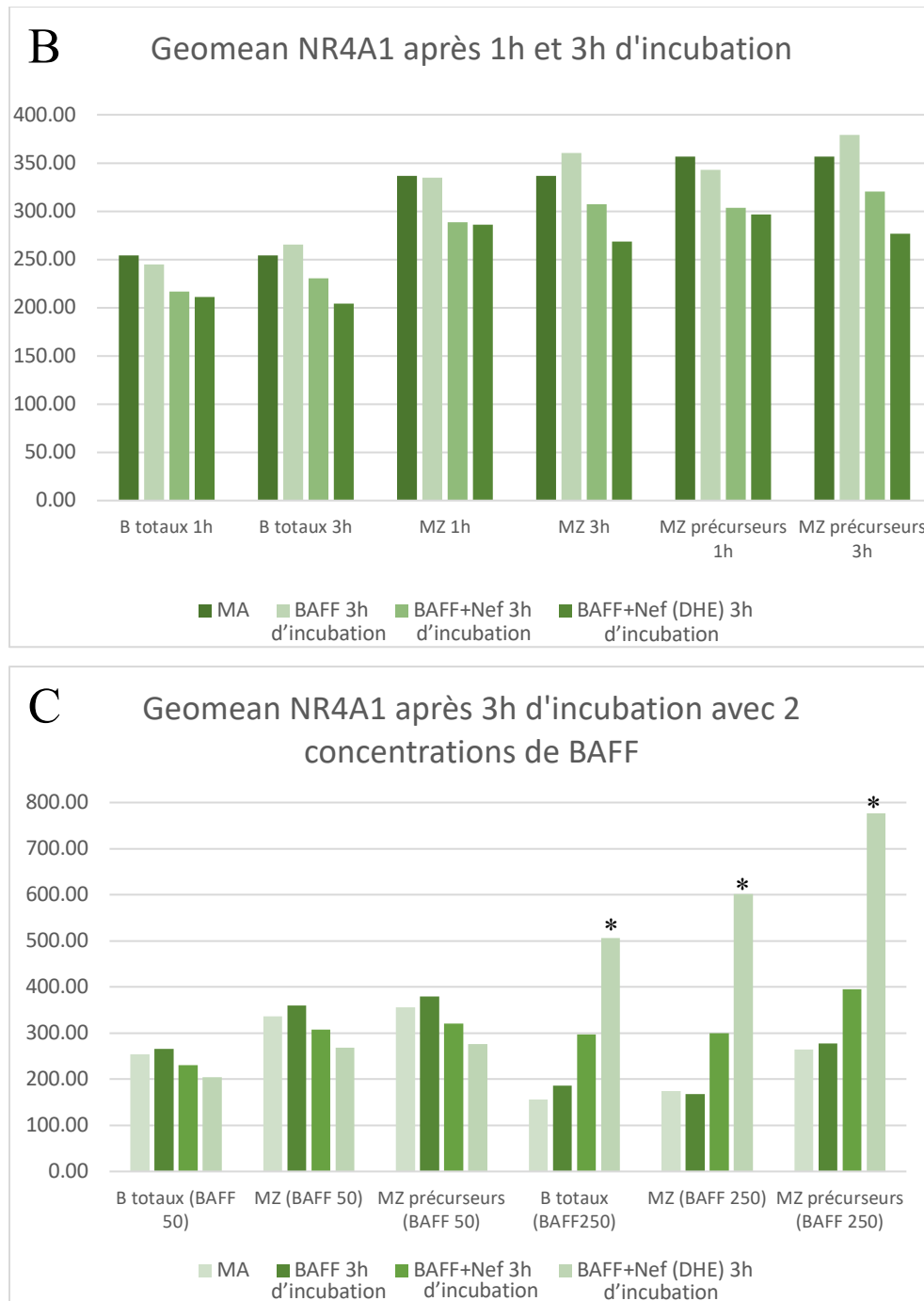
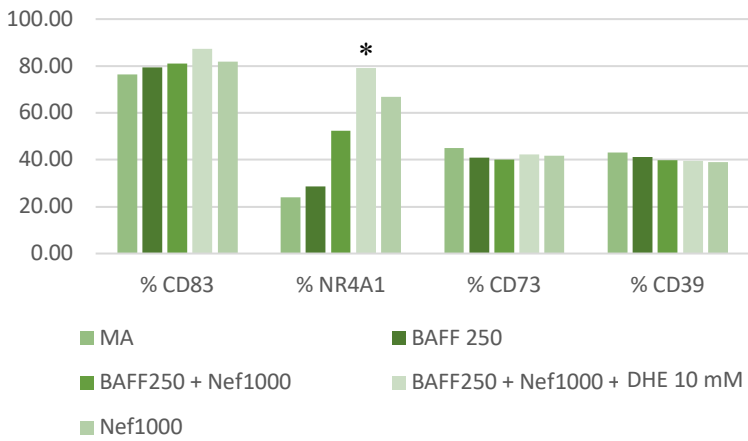


Figure 16. Test de temps d'incubation et de concentrations de BAFF recombinant pour l'observation de l'effet du DHE sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 chez les lymphocytes B, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales. Les doublets et les cellules mortes furent éliminés puis le GeoMFI de PE anti-NR4A1 (Miltenyi Biotec) des cellules B MZ incubés 1 h ou 3 h en milieu seul (MA), avec BAFF 250 ng/mL, en présence ou en absence

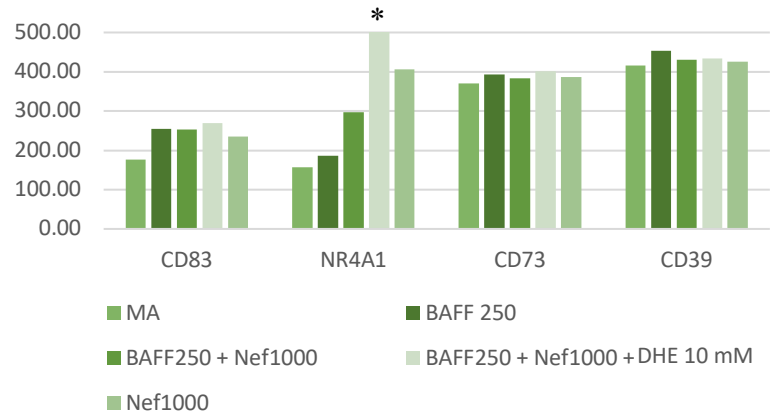
de Nef 1000 ng/mL, avec ou sans DHE 1mM ou 10 mM fut étudié (figure 16A). La figure 16B démontre le GeoMFI de NR4A1 après 1 h et 3 h d'incubation chez les B totaux, les MZ et les MZ précurseurs. La figure 16C démontre l'expression de NR4A1 chez les cellules B, les MZ et les MZ précurseurs après 3 h d'incubation avec BAFF à 50 ng/mL ou 250 ng/mL, avec ou sans Nef 1000 ng/mL, avec ou sans DHE 10 mM. Le test comparant l'effet du DHE à 1 mM et à 10 mM et celui comparant une incubation de 1 h et de 3 h furent faits une fois avec un donneur. La comparaison entre une incubation de 3 h avec BAFF 50 ng/mL et 250 ng/mL fut fait une seule fois, les expériences subséquentes utilisant BAFF à une concentration de 250 ng/mL.

L'ajout du DHE aux traitements préétablis a illustré quelques tendances. Premièrement, le pourcentage d'expression ainsi que le GeoMFI de NR4A1 augmente lorsque les cellules sont incubées avec BAFF 250 ng/mL, Nef 1000 ng/mL et DHE 10 mM comparativement aux cellules incubées avec BAFF et Nef seulement aux mêmes concentrations. Cette augmentation d'expression de NR4A1 est observée chez les cellules B totales, les cellules B MZ ainsi que les cellules B MZ précurseurs (dénoté par * aux figures 17A, B et C). La même tendance est observée avec les mêmes traitements et les mêmes populations pour le NR4A3 (dénoté par * aux figures 17D, E et F). Par contre, une tendance inverse est observée face à l'expression de CD83 chez les cellules B MZ précurseurs avec les mêmes traitements (dénoté par € aux figures 17C et F). Finalement, le DHE ne semble pas affecter le pourcentage d'expression ou le GeoMFI de CD73 ou de CD39 chez les populations observées. En somme, le DHE semble augmenter l'expression de NR4A1 et NR4A3 chez toutes les populations observées et semble diminuer l'expression de CD83 chez les lymphocytes B MZ précurseurs.

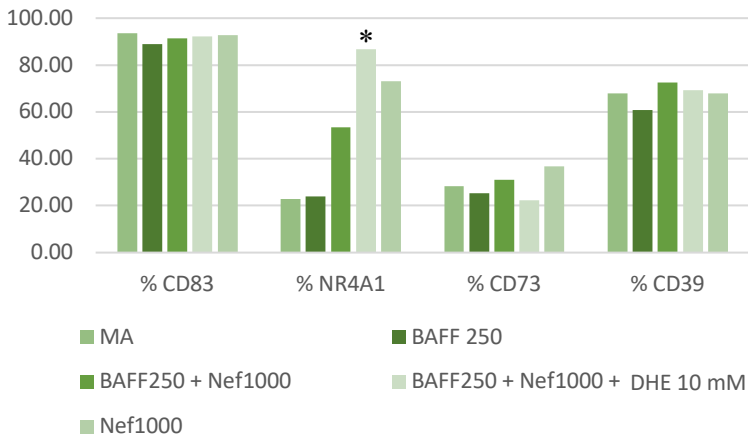
A % B totaux exprimant différentes molécules après 3h d'incubation (cocktail NR4A1)



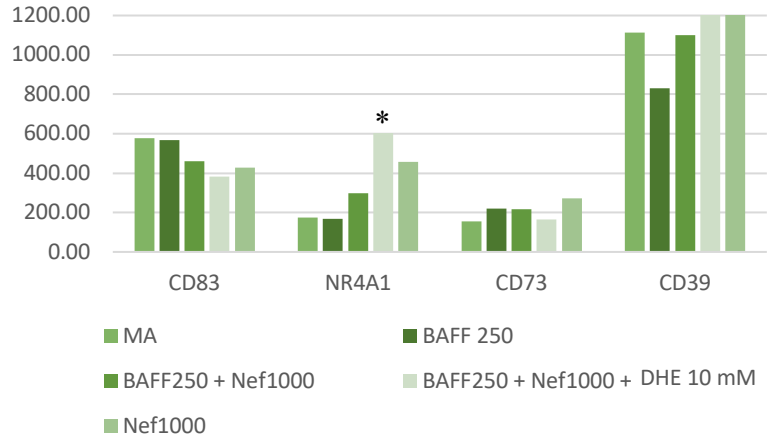
GeoMFI B totaux exprimant différentes molécules après 3h d'incubation (cocktail NR4A1)

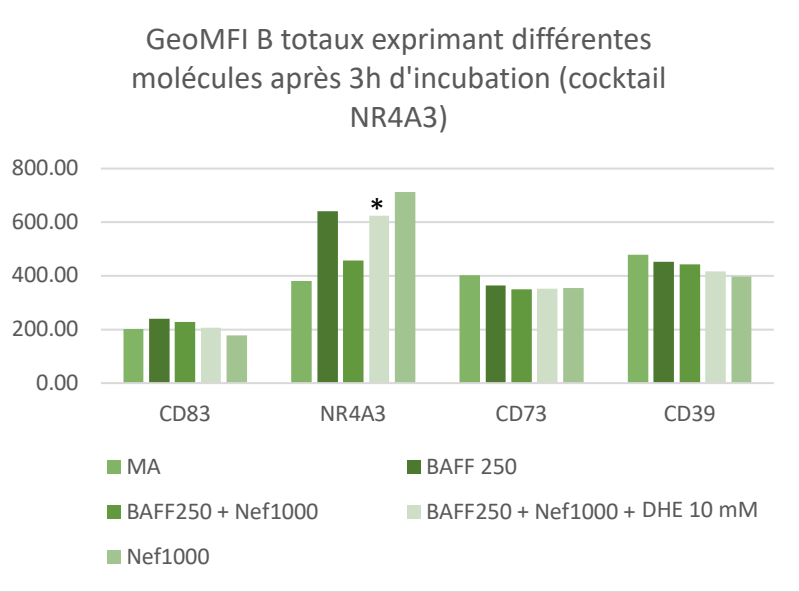
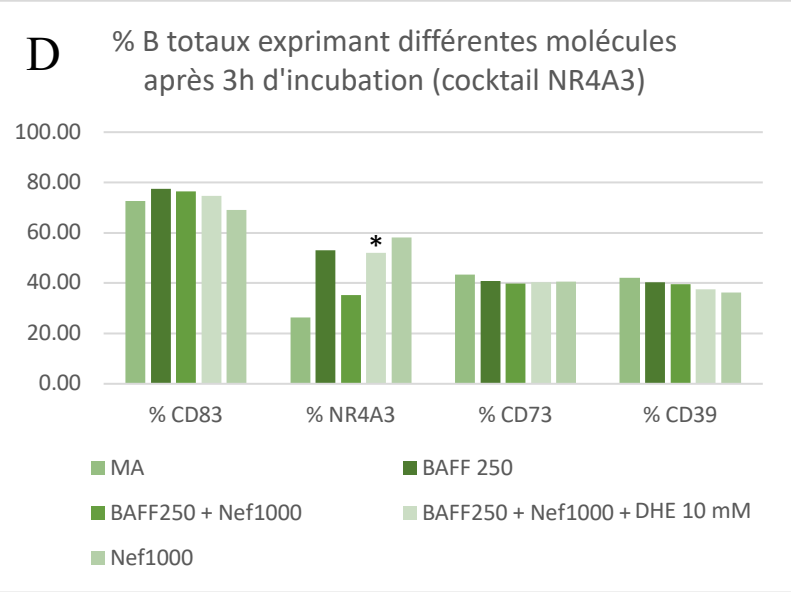
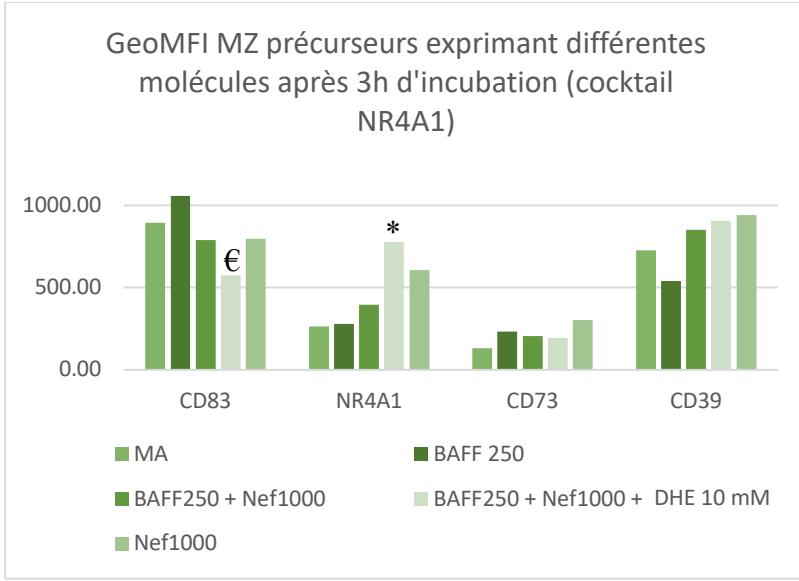
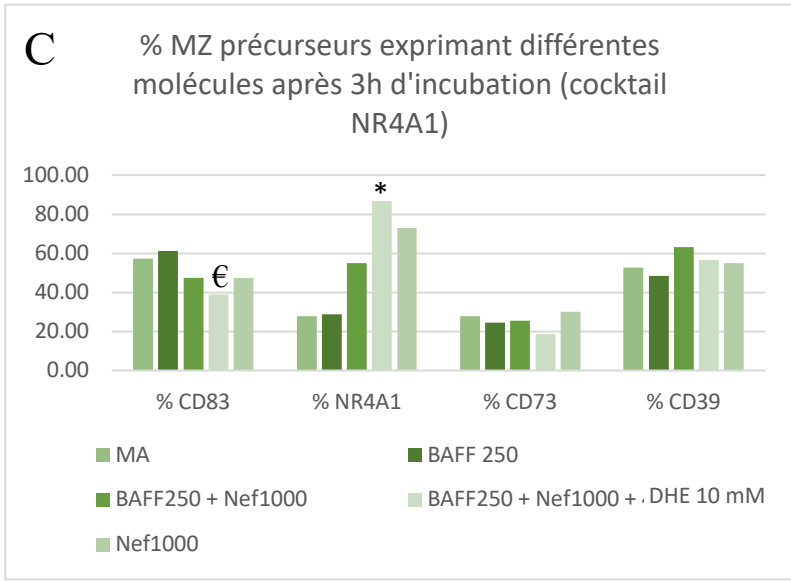


B % MZ exprimant différentes molécules après 3h d'incubation (cocktail NR4A1)



GeoMFI MZ exprimant différentes molécules après 3h d'incubation (cocktail NR4A1)





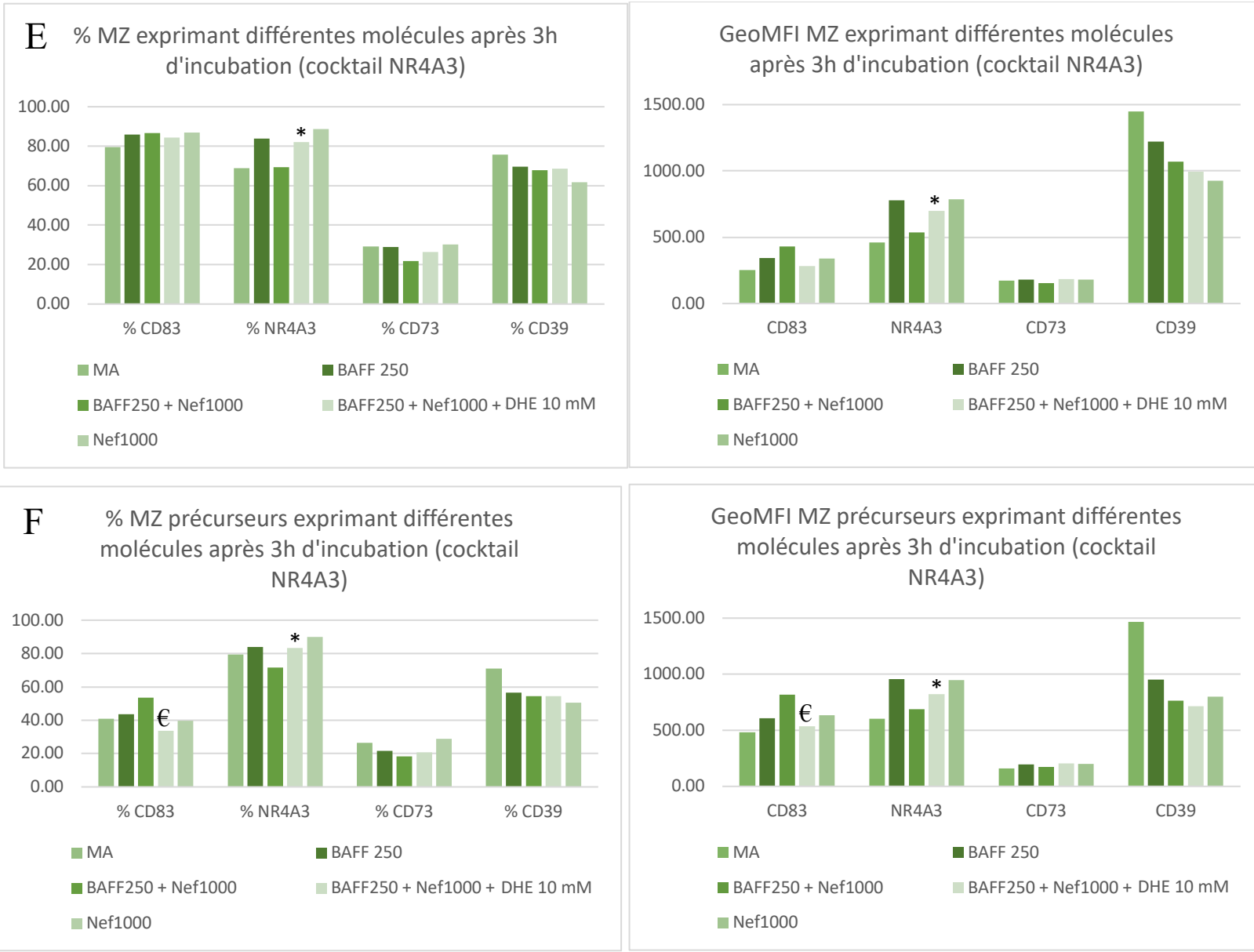


Figure 17. Effet du DHE sur l'expression de différentes molécules dont NR4A1 et NR4A3 chez les lymphocytes B totaux, les cellules B de la zone marginale, et les cellules B précurseurs de la zone marginale des amygdales. Les doublets et les cellules mortes furent éliminés. Les cellules B furent incubées 3 h en milieu seul (MA) ou avec BAFF 250 ng/mL en présence ou non de Nef 1000 ng/mL et de DHE 10 mM. Ensuite, l'expression de diverses molécules fut étudiée chez les cellules B totales, les MZ et les MZ précurseurs. Les marqueurs utilisés sont les suivants : PE anti-NR4A1 (Miltenyi Biotec) ou PE anti-NR4A3 (Santa Cruz Biotechnology), BUV395 anti-CD73 (BD Biosciences) et PE-Cy7 anti-CD83 (BD Biosciences). Ce test fut fait deux fois avec deux différents

donneurs. Les figures contiennent les résultats d'une des expériences d'un donneur, celle-ci étant représentative des données obtenues aux autres expériences. Du au petit nombre de répétition, la significativité n'est pas donnée.

Nous avons maintenant fait les observations suivantes : après incubation avec BAFF 50 ng/mL pendant 3 heures, les B totaux, les MZ et les MZ précurseurs ont un GeoMFI de NR4A1 similaire aux cellules incubées en milieu seul. Lorsque Nef 1000 ng/mL est ajouté au BAFF 50 ng/mL, le GeoMF diminue légèrement comparé au BAFF seul. Après ajout de DHE, il y a encore une légère diminution comparativement à BAFF 50 ng/mL et Nef 1000 ng/mL et à BAFF seul. Après incubation avec BAFF 250 ng/mL pendant 3 heures, les B totaux, les MZ et les MZ précurseurs ont encore un GeoMFI de NR4A1 similaire aux cellules incubées en milieu seul. De plus, lorsque Nef 1000 ng/mL est ajouté à BAFF 250 ng/mL, il y a une légère diminution du GeoMFI de NR4A1 comparativement à BAFF seul. Par contre, lors de l'ajout du DHE, le GeoMFI de NR4A1 est considérablement plus élevé comparativement à BAFF 250 ng/mL et Nef 1000 ng/mL, et à BAFF seul. Les hypothèses explicatives de ces observations figurent dans la section Discussion.

Nous voulions finalement étudier l'effet de Nef sur la production d'IL-10 par les lymphocytes B d'amygdales. Les cellules B MZ ont déjà été décrites comme ayant un potentiel Breg, et cette activité régulatoire des cellules B pourrait leur être accordée par leur production d'IL-10 (300). Contrairement à nos hypothèses, l'ajout de Nef 1000 ng/mL à BAFF 250 ng/mL lors de l'incubation des cellules B ne semble pas affecter leur expression d'IL-10 qui est déjà modulée par BAFF (figure 18A). En étudiant la population exprimant IL-10, il est possible de voir que la majorité des cellules exprimant IL-10 expriment aussi CD10. Certaines co-expriment aussi CD1c, et très peu co-expriment CD39, CD73, CD83, IgM ou CD27. Donc, IL-10 stimulé par BAFF serait principalement exprimé par les lymphocytes B immatures ainsi que les lymphocytes B du centre germinatif et sa production ne serait pas affectée par Nef.

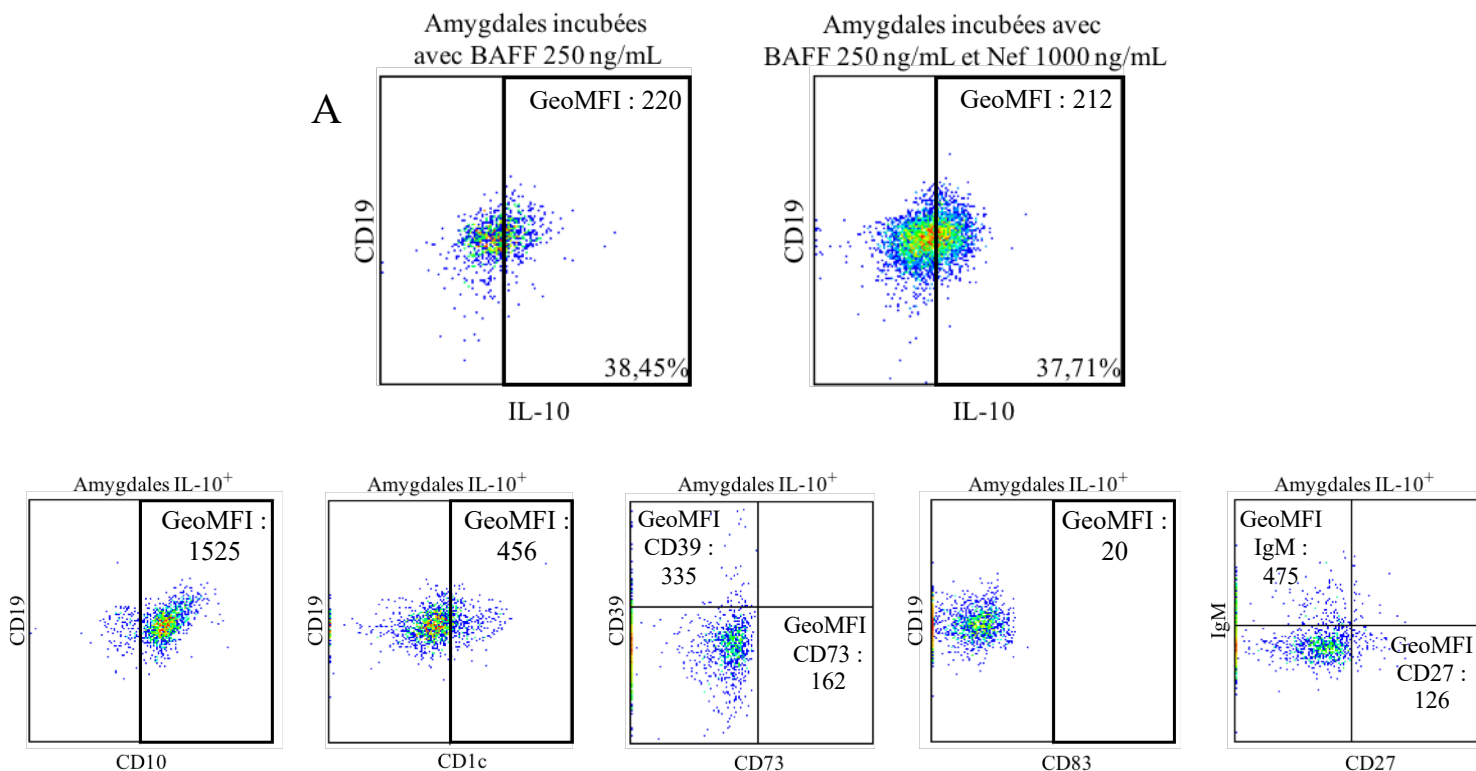


Figure 18. Expression d'IL-10 par les lymphocytes B des cellules d'amygdales. Les doublets et les cellules mortes furent éliminés puis le pourcentage et le GeoMFI de cellules exprimant IL-10 après incubation avec BAFF 250 ng/mL fut comparé avec celui des cellules ayant été incubées avec BAFF 250 ng/mL et Nef 1000 ng/mL. Ensuite, les populations exprimant IL-10 furent étudiées avec les marqueurs suivants : APC anti-CD19 (BD Biosciences), Alexa Fluor700 anti-CD27 (BD Biosciences), BB515 anti-IgM (BD Biosciences), PerCP-eFluor 710 anti-CD1c (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Ca, USA), BV421 anti-CD10 (BD Biosciences), BUV395 anti-CD73 (BD Biosciences), PE-Cy7 anti-CD83 (BD Biosciences). Ce test fut fait 2 fois avec 2 différents donneurs.

Discussion

Malgré les avancements incroyables dans le traitement du VIH, plusieurs mécanismes restent à être élucidés, dont ceux impliqués dans l'inflammation chronique résultante de cette infection. Comme mentionné dans l'introduction de ce travail, nous pouvons observer chez les patients atteints de VIH une dérégulation de plusieurs populations, dont les cellules B, qui persiste au-delà de la thérapie antirétrovirale. Cette dérégulation mène à l'augmentation de la fréquence des cellules précurseurs de la zone marginale, dont celles qui expriment IL-10, à l'augmentation de BAFF, et à l'hyperglobulinémie, et n'est pas complètement résolue par les traitements disponibles (107). La recherche sur le VIH étant largement axée sur la réponse des lymphocytes T résulte en une lacune de connaissances sur le rôle des lymphocytes B dans le développement d'une immunité naturelle ainsi que son potentiel en tant que cible thérapeutique. L'implication des lymphocytes B dans l'inflammation pourrait bel et bien nous guider vers une solution thérapeutique ayant des répercussions importantes pour les gens vivant avec cette infection.

1. Populations de cellules d'amygdales humaines

Notre équipe a auparavant démontré l'existence d'une petite population de lymphocytes B présente dans le sang des individus sains exprimant $CD19^+CD1c^+IgM^+CD27^+CD21^{lo}CD10^+$. Cette population exprimant des marqueurs de cellules B transitionnelles immatures et innées de la zone marginale fut nommée cellules B MZ précurseurs (107; 204). Lors de l'étude de nos échantillons de cellules d'amygdales humaines, nous avons observé que celles-ci ont une plus grande population de cellules B MZ ainsi que de cellules B MZ précurseurs que ce que l'on retrouve dans les PBMC. Les cellules B MZ, connues pour leur BCR polyréactif et son potentiel autoréactif (152), pourraient conserver l'expression des NR4As comme le font les Tregs, soit par des signaux TCR autoréactifs (525). En fait, nous avons démontré une fonction Breg chez les cellules B MZ précurseurs impliquant NR4A1 et CD83. Aussi, les cellules B MZ expriment les ectonucléotidases membranaires CD39 et CD73 qui permettent l'hydrolyse d'ATP extracellulaire menant à la production d'adénosine (223) et l'adénosine, permettant une suppression immunitaire, donnant un potentiel Breg à la cellule. Il a aussi été démontré que

l'adénosine a la capacité de réguler l'expression des NR4As (526). C'est le maintien de l'expression des NR4As par cette population qui pourrait donc permettre une haute expression de CD83, qui participe dans des interactions homotypiques. Ces interactions homotypiques pourraient ensuite livrer des signaux régulateurs menant à une inhibition de signaux pro-inflammatoires (521).

Les populations principales co-exprimant NR4A1 et CD83 dans nos échantillons d'amygdales humaines sont les cellules B MZ précurseurs. Les cellules co-exprimant ces deux molécules sont majoritairement CD39⁺CD73⁺, suggérant la production d'adénosine, mais la population est hétérogène, et certaines cellules CD39⁺CD73⁺ n'expriment pas NR4A1 et CD83. D'autres travaux de notre équipe ciblant les PBMC de participants sains démontrent que les populations co-exprimant NR4A1 et CD83 sont principalement CD1c⁺. Parmi ces dernières, nous retrouvons une population de MZ IgM⁺CD27⁺ et une population de MZ précurseurs IgM⁺CD27⁺CD10⁺ (201). Des résultats similaires ont été obtenus avec les populations co-exprimant NR4A3 et CD83. Il faut aussi noter que la variation entre les résultats obtenus peut être expliquée par l'existence de différents mécanismes post-transcription encore mal compris, interférant avec le lien entre l'ARNm et les niveaux protéiques. En somme, le potentiel Breg des cellules B MZ précurseurs provient possiblement des populations co-exprimant NR4A1 (et possiblement NR4A2 et 3) et CD83, due en partie à leur lien à l'adénosine, mais d'autres études sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

2. Entrée de Nef dans les cellules B

La protéine du VIH Nef nous intéresse pour plusieurs raisons. À la base, nos travaux découlent des études portant sur les souris VIH-Tg. Celles-ci développent une dérégulation des lymphocytes B et une maladie comparable au SIDA qui dépendent de Nef (514; 515). Chez les gens vivant avec le VIH, elle contribue au profil inflammatoire en menant à une surproduction de BAFF (511). Elle amplifie la réplication, l'infectiosité et la propagation virale, ainsi les gens infectés avec un virus contenant un gène de Nef démontrent une progression atténuée de la maladie (36; 37). Il faut noter que d'autres facteurs contribuent aussi au profil inflammatoire des patients progressifs en modulant BAFF tels les niveaux

de LPS et de gp120 solubles (510). En fait, une étude réalisée par notre laboratoire démontre que le LPS agit en synergie avec Nef, menant à une production de BAFF encore plus importante que Nef et LPS seules (511). L'inflammation chronique et la restauration incomplète du système immunitaire des patients atteints du VIH pourraient donc être liée à la persistance de Nef qui, malgré ART, serait sécrété par les réservoirs viraux (43). Une étude publiée par notre équipe démontre la présence de Nef dans les DC post ART chez les progresseurs classique et l'absence de Nef dans le plasma des progresseurs lents avirémiques (511). L'élucidation de ce mécanisme inflammatoire pourrait donc être la clé nécessaire aux prochaines découvertes thérapeutiques. Celles-ci pourraient permettre la diminution de la charge inflammatoire chez les patients vivant avec le VIH, et ce, potentiellement par le blocage de Nef et/ou BAFF en conjonction avec ART.

Chez les patients atteints du VIH, la présence de Nef dans les cellules B ne provient probablement pas d'une synthèse endogène, puisque ces cellules ne contiennent pas d'ADN viral (265), de p24 (protéine de la capsid virale) ou de p17 (protéine de la matrice virale) (40). La présence de Nef dans les cellules B folliculaires proviendrait donc d'une source exogène, chose possible puisque Nef est sécrété en vésicule ou sous forme soluble dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées (527), avec des concentrations de 1 à 10 ng/mL mesurées dans le sérum des patients infectés (523). Comme décrits dans l'introduction, Nef soluble est propulsé par les prolongements des macrophages et absorbé par les lymphocytes B par endocytose ou pinocytose, menant à la suppression de CSR d'immunoglobulines par le blocage de la signalisation de CD40 (40).

Nos résultats corroborent avec la littérature, démontrant l'entrée de Nef dans les cellules B, dont les MZ précurseurs où Nef et CD10 ont une co-expression de 98,4%. Nef exogène absorbée par les cellules B peut donc inhiber la permutation de classe dépendante de CD40 à l'aide de NFkB, permettant au virus d'échapper à la réponse immune T-dépendante (40). Il est important de noter que Nef fut utilisé à une concentration de 1000 ng/mL et que les concentrations mesurées dans le sérum des patients infectés sont de l'ordre de 1 à 10 ng/mL (523), mais les concentrations des centres germinatifs risquent d'être beaucoup plus élevées puisque ceux-ci représentent le site principal de répliation et

de propagation virale (528). Donc, il est difficile de prévoir les concentrations physiologiques exactes. Les cellules B du centre germinatif pourraient absorber Nef exogène de façon passive ou active via les macrophages et possiblement les DC (523; 527), ou les cellules infectées par le VIH pourraient transférer Nef aux cellules B lors d'interactions telles les synapses immunes ou par des nanotubules (529). Donc, le VIH échappe à la réponse B T-dépendante en piratant leur machinerie interne à l'aide de Nef. Le blocage de Nef pourrait donc mener au rétablissement de la réponse B protectrice impliquant la CSR dépendante de CD40, la production d'IgG2 et d'IgA spécifiques au VIH, et à la production de facteurs du centre germinatif tel Bcl-6, AID et IRF4 (42).

3. Effet de BAFF et de Nef sur les cellules B MZ

Notre équipe a déjà montré que la capacité de réguler l'expression de BAFF dans le sang et les muqueuses génitales est associée à l'immunité naturelle chez les travailleuses du sexe *highly exposed seronegative* (HESN), permettant possiblement une réponse d'homéostasie des cellules B et T spécifiques au VIH à la porte d'entrée du virus, contrairement aux observations chez les travailleuses du sexe VIH+ où de niveaux élevés de BAFF sont mesurés dans le tractus génital indiquant une immuno-incompétence. Les patients ne contrôlant pas leur infection au VIH maintiennent de hauts niveaux de BAFF qui persistent même lorsque l'infection est contrôlée par ART, et qui mènent à une dérégulation des lymphocytes B favorisant l'inflammation (530). Les cellules B des centres germinatifs dont la sélection implique BAFF sont particulièrement touchées (517). Ceci concorde avec les observations des souris VIH et BAFF transgéniques où de hauts niveaux de BAFF sont accompagnés d'une augmentation de lymphocytes B matures et d'une expansion du compartiment B et des zones marginales (460).

J'ai discuté plus haut des effets de Nef sur nos populations cibles de lymphocytes B d'amygdales, dont l'inhibition de la permutation de classe, bloquant la réponse des lymphocytes B. Le blocage de la permutation de classe par Nef pourrait mener à de hauts niveaux de BAFF afin d'initier la permutation de classe indépendante de CD40 via TACI et la production d'anticorps par les lymphocytes B MZ (375). Cette augmentation de BAFF cause aussi l'activation polyclonale des cellules B et l'hyperglobulinémie (107), et corrèle

avec la progression de la maladie (531). BAFF est certes un élément clé dans la bataille du système immunitaire contre le VIH, mais sa dérégulation et surproduction rend ultimement l'individu plus vulnérable à sa maladie.

Lors de nos expériences sur les effets de BAFF et de Nef sur l'expression de NR4A1, CD83, CD73 et CD39, nous avons observé plusieurs tendances, mais malheureusement, nos résultats n'étaient pas significatifs. Certains donneurs démontraient des tendances beaucoup plus prononcées que d'autres, et ce, sûrement dues à de bas niveaux d'inflammation basale menant à une modulation plus importante des molécules. Chez un patient ayant déjà de hauts niveaux d'inflammation lors de la récolte des cellules d'amygdales, les molécules d'intérêt sont déjà modulées. Donc, l'expression des molécules étudiées par les cellules incubées avec BAFF, molécule d'activation des lymphocytes B, ne diverge pas beaucoup de l'expression par les cellules incubées en milieu seul. En effet, la mesure des niveaux de BAFF des patients fut effectuée par un collègue, démontrant de variations importantes entre eux (figure 11). De plus, nos échantillons sont obtenus d'individus ayant une amygdalectomie, suggérant un certain niveau inflammatoire basale. Il est aussi à noter que nos expériences subséquentes ont été réalisées avec une concentration de BAFF de 250 ng/mL à la place de 50 ng/mL (la concentration utilisée ici), et que les effets de BAFF et de Nef sont plus flagrants à cette haute concentration.

Nous avons observé qu'une incubation avec BAFF mène à l'augmentation de l'expression de CD39 par les cellules B et les cellules B MZ précurseurs comparativement à une incubation en milieu seul. Ensuite, une incubation avec BAFF accompagné de Nef diminue considérablement l'expression de CD39 comparativement à une incubation avec BAFF seul. Ces résultats sont sensés puisque CD39 avec CD73 ainsi que l'adénosine qu'ils synthétisent travaillent ensemble afin de créer une cascade d'immunosuppression menant au déclin de l'inflammation et de l'activation immune (Tianyu He, 2017). Par contre, aucune tendance fixe n'a été observée avec CD73. La littérature décrit une légère diminution de l'expression de CD73 chez les patients atteints du VIH comparativement aux contrôles sains. Cette diminution de CD73 est associée à une consommation d'AMP réduite, à une perturbation du mécanisme de commutation de classe, à une activation des

cellules B et à l'augmentation de l'expression de CD39 (226). Nous avons bel et bien observé une diminution d'expression de CD73 après une incubation avec BAFF et Nef comparativement à une incubation avec BAFF seul, mais cette diminution n'est pas observée dans l'ensemble des expériences. À la figure 14C, Nef seul semble augmenter significativement l'expression de CD73 et CD39 comparativement au milieu seul pouvant indiquer une augmentation de la production d'adénosine par ces molécules afin de contrôler l'inflammation entraînée par Nef.

La même tendance a été observée pour le CD83 et NR4A1, c'est à dire la diminution d'expression des molécules après incubation avec BAFF et Nef comparativement à BAFF seul. Une incubation avec BAFF diminuait les niveaux d'expression de ces molécules comparativement au milieu seul, puis une incubation avec BAFF et Nef diminuait encore plus leur expression. Dans certaines expériences, l'expression de NR4A1 ou de CD83 ne changeait pas avec l'ajout de BAFF comparativement au milieu seul. Les résultats dépendent du patient, de ses niveaux basaux de BAFF, ainsi que des concentrations de BAFF et de Nef utilisés en laboratoire. Lorsque les lymphocytes B sont préincubés avec Nef, ou incubés avec Nef seul, l'effet est moindre, indiquant que Nef pirate la machinerie intracellulaire des cellules au travers de BAFF et de ses récepteurs, dont TACI et BAFF-R. Par contre, un effet de Nef seul peut être noté dans certaines figures, ce qui est normal puisque BAFF était déjà présent dans les échantillons de chaque patient. Lors du développement de nos protocoles, nous avons choisi d'incuber BAFF et Nef en tandem puisque physiologiquement, BAFF est toujours présent pour les MZ chez l'humain, soit sous forme soluble ou en surface des DC.

Il a été démontré que les lymphocytes B activés et les lymphocytes B du centre germinatif expriment CD83, mais le rôle de ce dernier n'est pas encore bien défini (532). Comme expliqué plus haut, l'expression de CD83 mène à d'interactions homotypiques entre cellules qui déclenchent la livraison de signaux régulateurs menant à une inhibition de l'activité inflammatoire. Ces caractéristiques ont été décrites chez les DC mais la même étude trouve l'expression de CD83 ainsi que de son récepteur, qui ne semble être que CD83, chez les cellules B (521). CD83 a aussi été lié aux cellules B MZ, tel que décrit dans

les souris ayant un gène de CD83 muté menant à une diminution d'expression de CD83 et une plus petite population de cellules B MZ. Au contraire, les souris transgéniques ayant une surexpression de CD83 avaient de plus grosses populations de cellules B MZ (533).

La tendance observée de l'expression de NR4A1 et CD83 semble concorder avec la littérature. Il a déjà été démontré chez les DC que NR4A1 augmente directement l'expression de CD83 donc cette même relation pourrait être présente chez les cellules B (534). Ensuite, la diminution de l'expression de NR4A1 par les populations de cellules B après incubation avec Nef pourrait provenir de l'effet du VIH sur l'expression de CD73 qui semble parfois augmenter avec CD39 en présence de Nef seul suggérant la production d'adénosine. Il a été démontré chez les cellules B de patients infectés au VIH que la diminution de l'expression de CD73 mène à une diminution d'adénosine accompagnée d'une activation immune chronique (226). Sachant que l'adénosine module NR4A, sa diminution pourrait mener à une diminution d'expression de NR4A, contribuant au phénotype inflammatoire. En effet, des études ont démontré que l'adénosine, par l'entremise du récepteur A2a, contrôle l'expression génomique des NR4A1-3 et que cette modulation, plus spécifiquement de NR4A2, diminue l'expression de NFkB (Tianyu He, 2017). Donc, l'adénosine a un effet anti-inflammatoire par l'entremise des NR4As. Il serait important dans une étude future d'étudier un plus grand nombre de patients afin de pouvoir les catégoriser par groupe selon leur niveau d'expression de BAFF.

4. Effet du DHE sur les marqueurs exprimés par les cellules B MZ

Des études ont déjà démontré la capacité de la déhydroergotamine (DHE) à réactiver l'expression de NR4A en fins thérapeutiques comme dans la leucémie aiguë myéloïde où NR4A est diminué (251). Nous voulions donc examiner l'effet de cette molécule sur l'expression de NR4A1 et de NR4A3 par nos populations de lymphocytes B en vue de thérapies possibles dans le contexte du VIH où NR4A est aussi diminué. Lors de l'étude de l'effet du DHE sur NR4A1 et 3, les intensités d'expressions ont été observées après 3 h d'incubation puisque les NR4As répondent rapidement et un temps d'incubation trop long aurait pu nous faire manquer sa réponse. Après 3 h d'incubation avec BAFF 50 ng/mL, les cellules démontrent une plus grande expression de NR4A1 qu'après 1 h

d'incubation. Une plus grande expression de NR4A1 est aussi observée après une incubation de 3 h avec BAFF et Nef comparativement à 1 h d'incubation. Notre dernier test, une incubation de 1 h et de 3 h avec BAFF, Nef, et DHE, illustre une plus basse expression de NR4A1 après 3 h, ce qui contredit la littérature qui démontre que le DHE augmente l'expression des NR4As. Nos tendances disant que lorsqu'ajoutée à BAFF, Nef diminue l'expression de NR4A1 comparativement à une incubation avec BAFF seul n'est non plus observée ici possiblement due au court temps d'incubation et au fait que NR4A1 est une molécule à expression rapide, menant à une plus grande expression après 3 h qu'après 16 h (524). Il serait possible que la diminution observée après incubation avec BAFF et Nef pendant 16 h reflète l'activité à long terme du NR4A tel ce qui est observé chez les patients atteints du VIH. En effet, les premières expériences effectuées avec une incubation de 16 h visaient à explorer l'expression de NR4A1, mais aussi de CD83, qui est une molécule à expression plus tardive. Il est donc sensé que de plus hauts niveaux de NR4A1 soient obtenus après une incubation plus courte. L'expression des molécules d'intérêt doit être étudiée à divers temps d'incubation afin d'obtenir une image plus complète de leur expression dans le temps. De plus, comme mentionné plus haut, l'effet de BAFF *in vitro* sur l'expression des NR4As semble dépendre des niveaux de BAFF du patient lors de la récolte des échantillons (figure 11), donc la variation de résultats obtenus chez différents patients est sensée. Nous avons ensuite décidé de refaire le test avec incubation de 3 h avec une plus grande concentration de BAFF (250 ng/mL).

Après 3 h d'incubation avec la nouvelle concentration de BAFF, les résultats reflètent maintenant les études antérieures qui décrivent une augmentation de l'expression des NR4As par le DHE. Pour les 3 populations étudiées, les cellules B totales, les cellules B MZ et les MZ précurseurs, les mêmes tendances sont observées. Une incubation avec BAFF et Nef résulte en une plus grande expression de NR4A1 comparé à une incubation avec BAFF seul, puis une incubation avec BAFF, Nef et DHE augmente encore plus l'expression de NR4A1. Pour NR4A3, une incubation avec BAFF et Nef engendre une plus basse expression de NR4A3 qu'une incubation avec BAFF seul, puis une incubation avec BAFF, Nef et DHE augmente l'expression de NR4A3 au niveau retrouvé après incubation avec BAFF seul, confirmant l'effet du DHE tel que décrit dans la littérature.

Sachant que NFkB joue un rôle dans l'activation de gènes inflammatoires, dont ceux activés dans le contexte d'une infection au VIH (535) et sachant que les NR4As contribuent à la modulation de NFkB où de hauts niveaux des NR4As diminuent l'expression de NFkB (536), une molécule augmentant l'expression des NR4As pourrait contribuer à la diminution de l'inflammation chez les gens atteints du VIH. En effet, un RNA-Seq effectué à l'IRIC (figure 7) démontre bien la diminution d'expression des NR4As et de CD83 chez les individus atteints du VIH comparativement aux contrôles sains et aux élites contrôleurs.

Aussi, Nef, par l'entremise de NFkB, interfère avec CD40, bloquant la permutation de classe des lymphocytes B et diminuant leur réponse antivirale T-dépendante (537). Donc, l'augmentation de NR4A par une molécule telle le DHE pourrait réduire les niveaux de NFkB, diminuant l'effet néfaste de Nef sur la permutation de classe et la réponse des lymphocytes B aux cellules Th CD4+. D'autres molécules telles le dexaméthasone et le méthotrexate (MTX) ont aussi été identifiés comme régulateurs des NR4As, plus spécifiquement du NR4A2, *in vitro* et *in vivo* (246). MTX fonctionne en diminuant l'infiltration cellulaire en diminuant l'expression de molécules d'adhésion en surface, menant à une réduction des niveaux de médiateurs d'inflammation solubles (538). Des études subséquentes suggèrent que l'effet anti-inflammatoire du MTX provient de sa capacité d'augmenter les niveaux extracellulaires d'adénosine menant à de plus hauts niveaux de NR4A2 (252).

5. Expression d'IL-10 par les cellules B MZ

Notre équipe a déjà démontré l'expression ex vivo d'IL-10 par les cellules B MZ matures (CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{hi}CD10⁻) ainsi que par les cellules B MZ précurseurs (CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{lo}CD10⁺), ces derniers démontrant une fréquence d'expression plus importante que son équivalent mature (204). Cette même étude et celles réalisées par Cerutti et coll. illustrent aussi l'augmentation d'expression d'IL-10 par les cellules B MZ précurseurs lorsque celles-ci sont en présence d'un excès de BAFF comme dans le contexte d'une infection au VIH chez les patients progressifs (539).

Une étude faite au préalable décrit une population similaire aux cellules B MZ précurseurs comme ayant un potentiel Breg. Cette activité régulatoire des cellules B peut leur être accordée par leur production d'IL-10, mais aussi par la production d'adénosine, de CD39 et de CD73, molécules d'intérêt dans ce projet (300). Notre équipe a aussi associé CD83, molécule avec propriétés régulatrices, avec un potentiel Breg chez les cellules B MZ. Notre article publié en 2019 suggère qu'une sous-population de cellules B MZ précurseurs aurait un potentiel Breg grâce à la co-expression de CD83 et NR4A1-3 (201). Plusieurs indices nous aident à déterminer le potentiel régulateur des cellules B, mais un marqueur clé désigné à l'identification des Bregs est toujours manquant puisque dans un contexte inflammatoire comme celui du VIH, l'expression d'IL-10 est observée chez plusieurs populations de lymphocytes B, contrairement au contexte inflammatoire de la souris.

Nous avons observé une production d'IL-10 par les lymphocytes B, notamment par les lymphocytes B immatures ainsi que les lymphocytes B du centre germinatif, la majorité des populations IL-10⁺ coexprimant CD10 et CD1c. Nos résultats illustrent aussi que Nef ne semble pas affecter la production d'IL-10 induite par BAFF dans les cellules B d'amygdales de patients sains. Par contre, l'effet de Nef sur l'IL-10 produit par les monocytes, macrophages et lymphocytes Th2 n'a pas été examiné dans le contexte de cette étude. En sus, l'analyse du RNA-Seq d'un collègue démontre l'expression de plusieurs molécules avec fonctions régulatrices souvent associées au potentiel Breg chez les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs. Ces molécules incluent HLA-G, CD1d, molécule exprimée par la majorité des Bregs chez l'humain et la souris (540), TGF- β , TLR10, TLR7 et IL-10R. L'expression du gène d'IL-10 semble être plus basse chez les 2 populations, ce qui pourrait être due à leur capacité de produire cette cytokine suivant une stimulation (540). Ces populations expriment aussi de hauts niveaux d'IL-10R suggérant une activité régulée entre autres par IL-10. Certaines molécules dont CD1a et IL-21R étaient principalement exprimées par les MZ précurseurs (201).

La littérature démontre le rôle de Nef dans l'augmentation des niveaux d'IL-10 (541), cette cytokine menant à une augmentation considérable de la production de virions chez les lignées cellulaires infectées au VIH (542). Il a aussi été démontré que le sérum des

patients VIH progressifs ayant de bas niveaux de CD4 et une haute réplication virale contiennent de hauts niveaux d'IL-10 (301). Brigino et coll. (1997) disent ne pas voir l'effet de Nef avant 3 h d'incubation, donc l'absence de l'effet de Nef sur nos cellules B d'amygdales pourrait découler d'un temps d'incubation insuffisant malgré avoir incubé nos cellules B 4h avec les différents traitements. Une différente étude ciblant les lymphocytes B démontre que Nef augmente l'inhibition de la signalisation d'IL-10, rendant les cellules B inaccessibles à l'aide fournie par les cellules T CD4⁺ (40). Cet effet de Nef sur les lymphocytes B inhibe leur permutation de classe et les mutations hypersomatiques, éliminant leur capacité de neutraliser les virus aux portes d'entrée, dont les muqueuses respiratoires, intestinales et génitales (419). Par contre, même si les lymphocytes B étaient capables d'une réponse T-dépendante, l'efficacité de l'aide procurée par les lymphocytes T risque manquer de vigueur dans le contexte du VIH.

Conclusion

Les objectifs principaux de cette étude étaient d'étudier *in vitro* si de niveaux élevés de BAFF seul ou en présence de la protéine virale Nef agissent directement sur l'expression des NR4As au niveau de populations de lymphocytes B MZ et MZ précurseurs d'amygdales humaines. Nous voulions examiner l'impact du DHE sur l'expression des NR4As ainsi que l'effet de Nef sur la production d'IL-10 par nos populations de lymphocytes B cibles afin d'analyser leur potentiel Breg. L'effet de BAFF et de Nef sur le profil des cellules avec caractéristiques Breg exprimant les NR4As, CD83, CD73, CD39 et IL-10 pourrait donc être analysé.

Les résultats obtenus lors de l'analyse des populations de lymphocytes B MZ et MZ précurseurs d'amygdales indiquent une expression importante de NR4A1 et CD83, marqueurs potentiels de Breg. Ces populations co-expriment aussi CD39 et CD73, molécules impliquées dans la production d'adénosine qui elle, régule l'expression de NR4A1. L'adénosine permet aussi une suppression immunitaire, conférant un potentiel Breg à la cellule (526).

Nos expériences démontrent la pénétration de Nef dans les lymphocytes B d'amygdales, surtout chez les B CD10⁺. Elles démontrent aussi que Nef semble avoir besoin de BAFF afin de pirater la machinerie intracellulaire des lymphocytes B puisque sans ce dernier, son effet sur l'expression de nos molécules cibles est moindre.

Après incubation avec BAFF et Nef, plusieurs tendances sont attribuables aux profils inflammatoires des différents donneurs. BAFF menait généralement à l'augmentation d'expression de nos molécules, mais lorsque combiné avec Nef, l'expression des molécules était plus basse. L'expression de CD83 et de NR4A1 après incubation avec BAFF et Nef dépend fortement du temps d'incubation, NR4A1 étant une molécule de réponse rapide et CD83 ayant une réponse plus tardive (524). Nous avons aussi conclu que la variabilité et l'hétérogénéité observées entre patients résultent de la variabilité des niveaux basaux de BAFF.

En ce qui concerne le DHE, son augmentation de l'expression de NR4A1 et 3 est plus importante chez les lymphocytes B MZ précurseurs que les MZ, et chez les MZ que les B totaux. De plus, le DHE augmente davantage l'expression de NR4A1 que de NR4A3. Ces molécules, diminuées dans le contexte d'une infection au VIH, pourraient être ciblées de façon thérapeutique afin de diminuer les niveaux inflammatoires des patients.

Nos résultats démontrent que l'expression d'IL-10 est principalement observée chez les lymphocytes B immatures et les lymphocytes B du centre germinatif. Malheureusement, l'effet de Nef sur la production d'IL-10 n'a pas été remarqué. D'autres tests devront être faits pour mieux comprendre le rôle de Nef dans la production d'IL-10 chez les lymphocytes B d'amygdales humaines.

En bref, BAFF à de hautes concentrations et Nef modulent l'expression des NR4As, CD83, CD73 et CD39 ce qui pourrait contribuer au phénotype observé chez les cellules B MZ des patients VIH+ où on observe une diminution de NR4A et de CD83 ainsi qu'une modulation de CD39 et de CD73. L'analyse des résultats de cette étude suggère l'utilité d'agents thérapeutiques ciblant les NR4As en addition à la thérapie antirétrovirale, leur modulation chez les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs pouvant être un aspect clé du contrôle des niveaux inflammatoires chez les individus vivant avec le VIH.

Perspectives

Plusieurs études sont encore nécessaires afin de bien comprendre l'impact des niveaux élevés de BAFF sur la dérégulation des lymphocytes B, particulièrement ceux de la zone marginale dans le contexte du VIH. La mesure des niveaux de NR4As par Q-PCR permettra de confirmer les résultats obtenus en cytométrie en flux avec NR4A1 et de tester la réponse de NR4A2 et 3 aux niveaux élevés de BAFF en présence de Nef. Il serait aussi intéressant d'étudier le résultat d'un traitement avec un régulateur synthétique des NR4As tel le DHE et d'explorer quelles autres populations démontrent une diminution des NR4As dans le contexte du VIH.

Le surnageant des différentes incubations de lymphocytes B a été conservé afin de faire la mesure des cytokines et de l'adénosine. Nous pourrions aussi faire des cultures de 5-7 jours en microplaques afin de mesurer les isotypes d'immunoglobulines par Multiplex. Ensuite, la vérification de la signalisation de l'adénosine récepteur des lymphocytes B peut être effectuée en utilisant un agoniste de celui-ci et en mesurant l'AMPc.

Finalement, une étude visant la mesure des niveaux basaux de BAFF d'un plus grand nombre de patients permettrait de catégoriser ceux-ci en groupe selon leur inflammation de base pour ensuite observer l'effet de BAFF et de Nef sur les NR4As, CD83, CD73 et CD39 dans chacune des catégories. Cette méthode mènerait sûrement à de tendances plus stables entre les patients. Puis, l'effet du DHE sur l'expression des différentes molécules inflammatoires pourrait être exploré selon le niveau inflammatoire de base du patient.

Bibliographie

1. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., . . . Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes. *Nature*, *397*(6718), 436-441. doi:10.1038/17130
2. Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P. A., . . . Sharp, P. M. (2003). Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*, *300*(5626), 1713. doi:10.1126/science.1080657
3. Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., & Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med*, *358*(15), 1590-1602. doi:10.1056/NEJMra0706737
4. Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
5. Mauclore, P., LouSSERT-Ajaka, I., Damond, F., Fagot, P., Souquieres, S., Monny Lobe, M., . . . Simon, F. (1997). Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids*, *11*(4), 445-453.
6. Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., . . . Delaporte, E. (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids*, *11*(4), 493-498.
7. Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., LouSSERT-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., . . . Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, *4*(9), 1032-1037. doi:10.1038/2017
8. Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., . . . Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, *15*(8), 871-872. doi:10.1038/nm.2016
9. Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., . . . Brennan, C. A. (2010). Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *26*(1), 109-115. doi:10.1089/aid.2009.0178
10. Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., . . . Brennan, C. A. (2011). Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol*, *85*(3), 1403-1407. doi:10.1128/jvi.02005-10

11. Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayoub, A., Bailes, E., Van Heuverswyn, F., Decker, J. M., . . . Hahn, B. H. (2009). Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J Virol*, *83*(4), 1635-1648. doi:10.1128/jvi.02311-08
12. Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., . . . Lemey, P. (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, *346*(6205), 56-61. doi:10.1126/science.1256739
13. Hymes, K. B., Cheung, T., Greene, J. B., Prose, N. S., Marcus, A., Ballard, H., . . . Laubenstein, L. J. (1981). Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases. *Lancet*, *2*(8247), 598-600.
14. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men—New York City and California. (1981). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *30*(25), 305-308.
15. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States. (1982). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *31*(26), 353-354, 360-351.
16. Fawzi, M. C., Lambert, W., Boehm, F., Finkelstein, J. L., Singler, J. M., Leandre, F., . . . Mukherjee, J. S. (2010). Economic risk factors for HIV infection among women in rural Haiti: implications for HIV prevention policies and programs in resource-poor settings. *J Womens Health (Larchmt)*, *19*(5), 885-892. doi:10.1089/jwh.2008.1334
17. (CDC), C. f. D. C. (1982). Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *31*(37), 507-508, 513-514.
18. Gallo, R. C. (2002). Historical essay. The early years of HIV/AIDS. *Science*, *298*(5599), 1728-1730. doi:10.1126/science.1078050
19. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., . . . et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, *233*(4761), 343-346.
20. Lekkerkerker, A. N., van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. (2006). Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr HIV Res*, *4*(2), 169-176.
21. UNAIDS. (2018). *Global HIV & AIDS statistics*. Retrieved from <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>

22. HIV/AIDS. Definition of Key Terms. Retrieved from <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/intro/keyterms/en/>
23. UNAIDS. (2018). *UNAIDS Data 2018*. Retrieved from http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaid-data-2018_en.pdf
24. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . Szustakowki, J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. doi:10.1038/35057062
25. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., & Butto, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, *46*(1), 5-14. doi:10.4415/ann_10_01_02
26. Engelman, A., & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, *10*(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2747
27. Wilen, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(8). doi:10.1101/cshperspect.a006866
28. Starcich, B., Ratner, L., Josephs, S. F., Okamoto, T., Gallo, R. C., & Wong-Staal, F. (1985). Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science*, *227*(4686), 538-540.
29. Berkhout, B., & Jeang, K. T. (1992). Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol*, *66*(1), 139-149.
30. Richter, S., Ping, Y. H., & Rana, T. M. (2002). TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(12), 7928-7933. doi:10.1073/pnas.122119999
31. Allan, J. S., Coligan, J. E., Lee, T. H., McLane, M. F., Kanki, P. J., Groopman, J. E., & Essex, M. (1985). A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science*, *230*(4727), 810-813.
32. Liu, L. X., Heveker, N., Fackler, O. T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., . . . Benarous, R. (2000). Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J Virol*, *74*(11), 5310-5319.

33. Sugden, S. M., Bego, M. G., Pham, T. N., & Cohen, E. A. (2016). Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses*, 8(3), 67. doi:10.3390/v8030067
34. Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., . . . Mills, J. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*, 270(5238), 988-991.
35. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., & Desrosiers, R. C. (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 332(4), 228-232. doi:10.1056/nejm199501263320405
36. Kestler, H. W., 3rd, Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., & Desrosiers, R. C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, 65(4), 651-662. doi:10.1016/0092-8674(91)90097-i
37. Laguette, N., Bregnard, C., Benichou, S., & Basmaciogullari, S. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med*, 31(5), 418-433. doi:10.1016/j.mam.2010.05.003
38. Derby, N., Martinelli, E., & Robbiani, M. (2011). Myeloid dendritic cells in HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 6(5), 379-384. doi:10.1097/COH.0b013e3283499d63
39. Kim, K. S., Park, J. Y., Jou, I., & Park, S. M. (2009). Functional implication of BAFF synthesis and release in gangliosides-stimulated microglia. *J Leukoc Biol*, 86(2), 349-359. doi:10.1189/jlb.1008659
40. Qiao, X., He, B., Chiu, A., Knowles, D. M., Chadburn, A., & Cerutti, A. (2006). Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol*, 7(3), 302-310. doi:10.1038/ni1302
41. Xu, W., Santini, P. A., Sullivan, J. S., He, B., Shan, M., Ball, S. C., . . . Cerutti, A. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol*, 10(9), 1008-1017. doi:10.1038/ni.1753
42. Moir, S., & Fauci, A. S. (2010). Nef, macrophages and B cells: a highway for evasion. *Immunol Cell Biol*, 88(1), 1-2. doi:10.1038/icb.2009.82

43. Chompre, G., Cruz, E., Maldonado, L., Rivera-Amill, V., Porter, J. T., & Noel, R. J., Jr. (2013). Astrocytic expression of HIV-1 Nef impairs spatial and recognition memory. *Neurobiol Dis*, 49, 128-136. doi:10.1016/j.nbd.2012.08.007
44. Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E., & Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, 76(5), 853-864.
45. Laguette, N., Bregnard, C., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., & Basmaciogullari, S. (2009). Nef-induced CD4 endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 host cells: role of p56lck kinase. *J Virol*, 83(14), 7117-7128. doi:10.1128/jvi.01648-08
46. Kim, Y. H., Chang, S. H., Kwon, J. H., & Rhee, S. S. (1999). HIV-1 Nef plays an essential role in two independent processes in CD4 down-regulation: dissociation of the CD4-p56(lck) complex and targeting of CD4 to lysosomes. *Virology*, 257(1), 208-219. doi:10.1006/viro.1999.9642
47. Rose, J. J., Janvier, K., Chandrasekhar, S., Sekaly, R. P., Bonifacino, J. S., & Venkatesan, S. (2005). CD4 down-regulation by HIV-1 and simian immunodeficiency virus (SIV) Nef proteins involves both internalization and intracellular retention mechanisms. *J Biol Chem*, 280(9), 7413-7426. doi:10.1074/jbc.M409420200
48. Garcia, J. V., & Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, 350(6318), 508-511. doi:10.1038/350508a0
49. Ross, T. M., Oran, A. E., & Cullen, B. R. (1999). Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol*, 9(12), 613-621.
50. Lama, J., Mangasarian, A., & Trono, D. (1999). Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol*, 9(12), 622-631.
51. Arganaraz, E. R., Schindler, M., Kirchhoff, F., Cortes, M. J., & Lama, J. (2003). Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *J Biol Chem*, 278(36), 33912-33919. doi:10.1074/jbc.M303679200
52. Wildum, S., Schindler, M., Munch, J., & Kirchhoff, F. (2006). Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human

- immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol*, 80(16), 8047-8059. doi:10.1128/jvi.00252-06
53. Kirchhoff, F., Schindler, M., Specht, A., Arhel, N., & Munch, J. (2008). Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 65(17), 2621-2636. doi:10.1007/s00018-008-8094-2
 54. Alkhatib, G., & Berger, E. A. (2007). HIV coreceptors: from discovery and designation to new paradigms and promise. *Eur J Med Res*, 12(9), 375-384.
 55. Paxton, W. A., Martin, S. R., Tse, D., O'Brien, T. R., Skurnick, J., VanDevanter, N. L., . . . Koup, R. A. (1996). Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med*, 2(4), 412-417.
 56. Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., . . . Weiss, R. A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature*, 391(6664), 240. doi:10.1038/34571
 57. Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., . . . Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(21), 7552-7557. doi:10.1073/pnas.0802203105
 58. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., & Landau, N. R. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med*, 185(4), 621-628.
 59. McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, 159(3), 441-452. doi:10.1083/jcb.200203150
 60. Greene, W. C., & Peterlin, B. M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*, 8(7), 673-680. doi:10.1038/nm0702-673
 61. Wu, Z., Alexandratos, J., Ericksen, B., Lubkowski, J., Gallo, R. C., & Lu, W. (2004). Total chemical synthesis of N-myristoylated HIV-1 matrix protein p17: structural and mechanistic implications of p17 myristoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), 11587-11592. doi:10.1073/pnas.0404649101
 62. Aiken, C., & Trono, D. (1995). Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol*, 69(8), 5048-5056.

63. Sundquist, W. I., & Krausslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006924. doi:10.1101/cshperspect.a006924
64. Bieniasz, P. D., Grdina, T. A., Bogerd, H. P., & Cullen, B. R. (1999). Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(14), 7791-7796.
65. Ne, E., Palstra, R. J., & Mahmoudi, T. (2018). Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter. *Int Rev Cell Mol Biol*, 335, 191-243. doi:10.1016/bs.ircmb.2017.07.011
66. Sierra, S., Kupfer, B., & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34(4), 233-244. doi:10.1016/j.jcv.2005.09.004
67. Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D. S., Cao, Y., Koup, R. A., & Ho, D. D. (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science*, 261(5125), 1179-1181.
68. Das, S. R., & Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res*, 121(4), 315-332.
69. Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., & Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*, 66(12), 7193-7200.
70. Ewart, G. D., Sutherland, T., Gage, P. W., & Cox, G. B. (1996). The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol*, 70(10), 7108-7115.
71. Rice, A. P. (2015). Roles of microRNAs and long-noncoding RNAs in human immunodeficiency virus replication. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 6(6), 661-670. doi:10.1002/wrna.1308
72. Prevention, C. f. D. C. a. (2018). HIV Transmission. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>
73. Hayes, R., & Weiss, H. (2006). Epidemiology. Understanding HIV epidemic trends in Africa. *Science*, 311(5761), 620-621. doi:10.1126/science.1124072
74. Haase, A. T. (2005). Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol*, 5(10), 783-792. doi:10.1038/nri1705

75. Shattock, R. J., & Moore, J. P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*, *1*(1), 25-34. doi:10.1038/nrmicro729
76. Hu, J., Gardner, M. B., & Miller, C. J. (2000). Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol*, *74*(13), 6087-6095. doi:10.1128/jvi.74.13.6087-6095.2000
77. Miller, C. J., Li, Q., Abel, K., Kim, E. Y., Ma, Z. M., Wietgreffe, S., . . . Haase, A. T. (2005). Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, *79*(14), 9217-9227. doi:10.1128/jvi.79.14.9217-9227.2005
78. Weiss, H. A., Dickson, K. E., Agot, K., & Hankins, C. A. (2010). Male circumcision for HIV prevention: current research and programmatic issues. *Aids*, *24 Suppl 4*, S61-69. doi:10.1097/01.aids.0000390708.66136.f4
79. Emau, P., Jiang, Y., Agy, M. B., Tian, B., Bekele, G., & Tsai, C. C. (2006). Post-exposure prophylaxis for SIV revisited: animal model for HIV prevention. *AIDS Res Ther*, *3*, 29. doi:10.1186/1742-6405-3-29
80. Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., . . . Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, *286*(5443), 1353-1357. doi:10.1126/science.286.5443.1353
81. Haase, A. T. (2010). Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*, *464*(7286), 217-223. doi:10.1038/nature08757
82. Kader, M., Wang, X., Piatak, M., Lifson, J., Roederer, M., Veazey, R., & Mattapallil, J. J. (2009). Alpha4(+)beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol*, *2*(5), 439-449. doi:10.1038/mi.2009.90
83. Stieh, D. J., Matias, E., Xu, H., Fought, A. J., Blanchard, J. L., Marx, P. A., . . . Hope, T. J. (2016). Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques. *Cell Host Microbe*, *19*(4), 529-540. doi:10.1016/j.chom.2016.03.005
84. Planas, D., Zhang, Y., Monteiro, P., Goulet, J. P., Gosselin, A., Grandvaux, N., . . . Ancuta, P. (2017). HIV-1 selectively targets gut-homing CCR6+CD4+ T cells via mTOR-dependent mechanisms. *JCI Insight*, *2*(15). doi:10.1172/jci.insight.93230

85. Lai, S. K., Hida, K., Shukair, S., Wang, Y. Y., Figueiredo, A., Cone, R., . . . Hanes, J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol*, *83*(21), 11196-11200. doi:10.1128/jvi.01899-08
86. Lee, H. Y., Giorgi, E. E., Keele, B. F., Gaschen, B., Athreya, G. S., Salazar-Gonzalez, J. F., . . . Perelson, A. S. (2009). Modeling sequence evolution in acute HIV-1 infection. *J Theor Biol*, *261*(2), 341-360. doi:10.1016/j.jtbi.2009.07.038
87. Moir, S., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*, *6*, 223-248. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254
88. Norvell, M. K., Benrubi, G. I., & Thompson, R. J. (1984). Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *J Reprod Med*, *29*(4), 269-271.
89. Pudney, J., Quayle, A. J., & Anderson, D. J. (2005). Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod*, *73*(6), 1253-1263. doi:10.1095/biolreprod.105.043133
90. Piatak, M., Jr., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., . . . Lifson, J. D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*, *259*(5102), 1749-1754.
91. Gupta, K. K. (1993). Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N Engl J Med*, *328*(4), 288-289. doi:10.1056/nejm199301283280419
92. Bangham, C. R. (2009). CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol*, *39*(7), 1700-1712. doi:10.1002/eji.200939451
93. Butto, S., Raimondo, M., Fanales-Belasio, E., & Suligo, B. (2010). Suggested strategies for the laboratory diagnosis of HIV infection in Italy. *Ann Ist Super Sanita*, *46*(1), 34-41. doi:10.4415/ann_10_01_05
94. Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D. R., & Mascola, J. R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med*, *15*(8), 866-870. doi:10.1038/nm.1949
95. Chung, A., Rollman, E., Johansson, S., Kent, S. J., & Stratov, I. (2008). The utility of ADCC responses in HIV infection. *Curr HIV Res*, *6*(6), 515-519.

96. Kahn, J. O., & Walker, B. D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 339(1), 33-39. doi:10.1056/nejm199807023390107
97. Fahey, J. V., Wright, J. A., Shen, L., Smith, J. M., Ghosh, M., Rossoll, R. M., & Wira, C. R. (2008). Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol*, 1(4), 317-325. doi:10.1038/mi.2008.20
98. Wira, C. R., Grant-Tschudy, K. S., & Crane-Godreau, M. A. (2005). Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol*, 53(2), 65-76. doi:10.1111/j.1600-0897.2004.00248.x
99. Dieu-Nosjean, M. C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Vicari, A., . . . Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med*, 192(5), 705-718. doi:10.1084/jem.192.5.705
100. Ford, E. S., Puro, C. E., & Sereti, I. (2009). Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS*, 4(3), 206-214. doi:10.1097/COH.0b013e328329c68c
101. Research, C. F. f. A. (2019). Stages of HIV Infection. Retrieved from <https://canfar.com/stages-of-hiv-infection/>
102. Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., . . . Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200(6), 749-759. doi:10.1084/jem.20040874
103. Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., . . . Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200(6), 761-770. doi:10.1084/jem.20041196
104. Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A., & Chen, I. S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*, 61(2), 213-222.
105. Hermankova, M., Siliciano, J. D., Zhou, Y., Monie, D., Chadwick, K., Margolick, J. B., . . . Siliciano, R. F. (2003). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol*, 77(13), 7383-7392.

106. Pantaleo, G., & Fauci, A. S. (1996). Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*, 50, 825-854. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.825
107. Fontaine, J., Chagnon-Choquet, J., Valcke, H. S., Poudrier, J., & Roger, M. (2011). High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood*, 117(1), 145-155. doi:10.1182/blood-2010-08-301887
108. Brooks, J. T., Kaplan, J. E., Holmes, K. K., Benson, C., Pau, A., & Masur, H. (2009). HIV-associated opportunistic infections--going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis*, 48(5), 609-611. doi:10.1086/596756
109. Clifford, G. M., & Franceschi, S. (2009). Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4(+) count. *Future Oncol*, 5(5), 669-678. doi:10.2217/fon.09.28
110. Broder, S. (2010). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res*, 85(1), 1-18. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.002
111. Lederman, M. M., Connick, E., Landay, A., Kuritzkes, D. R., Spritzler, J., St Clair, M., . . . Kessler, H. (1998). Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis*, 178(1), 70-79.
112. Zolopa, A. R. (2010). The evolution of HIV treatment guidelines: current state-of-the-art of ART. *Antiviral Res*, 85(1), 241-244. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.018
113. Kirtane, A. R., Langer, R., & Traverso, G. (2016). Past, Present, and Future Drug Delivery Systems for Antiretrovirals. *J Pharm Sci*, 105(12), 3471-3482. doi:10.1016/j.xphs.2016.09.015
114. Silva, B. F., Peixoto, G., da Luz, S. R., de Moraes, S., & Peres, S. B. (2019). Adverse effects of chronic treatment with the Main subclasses of highly active antiretroviral therapy: a systematic review. *HIV Med*. doi:10.1111/hiv.12733
115. Bernelli, C., Danzi, G. B., Cerrato, E., Pierini, S., Ornaghi, M. G., Botta, L., . . . Squillace, N. (2019). Cardiovascular Events Recurrence and Coronary Artery Disease in HIV Patients: The Price We Have to Pay for the Chronicization of the Disease. *Can J Cardiol*. doi:10.1016/j.cjca.2019.07.636

116. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., & Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, *194*(6), 863-869. doi:10.1084/jem.194.6.863
117. Fukuda, M., Sasaki, Y., Sakamoto, M., Noguchi, M., & Saijo, N. (1990). Primary lung cancer in an 18-year-old boy: case report. *Jpn J Clin Oncol*, *20*(2), 177-181. doi:10.1093/oxfordjournals.jjco.a039384
118. Gould, J. B., Lee, A. F., James, O., Sander, L., Teager, H., & Fineberg, N. (1977). The sleep state characteristics of apnea during infancy. *Pediatrics*, *59*(2), 182-194.
119. Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., . . . Margottin-Goguet, F. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*, *13*(3), 223-228. doi:10.1038/ni.2236
120. Donaghy, H., Stebbing, J., & Patterson, S. (2004). Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis*, *17*(1), 1-6.
121. Wu, L., & KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, *6*(11), 859-868. doi:10.1038/nri1960
122. Wijewardana, V., Soloff, A. C., Liu, X., Brown, K. N., & Barratt-Boyes, S. M. (2010). Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog*, *6*(12), e1001235. doi:10.1371/journal.ppat.1001235
123. Debicki, P., Astrahan, M. A., Ameye, F., Oyen, R., Baert, L., Haczewski, A., & Petrovich, Z. (1992). Temperature steering in prostate by simultaneous transurethral and transrectal hyperthermia. *Urology*, *40*(4), 300-307. doi:10.1016/0090-4295(92)90376-8
124. Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., Goh, L. E., Perrin, L., McDade, H., . . . Andersson, J. (2002). Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *Aids*, *16*(5), 683-692. doi:10.1097/00002030-200203290-00003
125. Che, K. F., Sabado, R. L., Shankar, E. M., Tjomsland, V., Messmer, D., Bhardwaj, N., . . . Larsson, M. (2010). HIV-1 impairs in vitro priming of naive T

- cells and gives rise to contact-dependent suppressor T cells. *Eur J Immunol*, 40(8), 2248-2258. doi:10.1002/eji.201040377
126. Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., & Bhardwaj, N. (2011). DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 176-186. doi:10.1038/nri2935
 127. Tavano, B., Galao, R. P., Graham, D. R., Neil, S. J., Aquino, V. N., Fuchs, D., & Boasso, A. (2013). Ig-like transcript 7, but not bone marrow stromal cell antigen 2 (also known as HM1.24, tetherin, or CD317), modulates plasmacytoid dendritic cell function in primary human blood leukocytes. *J Immunol*, 190(6), 2622-2630. doi:10.4049/jimmunol.1202391
 128. Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., & Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*, 98(8), 2574-2576. doi:10.1182/blood.v98.8.2574
 129. Levy, J. A. (2009). HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *Aids*, 23(2), 147-160. doi:10.1097/QAD.0b013e3283217f9f
 130. Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569. doi:10.1182/blood-2008-05-078154
 131. Gulzar, N., & Copeland, K. F. (2004). CD8+ T-cells: function and response to HIV infection. *Curr HIV Res*, 2(1), 23-37.
 132. Doitsh, G., & Greene, W. C. (2016). Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe*, 19(3), 280-291. doi:10.1016/j.chom.2016.02.012
 133. Miyamoto, M., Prause, O., Sjostrand, M., Laan, M., Lotvall, J., & Linden, A. (2003). Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol*, 170(9), 4665-4672.
 134. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198(12), 1875-1886. doi:10.1084/jem.20030152
 135. Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N. A., Dercksen, M. W., de Goede, R. E., van Steenwijk, R. P., . . . Tersmette, M. (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression

- of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*, 66(3), 1354-1360.
136. Valverde-Villegas, J. M., Matte, M. C., de Medeiros, R. M., & Chies, J. A. (2015). New Insights about Treg and Th17 Cells in HIV Infection and Disease Progression. *J Immunol Res*, 2015, 647916. doi:10.1155/2015/647916
 137. Appay, V., & Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*, 214(2), 231-241. doi:10.1002/path.2276
 138. Leal, F. E., Premeaux, T. A., Abdel-Mohsen, M., & Ndhlovu, L. C. (2017). Role of Natural Killer Cells in HIV-Associated Malignancies. *Front Immunol*, 8, 315. doi:10.3389/fimmu.2017.00315
 139. Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O'Neil, S. P., McClure, H. M., . . . Feinberg, M. B. (2003). Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*, 18(3), 441-452.
 140. Hazenberg, M. D., Otto, S. A., van Benthem, B. H., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Lange, J. M., . . . Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids*, 17(13), 1881-1888. doi:10.1097/01.aids.0000076311.76477.6e
 141. Rieckmann, P., Poli, G., Fox, C. H., Kehrl, J. H., & Fauci, A. S. (1991). Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not from seronegative donors. *J Immunol*, 147(9), 2922-2927.
 142. Wang, J. K., Kiyokawa, E., Verdin, E., & Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1), 394-399. doi:10.1073/pnas.97.1.394
 143. Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V. G., Williams, K., . . . Stevenson, M. (1999). HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med*, 5(9), 997-1003. doi:10.1038/12433
 144. Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., . . . Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12(12), 1365-1371. doi:10.1038/nm1511

145. Tonegawa, S. (1987). [Molecular biology of immunologic recognition]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 32(3), 239-250.
146. Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11(1), 137-154. doi:10.2215/cjn.09430915
147. Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2014). Antibody Structure. *Microbiol Spectr*, 2(2). doi:10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013
148. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), 959-971. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046
149. van Zelm, M. C., Szczepanski, T., van der Burg, M., & van Dongen, J. J. (2007). Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med*, 204(3), 645-655. doi:10.1084/jem.20060964
150. Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 5(7), 578-584. doi:10.1038/nri1649
151. Pillai, S., & Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*, 9(11), 767-777. doi:10.1038/nri2656
152. Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 118-132. doi:10.1038/nri3383
153. Thomas, M. D., Srivastava, B., & Allman, D. (2006). Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol*, 239(2), 92-102. doi:10.1016/j.cellimm.2006.04.007
154. Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T., & Vilen, B. J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol*, 7(8), 633-643. doi:10.1038/nri2133
155. Meffre, E., & Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 20(6), 632-638. doi:10.1016/j.coi.2008.09.001
156. Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J. C., Flavell, R. A., & Goodnow, C. C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas

- (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, 87(2), 319-329. doi:10.1016/s0092-8674(00)81349-5
157. Herve, M., Isnardi, I., Ng, Y. S., Bussel, J. B., Ochs, H. D., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2007). CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance. *J Exp Med*, 204(7), 1583-1593. doi:10.1084/jem.20062287
158. Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., & Zheng, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol*, 17, 221-253. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.221
159. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., & Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*, 8(5), 463-470. doi:10.1038/ni1454
160. Yuling, H., Ruijing, X., Xiang, J., Yanping, J., Lang, C., Li, L., . . . Jinqian, T. (2008). CD19+CD5+ B cells in primary IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 19(11), 2130-2139. doi:10.1681/asn.2007121303
161. Griffin, D. O., Holodick, N. E., & Rothstein, T. L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med*, 208(1), 67-80. doi:10.1084/jem.20101499
162. Tangye, S. G. (2013). To B1 or not to B1: that really is still the question! *Blood*, 121(26), 5109-5110. doi:10.1182/blood-2013-05-500074
163. Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J., & MacLennan, I. C. (1992). Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today*, 13(1), 17-21. doi:10.1016/0167-5699(92)90199-h
164. Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
165. Scheeren, F. A., Nagasawa, M., Weijer, K., Cupedo, T., Kirberg, J., Legrand, N., & Spits, H. (2008). T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med*, 205(9), 2033-2042. doi:10.1084/jem.20070447
166. Weller, S., Bonnet, M., Delagreverie, H., Israel, L., Chrabieh, M., Marodi, L., . . . Reynaud, C. A. (2012). IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-

- 4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood*, 120(25), 4992-5001. doi:10.1182/blood-2012-07-440776
167. Cyster, J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*, 23, 127-159. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628
168. Kerfoot, S. M., Yaari, G., Patel, J. R., Johnson, K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein, S. H., & Haberman, A. M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*, 34(6), 947-960. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.024
169. Green, J. A., & Cyster, J. G. (2012). S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev*, 247(1), 36-51. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01114.x
170. Poudrier, J., & Owens, T. (1994). 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*, 179(5), 1417-1427. doi:10.1084/jem.179.5.1417
171. Poudrier, J., & Owens, T. (1994). Co-stimulation by anti-immunoglobulin is required for B cell activation by CD40Llow T cells. *Eur J Immunol*, 24(12), 2993-2999. doi:10.1002/eji.1830241211
172. Victora, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 30, 429-457. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075032
173. Wykes, M., Poudrier, J., Lindstedt, R., & Gray, D. (1998). Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur J Immunol*, 28(2), 548-559. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199802)28:02<548::Aid-immu548>3.0.Co;2-2
174. Shlomchik, M. J., & Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev*, 247(1), 52-63. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01124.x
175. Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., & MacLennan, I. C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*, 342(6252), 929-931. doi:10.1038/342929a0

176. Honjo, T., Kinoshita, K., & Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*, 20, 165-196. doi:10.1146/annurev.immunol.20.090501.112049
177. MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 12, 117-139. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001
178. Thorbecke, G. J., Amin, A. R., & Tsiagbe, V. K. (1994). Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *Faseb j*, 8(11), 832-840. doi:10.1096/fasebj.8.11.8070632
179. Mosier, D. E., Mond, J. J., & Goldings, E. A. (1977). The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect. *J Immunol*, 119(6), 1874-1878.
180. Lesinski, G. B., & Westerink, M. A. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods*, 47(2), 135-149.
181. Mond, J. J., Scher, I., Mosier, D. E., Baese, M., & Paul, W. E. (1978). T-independent responses in B cell-defective CBA/N mice to Brucella abortus and to trinitrophenyl (TNP) conjugates of Brucella abortus. *Eur J Immunol*, 8(7), 459-463. doi:10.1002/eji.1830080703
182. Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z., & Vogelstein, B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(10), 3671-3675. doi:10.1073/pnas.73.10.3671
183. Li, Z., Wahl, M. I., Eguinoa, A., Stephens, L. R., Hawkins, P. T., & Witte, O. N. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase-gamma activates Bruton's tyrosine kinase in concert with Src family kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13820-13825. doi:10.1073/pnas.94.25.13820
184. Nisitani, S., Kato, R. M., Rawlings, D. J., Witte, O. N., & Wahl, M. I. (1999). In situ detection of activated Bruton's tyrosine kinase in the Ig signaling complex by phosphopeptide-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2221-2226. doi:10.1073/pnas.96.5.2221
185. Pecanha, L. M., Snapper, C. M., Finkelman, F. D., & Mond, J. J. (1991). Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence. *J Immunol*, 146(3), 833-839.

186. Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., & Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*, 176, 154-170.
187. Senger, K., Hackney, J., Payandeh, J., & Zarrin, A. A. (2015). Antibody Isotype Switching in Vertebrates. *Results Probl Cell Differ*, 57, 295-324. doi:10.1007/978-3-319-20819-0_13
188. Chen, K., & Cerutti, A. (2010). New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev*, 237(1), 160-179. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x
189. Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N. W., Bengten, E., . . . Cerutti, A. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol*, 10(8), 889-898. doi:10.1038/ni.1748
190. Agarwal, S., & Cunningham-Rundles, C. (2007). Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 99(3), 281-283. doi:10.1016/s1081-1206(10)60665-5
191. Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., & Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*, 1(1), 11-22. doi:10.1038/mi.2007.6
192. Cerutti, A., Chen, K., & Chorny, A. (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol*, 29, 273-293. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101317
193. Cerutti, A., & Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28(6), 740-750. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.001
194. Oettgen, H. C. (2016). Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 137(6), 1631-1645. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.009
195. Oleinika, K., Rosser, E. C., Matei, D. E., Nistala, K., Bosma, A., Drozdov, I., & Mauri, C. (2018). CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nat Commun*, 9(1), 684. doi:10.1038/s41467-018-02911-y
196. Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J., & Launois, P. (2010). Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with

- Leishmania major through IL-10 production. *J Immunol*, 184(2), 886-894.
doi:10.4049/jimmunol.0901114
197. Liu, J., Zhan, W., Kim, C. J., Clayton, K., Zhao, H., Lee, E., . . . Ostrowski, M. (2014). IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PLoS One*, 9(2), e89236.
doi:10.1371/journal.pone.0089236
198. Mauri, C., & Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*, 27(10), 479-486. doi:10.1093/intimm/dxv038
199. Andreani, G., Ouellet, M., Menasria, R., Gomez, A. M., Barat, C., & Tremblay, M. J. (2015). Leishmania infantum amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(2), e0003543. doi:10.1371/journal.pntd.0003543
200. Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A. R., Khanna, P., Peppas, D., . . . Maini, M. K. (2012). IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol*, 189(8), 3925-3935.
doi:10.4049/jimmunol.1103139
201. Doyon-Laliberte, K., Chagnon-Choquet, J., Byrns, M., Aranguren, M., Memmi, M., Chrobak, P., . . . Roger, M. (2019). NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel)*, 8(4). doi:10.3390/antib8040050
202. Dai, Y. C., Zhong, J., & Xu, J. F. (2017). Regulatory B cells in infectious disease (Review). *Mol Med Rep*, 16(1), 3-10. doi:10.3892/mmr.2017.6605
203. Jeong, Y. I., Hong, S. H., Cho, S. H., Lee, W. J., & Lee, S. E. (2012). Induction of IL-10-producing CD1d^{high}CD5⁺ regulatory B cells following Babesia microti-infection. *PLoS One*, 7(10), e46553. doi:10.1371/journal.pone.0046553
204. Chagnon-Choquet, J., Fontaine, J., Poudrier, J., & Roger, M. (2014). IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS One*, 9(7), e101949. doi:10.1371/journal.pone.0101949
205. Leonard, J. A., Filzen, T., Carter, C. C., Schaefer, M., & Collins, K. L. (2011). HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that share common elements. *J Virol*, 85(14), 6867-6881. doi:10.1128/jvi.00229-11

206. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Hasko, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*, *13*(12), 842-857. doi:10.1038/nrc3613
207. Beavis, P. A., Stagg, J., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*, *33*(5), 231-237. doi:10.1016/j.it.2012.02.009
208. Yegutkin, G. G. (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *49*(6), 473-497. doi:10.3109/10409238.2014.953627
209. Linden, J., & Cekic, C. (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *32*(9), 2097-2103. doi:10.1161/atvbaha.111.226837
210. Salmi, M., & Jalkanen, S. (2005). Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol*, *5*(10), 760-771. doi:10.1038/nri1705
211. Hasko, G., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*, *25*(1), 33-39.
212. Iwase, T., Shinji, H., Tajima, A., Sato, F., Tamura, T., Iwamoto, T., . . . Mizunoe, Y. (2010). Isolation and identification of ATP-secreting bacteria from mice and humans. *J Clin Microbiol*, *48*(5), 1949-1951. doi:10.1128/jcm.01941-09
213. Kaku, H., Cheng, K. F., Al-Abed, Y., & Rothstein, T. L. (2014). A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol*, *193*(12), 5904-5913. doi:10.4049/jimmunol.1400336
214. Figueiro, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M., & Whiteside, T. L. (2016). Phenotypic and functional characteristics of CD39(high) human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology*, *5*(2), e1082703. doi:10.1080/2162402x.2015.1082703
215. Yamashita, Y., Hooker, S. W., Jiang, H., Laurent, A. B., Resta, R., Khare, K., . . . Thompson, L. F. (1998). CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol*, *28*(10), 2981-2990. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199810)28:10<2981::Aid-immu2981>3.0.Co;2-d

216. Anderson, S. M., Tomayko, M. M., Ahuja, A., Haberman, A. M., & Shlomchik, M. J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J Exp Med*, 204(9), 2103-2114. doi:10.1084/jem.20062571
217. Burnstock, G., & Boeynaems, J. M. (2014). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal*, 10(4), 529-564. doi:10.1007/s11302-014-9427-2
218. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., . . . Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204(6), 1303-1310. doi:10.1084/jem.20062129
219. Sitkovsky, M. V. (2009). T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol*, 30(3), 102-108. doi:10.1016/j.it.2008.12.002
220. Mandapathil, M., Hildorfer, B., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., . . . Whiteside, T. L. (2010). Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*, 285(10), 7176-7186. doi:10.1074/jbc.M109.047423
221. Desai, A., Victor-Vega, C., Gadangi, S., Montesinos, M. C., Chu, C. C., & Cronstein, B. N. (2005). Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1406-1413. doi:10.1124/mol.104.007807
222. Montesinos, M. C., Shaw, J. P., Yee, H., Shamamian, P., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol*, 164(6), 1887-1892. doi:10.1016/s0002-9440(10)63749-2
223. Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C. S., Cheng, D., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 122(1), 9-18. doi:10.1182/blood-2013-02-482406
224. Moir, S., & Fauci, A. S. (2014). B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation. *Curr Opin HIV AIDS*, 9(5), 472-477. doi:10.1097/coh.0000000000000092
225. Nicholas, K. J., Zern, E. K., Barnett, L., Smith, R. M., Lorey, S. L., Copeland, C. A., . . . Kalams, S. A. (2013). B cell responses to HIV antigen are a potent

- correlate of viremia in HIV-1 infection and improve with PD-1 blockade. *PLoS One*, 8(12), e84185. doi:10.1371/journal.pone.0084185
226. Algars, A., Karikoski, M., Yegutkin, G. G., Stoitzner, P., Niemela, J., Salmi, M., & Jalkanen, S. (2011). Different role of CD73 in leukocyte trafficking via blood and lymph vessels. *Blood*, 117(16), 4387-4393. doi:10.1182/blood-2010-11-321646
 227. Feoktistov, I., & Biaggioni, I. (2011). Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol*, 61, 115-144. doi:10.1016/b978-0-12-385526-8.00005-9
 228. Kim, E. S., Ackermann, C., Toth, I., Dierks, P., Eberhard, J. M., Wroblewski, R., . . . Schulze Zur Wiesch, J. (2017). Down-regulation of CD73 on B cells of patients with viremic HIV correlates with B cell activation and disease progression. *J Leukoc Biol*, 101(5), 1263-1271. doi:10.1189/jlb.5A0816-346R
 229. Brennan, F. M., & McInnes, I. B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 118(11), 3537-3545. doi:10.1172/jci36389
 230. McInnes, I. B., & Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7(6), 429-442. doi:10.1038/nri2094
 231. Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., . . . Laudet, V. (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 798-836. doi:10.1124/pr.58.4.10
 232. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 685-704. doi:10.1124/pr.58.4.2
 233. Giguere, V. (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev*, 29(6), 677-696. doi:10.1210/er.2008-0017
 234. Wansa, K. D., Harris, J. M., Yan, G., Ordentlich, P., & Muscat, G. E. (2003). The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem*, 278(27), 24776-24790. doi:10.1074/jbc.M300088200
 235. Mohan, H. M., Aherne, C. M., Rogers, A. C., Baird, A. W., Winter, D. C., & Murphy, E. P. (2012). Molecular pathways: the role of NR4A orphan nuclear

- receptors in cancer. *Clin Cancer Res*, 18(12), 3223-3228. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-2953
236. Won, H. Y., & Hwang, E. S. (2016). Transcriptional modulation of regulatory T cell development by novel regulators NR4As. *Arch Pharm Res*, 39(11), 1530-1536. doi:10.1007/s12272-016-0803-z
237. Ranhotra, H. S. (2015). The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *J Recept Signal Transduct Res*, 35(2), 184-188. doi:10.3109/10799893.2014.948555
238. Wansa, K. D., Harris, J. M., & Muscat, G. E. (2002). The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem*, 277(36), 33001-33011. doi:10.1074/jbc.M203572200
239. Deutsch, A. J., Angerer, H., Fuchs, T. E., & Neumeister, P. (2012). The nuclear orphan receptors NR4A as therapeutic target in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(9), 1001-1014.
240. Safe, S., Jin, U. H., Morpurgo, B., Abudayyeh, A., Singh, M., & Tjalkens, R. B. (2016). Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 157, 48-60. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.04.016
241. Murphy, E. P., & Crean, D. (2015). Molecular Interactions between NR4A Orphan Nuclear Receptors and NF-kappaB Are Required for Appropriate Inflammatory Responses and Immune Cell Homeostasis. *Biomolecules*, 5(3), 1302-1318. doi:10.3390/biom5031302
242. Paillasse, M. R., & de Medina, P. (2015). The NR4A nuclear receptors as potential targets for anti-aging interventions. *Med Hypotheses*, 84(2), 135-140. doi:10.1016/j.mehy.2014.12.003
243. Pearen, M. A., & Muscat, G. E. (2010). Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol*, 24(10), 1891-1903. doi:10.1210/me.2010-0015
244. McMorrow, J. P., & Murphy, E. P. (2011). Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem Soc Trans*, 39(2), 688-693. doi:10.1042/bst0390688
245. Holla, V. R., Mann, J. R., Shi, Q., & DuBois, R. N. (2006). Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. *J Biol Chem*, 281(5), 2676-2682. doi:10.1074/jbc.M507752200

246. Murphy, E. P., McEvoy, A., Conneely, O. M., Bresnihan, B., & FitzGerald, O. (2001). Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, *44*(4), 782-793. doi:10.1002/1529-0131(200104)44:4<782::Aid-anr134>3.0.Co;2-h
247. Pei, L., Castrillo, A., Chen, M., Hoffmann, A., & Tontonoz, P. (2005). Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem*, *280*(32), 29256-29262. doi:10.1074/jbc.M502606200
248. Aherne, C. M., McMorrow, J., Kane, D., FitzGerald, O., Mix, K. S., & Murphy, E. P. (2009). Identification of NR4A2 as a transcriptional activator of IL-8 expression in human inflammatory arthritis. *Mol Immunol*, *46*(16), 3345-3357. doi:10.1016/j.molimm.2009.07.019
249. Ordentlich, P., Yan, Y., Zhou, S., & Heyman, R. A. (2003). Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J Biol Chem*, *278*(27), 24791-24799. doi:10.1074/jbc.M302167200
250. Ralph, J. A., McEvoy, A. N., Kane, D., Bresnihan, B., FitzGerald, O., & Murphy, E. P. (2005). Modulation of orphan nuclear receptor NURR1 expression by methotrexate in human inflammatory joint disease involves adenosine A2A receptor-mediated responses. *J Immunol*, *175*(1), 555-565. doi:10.4049/jimmunol.175.1.555
251. Boudreaux, S. P., Duren, R. P., Call, S. G., Nguyen, L., Freire, P. R., Narayanan, P., . . . Conneely, O. M. (2019). Drug targeting of NR4A nuclear receptors for treatment of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *33*(1), 52-63. doi:10.1038/s41375-018-0174-1
252. Chan, E. S., & Cronstein, B. N. (2010). Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol*, *6*(3), 175-178. doi:10.1038/nrrheum.2010.5
253. Pei, L., Castrillo, A., & Tontonoz, P. (2006). Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol Endocrinol*, *20*(4), 786-794. doi:10.1210/me.2005-0331
254. Arkenbout, E. K., de Waard, V., van Bragt, M., van Achterberg, T. A., Grimbergen, J. M., Pichon, B., . . . de Vries, C. J. (2002). Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation*, *106*(12), 1530-1535. doi:10.1161/01.cir.0000028811.03056.bf

255. Bonta, P. I., Pols, T. W., van Tiel, C. M., Vos, M., Arkenbout, E. K., Rohlena, J., . . . de Vries, C. J. (2010). Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. *Circulation*, *121*(18), 2023-2032. doi:10.1161/circulationaha.109.885673
256. Li, X., & Zheng, Y. (2015). Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol*, *36*(6), 344-353. doi:10.1016/j.it.2015.04.006
257. Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev*, *241*(1), 260-268. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x
258. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, *133*(5), 775-787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009
259. Ohkura, N., Kitagawa, Y., & Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, *38*(3), 414-423. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.002
260. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., . . . Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, *27*(1), 20-21. doi:10.1038/83713
261. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Inoue, N., Morita, R., Hori, S., Waldmann, H., . . . Yoshimura, A. (2011). The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat Commun*, *2*, 269. doi:10.1038/ncomms1272
262. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Yoshida, R., Fukaya, T., Morita, R., Kimura, A., . . . Yoshimura, A. (2013). Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol*, *14*(3), 230-237. doi:10.1038/ni.2520
263. Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R. J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., . . . Gerondakis, S. (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med*, *206*(13), 3001-3014. doi:10.1084/jem.20091411
264. Gras, G., Richard, Y., Roques, P., Olivier, R., & Dormont, D. (1993). Complement and virus-specific antibody-dependent infection of normal B lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1. *Blood*, *81*(7), 1808-1818.

265. Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T. W., Lowe, T., Adelsberger, J., . . . Fauci, A. S. (2000). B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, *192*(5), 637-646. doi:10.1084/jem.192.5.637
266. Wu, L., Martin, T. D., Carrington, M., & KewalRamani, V. N. (2004). Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology*, *318*(1), 17-23. doi:10.1016/j.virol.2003.09.028
267. Moir, S., Malaspina, A., Pickeral, O. K., Donoghue, E. T., Vasquez, J., Miller, N. J., . . . Fauci, A. S. (2004). Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med*, *200*(5), 587-599. doi:10.1084/jem.20032236
268. van Grevenynghe, J., Cubas, R. A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., . . . Haddad, E. K. (2011). Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest*, *121*(10), 3877-3888. doi:10.1172/jci59211
269. Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A. C., O'Shea, M. A., . . . Fauci, A. S. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*, *205*(8), 1797-1805. doi:10.1084/jem.20072683
270. Lane, H. C., Masur, H., Edgar, L. C., Whalen, G., Rook, A. H., & Fauci, A. S. (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, *309*(8), 453-458. doi:10.1056/nejm198308253090803
271. Buckner, C. M., Moir, S., Ho, J., Wang, W., Posada, J. G., Kardava, L., . . . Fauci, A. S. (2013). Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J Virol*, *87*(10), 5800-5811. doi:10.1128/jvi.00094-13
272. Kruetzmann, S., Rosado, M. M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H. H., . . . Carsetti, R. (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med*, *197*(7), 939-945. doi:10.1084/jem.20022020
273. Klein, U., Rajewsky, K., & Kuppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, *188*(9), 1679-1689. doi:10.1084/jem.188.9.1679

274. Moir, S., & Fauci, A. S. (2017). B-cell responses to HIV infection. *Immunol Rev*, 275(1), 33-48. doi:10.1111/imr.12502
275. Kardava, L., Moir, S., Shah, N., Wang, W., Wilson, R., Buckner, C. M., . . . Fauci, A. S. (2014). Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest*, 124(7), 3252-3262. doi:10.1172/jci74351
276. Titanji, K., Chiodi, F., Bellocco, R., Schepis, D., Osorio, L., Tassandin, C., . . . De Milito, A. (2005). Primary HIV-1 infection sets the stage for important B lymphocyte dysfunctions. *Aids*, 19(17), 1947-1955. doi:10.1097/01.aids.0000191231.54170.89
277. Rethi, B., Sammiceli, S., Amu, S., Pensieroso, S., Hejdeman, B., Schepis, D., . . . Chiodi, F. (2013). Concerted effect of lymphopenia, viraemia and T-cell activation on Fas expression of peripheral B cells in HIV-1-infected patients. *Aids*, 27(2), 155-162. doi:10.1097/QAD.0b013e32835b8c5e
278. Cagigi, A., Mowafi, F., Phuong Dang, L. V., Tenner-Racz, K., Atlas, A., Grutzmeier, S., . . . Nilsson, A. (2008). Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood*, 112(12), 4401-4410. doi:10.1182/blood-2008-02-140426
279. Vinuesa, C. G. (2012). HIV and T follicular helper cells: a dangerous relationship. *J Clin Invest*, 122(9), 3059-3062. doi:10.1172/jci65175
280. Moir, S., Buckner, C. M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A. J., . . . Fauci, A. S. (2010). B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*, 116(25), 5571-5579. doi:10.1182/blood-2010-05-285528
281. Kekow, J., Hobusch, G., & Gross, W. L. (1988). Predominance of the IgG1 subclass in the hypergammaglobulinemia observed in pre-AIDS and AIDS. *Cancer Detect Prev*, 12(1-6), 211-216.
282. Nixon, D. E., & Landay, A. L. (2010). Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 498-503. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed6f4
283. Mir, K. D., Mavigner, M., & Silvestri, G. (2012). The myeloid cytokine network in AIDS pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 23(4-5), 223-231. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.05.009

284. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2010). Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol Rev*, 236, 265-275. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00910.x
285. He, B., Qiao, X., Klasse, P. J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D. M., . . . Cerutti, A. (2006). HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol*, 176(7), 3931-3941. doi:10.4049/jimmunol.176.7.3931
286. Amu, S., Ruffin, N., Rethi, B., & Chiodi, F. (2013). Impairment of B-cell functions during HIV-1 infection. *Aids*, 27(15), 2323-2334. doi:10.1097/QAD.0b013e328361a427
287. Ho, J., Moir, S., Malaspina, A., Howell, M. L., Wang, W., DiPoto, A. C., . . . Fauci, A. S. (2006). Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51), 19436-19441. doi:10.1073/pnas.0609515103
288. Haynes, B. F., Fleming, J., St Clair, E. W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., . . . Alam, S. M. (2005). Cardiophilin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*, 308(5730), 1906-1908. doi:10.1126/science.1111781
289. Stacey, A. R., Norris, P. J., Qin, L., Haygreen, E. A., Taylor, E., Heitman, J., . . . Borrow, P. (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol*, 83(8), 3719-3733. doi:10.1128/jvi.01844-08
290. Roberts, L., Passmore, J. A., Williamson, C., Little, F., Bebell, L. M., Mlisana, K., . . . Karim, S. S. (2010). Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *Aids*, 24(6), 819-831. doi:10.1097/QAD.0b013e3283367836
291. Gay, C., Dibben, O., Anderson, J. A., Stacey, A., Mayo, A. J., Norris, P. J., . . . Cohen, M. S. (2011). Cross-sectional detection of acute HIV infection: timing of transmission, inflammation and antiretroviral therapy. *PLoS One*, 6(5), e19617. doi:10.1371/journal.pone.0019617
292. Bernasconi, N. L., Traggiai, E., & Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298(5601), 2199-2202. doi:10.1126/science.1076071

293. Perrier, C., Arijs, I., Staelens, D., Breynaert, C., Cleynen, I., Covens, K., . . . Ceuppens, J. L. (2013). Interleukin-15 receptor alpha expression in inflammatory bowel disease patients before and after normalization of inflammation with infliximab. *Immunology*, *138*(1), 47-56. doi:10.1111/imm.12014
294. Cerutti, A., Puga, I., & Cols, M. (2011). Innate control of B cell responses. *Trends Immunol*, *32*(5), 202-211. doi:10.1016/j.it.2011.02.004
295. Shive, C. L., Biancotto, A., Funderburg, N. T., Pilch-Cooper, H. A., Valdez, H., Margolis, L., . . . Lederman, M. M. (2012). HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *61*(2), 145-152. doi:10.1097/QAI.0b013e31825d8bbf
296. Sammiceli, S., Ruffin, N., Lantto, R., Vivar, N., Chiodi, F., & Rethi, B. (2012). IL-7 modulates B cells survival and activation by inducing BAFF and CD70 expression in T cells. *J Autoimmun*, *38*(4), 304-314. doi:10.1016/j.jaut.2012.01.012
297. Stylianou, E., Yndestad, A., Sikkeland, L. I., Bjerkeli, V., Damas, J. K., Haug, T., . . . Froland, S. S. (2002). Effects of interferon-alpha on gene expression of chemokines and members of the tumour necrosis factor superfamily in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*, *130*(2), 279-285. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01980.x
298. Haddad, E. K., & Hiscott, J. (2012). Cytokine networks during HIV infection: shifting the balance. *Cytokine Growth Factor Rev*, *23*(4-5), 139-141. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.05.012
299. Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., . . . Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(5), 1890-1893. doi:10.1073/pnas.89.5.1890
300. Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, *30*, 221-241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934
301. Clerici, M., Wynn, T. A., Berzofsky, J. A., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Sher, A., . . . Shearer, G. M. (1994). Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest*, *93*(2), 768-775. doi:10.1172/jci117031
302. Barker, E., Mackewicz, C. E., & Levy, J. A. (1995). Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus:

- implications for long-term survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24), 11135-11139. doi:10.1073/pnas.92.24.11135
303. Mackewicz, C. E., Ortega, H., & Levy, J. A. (1994). Effect of cytokines on HIV replication in CD4⁺ lymphocytes: lack of identity with the CD8⁺ cell antiviral factor. *Cell Immunol*, 153(2), 329-343. doi:10.1006/cimm.1994.1032
304. Swingler, S., Zhou, J., Swingler, C., Dauphin, A., Greenough, T., Jolicoeur, P., & Stevenson, M. (2008). Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe*, 4(1), 63-76. doi:10.1016/j.chom.2008.05.015
305. Moir, S., & Fauci, A. S. (2013). Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev*, 254(1), 207-224. doi:10.1111/imr.12067
306. Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M., & Tangye, S. G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med*, 209(7), 1241-1253. doi:10.1084/jem.20120994
307. Cannons, J. L., Qi, H., Lu, K. T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., . . . Schwartzberg, P. L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity*, 32(2), 253-265. doi:10.1016/j.immuni.2010.01.010
308. Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., . . . Dong, C. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*, 29(1), 138-149. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.009
309. Cubas, R. A., Mudd, J. C., Savoye, A. L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., . . . Haddad, E. K. (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med*, 19(4), 494-499. doi:10.1038/nm.3109
310. Perreau, M., Savoye, A. L., De Crignis, E., Corpataux, J. M., Cubas, R., Haddad, E. K., . . . Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med*, 210(1), 143-156. doi:10.1084/jem.20121932
311. Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., . . . Walker, B. D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443(7109), 350-354. doi:10.1038/nature05115

312. Kaufmann, D. E., Kavanagh, D. G., Pereyra, F., Zaunders, J. J., Mackey, E. W., Miura, T., . . . Walker, B. D. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*, 8(11), 1246-1254. doi:10.1038/ni1515
313. Jones, R. B., Ndhlovu, L. C., Barbour, J. D., Sheth, P. M., Jha, A. R., Long, B. R., . . . Ostrowski, M. A. (2008). Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med*, 205(12), 2763-2779. doi:10.1084/jem.20081398
314. Kardava, L., Moir, S., Wang, W., Ho, J., Buckner, C. M., Posada, J. G., . . . Fauci, A. S. (2011). Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. *J Clin Invest*, 121(7), 2614-2624. doi:10.1172/jci45685
315. Austin, J. W., Buckner, C. M., Kardava, L., Wang, W., Zhang, X., Melson, V. A., . . . Moir, S. (2019). Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Sci Transl Med*, 11(520). doi:10.1126/scitranslmed.aax0904
316. Levesque, M. C., Moody, M. A., Hwang, K. K., Marshall, D. J., Whitesides, J. F., Amos, J. D., . . . Haynes, B. F. (2009). Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*, 6(7), e1000107. doi:10.1371/journal.pmed.1000107
317. Peruchon, S., Chaoul, N., Burelout, C., Delache, B., Brochard, P., Laurent, P., . . . Richard, Y. (2009). Tissue-specific B-cell dysfunction and generalized memory B-cell loss during acute SIV infection. *PLoS One*, 4(6), e5966. doi:10.1371/journal.pone.0005966
318. Orenstein, J. M. (2008). Hyperplastic lymphoid tissue in HIV/AIDS: an electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol*, 32(4), 161-169. doi:10.1080/01913120802179408
319. Mestecky, J., Jackson, S., Moldoveanu, Z., Nesbit, L. R., Kulhavy, R., Prince, S. J., . . . Goepfert, P. A. (2004). Paucity of antigen-specific IgA responses in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 20(9), 972-988. doi:10.1089/aid.2004.20.972
320. Cerutti, A., Cols, M., Gentile, M., Cassis, L., Barra, C. M., He, B., . . . Chen, K. (2011). Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci*, 1238, 132-144. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06266.x

321. Sabourin-Poirier, C., Fourcade, L., Chagnon-Choquet, J., Labbe, A. C., Alary, M., Guedou, F., . . . Roger, M. (2016). Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci Rep*, *6*, 32318. doi:10.1038/srep32318
322. Marchetti, G., Tincati, C., & Silvestri, G. (2013). Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*, *26*(1), 2-18. doi:10.1128/cmr.00050-12
323. Morris, L., Binley, J. M., Clas, B. A., Bonhoeffer, S., Astill, T. P., Kost, R., . . . Moore, J. P. (1998). HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J Exp Med*, *188*(2), 233-245. doi:10.1084/jem.188.2.233
324. De Milito, A., Nilsson, A., Titanji, K., Thorstensson, R., Reizenstein, E., Narita, M., . . . Chiodi, F. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*, *103*(6), 2180-2186. doi:10.1182/blood-2003-07-2375
325. Deeks, S. G., Autran, B., Berkhout, B., Benkirane, M., Cairns, S., Chomont, N., . . . Barre-Sinoussi, F. (2012). Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol*, *12*(8), 607-614. doi:10.1038/nri3262
326. Chu, V. T., & Berek, C. (2013). The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev*, *251*(1), 177-188. doi:10.1111/imr.12011
327. Fink, K. (2012). Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol*, *3*, 78. doi:10.3389/fimmu.2012.00078
328. Tomaras, G. D., Yates, N. L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G. G., Chavez, L. L., . . . Haynes, B. F. (2008). Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol*, *82*(24), 12449-12463. doi:10.1128/jvi.01708-08
329. Shirai, A., Cosentino, M., Leitman-Klinman, S. F., & Klinman, D. M. (1992). Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J Clin Invest*, *89*(2), 561-566. doi:10.1172/jci115621
330. Liao, H. X., Chen, X., Munshaw, S., Zhang, R., Marshall, D. J., Vandergrift, N., . . . Haynes, B. F. (2011). Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. *J Exp Med*, *208*(11), 2237-2249. doi:10.1084/jem.20110363

331. Yates, N. L., Lucas, J. T., Nolen, T. L., Vandergrift, N. A., Soderberg, K. A., Seaton, K. E., . . . Tomaras, G. D. (2011). Multiple HIV-1-specific IgG3 responses decline during acute HIV-1: implications for detection of incident HIV infection. *Aids*, *25*(17), 2089-2097. doi:10.1097/QAD.0b013e32834b348e
332. Fecteau, J. F., Cote, G., & Neron, S. (2006). A new memory CD27-IgG⁺ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol*, *177*(6), 3728-3736. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3728
333. Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowitz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., & Kuppens, R. (2015). Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(38), E5281-5289. doi:10.1073/pnas.1511270112
334. Wirths, S., & Lanzavecchia, A. (2005). ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*, *35*(12), 3433-3441. doi:10.1002/eji.200535364
335. Burton, D. R., & Mascola, J. R. (2015). Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat Immunol*, *16*(6), 571-576. doi:10.1038/ni.3158
336. Oracki, S. A., Walker, J. A., Hibbs, M. L., Corcoran, L. M., & Tarlinton, D. M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunol Rev*, *237*(1), 140-159. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x
337. Scheid, J. F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T. Y., . . . Nussenzweig, M. C. (2011). Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science*, *333*(6049), 1633-1637. doi:10.1126/science.1207227
338. Tudor, D., Derrien, M., Diomede, L., Drillet, A. S., Houimel, M., Moog, C., . . . Bomsel, M. (2009). HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol*, *2*(5), 412-426. doi:10.1038/mi.2009.89
339. Euler, Z., van Gils, M. J., Bunnik, E. M., Phung, P., Schweighardt, B., Wrin, T., & Schuitemaker, H. (2010). Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J Infect Dis*, *201*(7), 1045-1053. doi:10.1086/651144

340. Ferreira, C. B., Merino-Mansilla, A., Llano, A., Perez, I., Crespo, I., Llinas, L., . . . Sanchez-Merino, V. (2013). Evolution of broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing activity: therapy-associated decline, positive association with detectable viremia, and partial restoration of B-cell subpopulations. *J Virol*, *87*(22), 12227-12236. doi:10.1128/jvi.02155-13
341. MacLennan, I., & Chan, E. (1993). The dynamic relationship between B-cell populations in adults. *Immunol Today*, *14*(1), 29-34. doi:10.1016/0167-5699(93)90321-b
342. Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, *5*(8), 606-616. doi:10.1038/nri1669
343. Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., . . . Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(5), 2639-2644. doi:10.1073/pnas.0437996100
344. Pettersen, J. C., Borgen, D. F., & Graupner, K. C. (1967). A morphological and histochemical study of the primary and secondary immune responses in the rat spleen. *Am J Anat*, *121*(2), 305-317. doi:10.1002/aja.1001210209
345. Kumararatne, D. S., Bazin, H., & MacLennan, I. C. (1981). Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. *Eur J Immunol*, *11*(11), 858-864. doi:10.1002/eji.1830111103
346. Kumararatne, D. S., & MacLennan, I. C. (1981). Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors. *Eur J Immunol*, *11*(11), 865-869. doi:10.1002/eji.1830111104
347. Kumararatne, D. S., MacLennan, I. C., Bazin, H., & Gray, D. (1982). Marginal zones: the largest B cell compartment of the rat spleen. *Adv Exp Med Biol*, *149*, 67-73. doi:10.1007/978-1-4684-9066-4_10
348. Gray, D., Kumararatne, D. S., Lortan, J., Khan, M., & MacLennan, I. C. (1984). Relation of intra-splenic migration of marginal zone B cells to antigen localization on follicular dendritic cells. *Immunology*, *52*(4), 659-669.
349. Humphrey, J. H. (1985). Splenic macrophages: antigen presenting cells for T1-2 antigens. *Immunol Lett*, *11*(3-4), 149-152. doi:10.1016/0165-2478(85)90161-0

350. Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Jr., & Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol*, *9*(1), 54-62. doi:10.1038/ni1542
351. Kraal, G., & Mebius, R. (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol*, *250*, 175-215. doi:10.1016/s0074-7696(06)50005-1
352. Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., & Cyster, J. G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, *309*(5741), 1735-1739. doi:10.1126/science.1113640
353. Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., . . . Cyster, J. G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol*, *5*(7), 713-720. doi:10.1038/ni1083
354. Ziring, D., Wei, B., Velazquez, P., Schrage, M., Buckley, N. E., & Braun, J. (2006). Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2. *Immunogenetics*, *58*(9), 714-725. doi:10.1007/s00251-006-0138-x
355. Pereira, J. P., An, J., Xu, Y., Huang, Y., & Cyster, J. G. (2009). Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat Immunol*, *10*(4), 403-411. doi:10.1038/ni.1710
356. Lu, T. T., & Cyster, J. G. (2002). Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science*, *297*(5580), 409-412. doi:10.1126/science.1071632
357. Wang, H., Beaty, N., Chen, S., Qi, C. F., Masiuk, M., Shin, D. M., & Morse, H. C., 3rd. (2012). The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood*, *119*(2), 465-468. doi:10.1182/blood-2011-03-343608
358. Weill, J. C., Weller, S., & Reynaud, C. A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, *27*, 267-285. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132607
359. Weller, S., Braun, M. C., Tan, B. K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M. E., . . . Weill, J. C. (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*, *104*(12), 3647-3654. doi:10.1182/blood-2004-01-0346

360. Vinuesa, C. G., Sze, D. M., Cook, M. C., Toellner, K. M., Klaus, G. G., Ball, J., & MacLennan, I. C. (2003). Recirculating and germinal center B cells differentiate into cells responsive to polysaccharide antigens. *Eur J Immunol*, 33(2), 297-305. doi:10.1002/immu.200310003
361. Spencer, J., Perry, M. E., & Dunn-Walters, D. K. (1998). Human marginal-zone B cells. *Immunol Today*, 19(9), 421-426.
362. Martin, F., Oliver, A. M., & Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14(5), 617-629.
363. Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., & Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, 17(3), 341-352.
364. Chen, Y., Pikkarainen, T., Elomaa, O., Soininen, R., Kodama, T., Kraal, G., & Tryggvason, K. (2005). Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J Immunol*, 175(12), 8173-8180. doi:10.4049/jimmunol.175.12.8173
365. Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., & Ravetch, J. V. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol*, 1(1), 31-36. doi:10.1038/76882
366. Song, H., & Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med*, 198(12), 1923-1935. doi:10.1084/jem.20031498
367. Steiniger, B., Barth, P., & Hellinger, A. (2001). The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol*, 159(2), 501-512. doi:10.1016/s0002-9440(10)61722-1
368. Puga, I., Cols, M., Barra, C. M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., . . . Cerutti, A. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*, 13(2), 170-180. doi:10.1038/ni.2194
369. Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., . . . Cyster, J. G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*, 194(1), 45-56. doi:10.1084/jem.194.1.45

370. Ellyard, J. I., Avery, D. T., Mackay, C. R., & Tangye, S. G. (2005). Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol*, *35*(3), 699-708. doi:10.1002/eji.200425442
371. He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., . . . Cerutti, A. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol*, *11*(9), 836-845. doi:10.1038/ni.1914
372. Garcia De Vinuesa, C., Gulbranson-Judge, A., Khan, M., O'Leary, P., Cascalho, M., Wabl, M., . . . MacLennan, I. C. (1999). Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol*, *29*(11), 3712-3721. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199911)29:11<3712::Aid-immu3712>3.0.Co;2-p
373. Cols, M., Barra, C. M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., . . . Cerutti, A. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*, *188*(12), 6071-6083. doi:10.4049/jimmunol.1102066
374. Avery, D. T., Kalled, S. L., Ellyard, J. I., Ambrose, C., Bixler, S. A., Thien, M., . . . Tangye, S. G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*, *112*(2), 286-297. doi:10.1172/jci18025
375. Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., & Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol*, *3*(9), 822-829. doi:10.1038/ni829
376. Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., . . . Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*, *8*(3), 294-303. doi:10.1038/ni1434
377. He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., . . . Cerutti, A. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*, *26*(6), 812-826. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.014
378. Lindh, E., Lind, S. M., Lindmark, E., Hassler, S., Perheentupa, J., Peltonen, L., . . . Karlsson, M. C. (2008). AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(47), 18466-18471. doi:10.1073/pnas.0808205105

379. Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., & Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, *19*(2), 225-234.
380. Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M. C., Blankenship, D., . . . Banchereau, J. (2012). Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. *J Exp Med*, *209*(10), 1813-1823, s1811-1812. doi:10.1084/jem.20112142
381. Martin, F., & Kearney, J. F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*, *2*(5), 323-335. doi:10.1038/nri799
382. Belperron, A. A., Dailey, C. M., & Bockenstedt, L. K. (2005). Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d. *J Immunol*, *174*(9), 5681-5686. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5681
383. Bendelac, A., Bonneville, M., & Kearney, J. F. (2001). Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, *1*(3), 177-186. doi:10.1038/35105052
384. Colino, J., Shen, Y., & Snapper, C. M. (2002). Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med*, *195*(1), 1-13. doi:10.1084/jem.20011432
385. Do, R. K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M. R., Hilbert, D., & Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med*, *192*(7), 953-964. doi:10.1084/jem.192.7.953
386. Pone, E. J., Zhang, J., Mai, T., White, C. A., Li, G., Sakakura, J. K., . . . Casali, P. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun*, *3*, 767. doi:10.1038/ncomms1769
387. Kang, Y. S., Do, Y., Lee, H. K., Park, S. H., Cheong, C., Lynch, R. M., . . . Park, C. G. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell*, *125*(1), 47-58. doi:10.1016/j.cell.2006.01.046
388. Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., & Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*, *23*(5), 503-514. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.013

389. Haas, K. M., Poe, J. C., & Tedder, T. F. (2009). CD21/35 promotes protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a complement-independent but CD19-dependent pathway that regulates PD-1 expression. *J Immunol*, *183*(6), 3661-3671. doi:10.4049/jimmunol.0901218
390. Oliver, A. M., Martin, F., & Kearney, J. F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol*, *162*(12), 7198-7207.
391. Attanavanich, K., & Kearney, J. F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol*, *172*(2), 803-811. doi:10.4049/jimmunol.172.2.803
392. Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., & Faveeuw, C. (2009). Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol*, *182*(10), 6105-6113. doi:10.4049/jimmunol.0802273
393. Pape, K. A., & Jenkins, M. K. (2018). Do Memory B Cells Form Secondary Germinal Centers? It Depends. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *10*(1). doi:10.1101/cshperspect.a029116
394. Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, *29*, 621-663. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
395. Chappell, C. P., Draves, K. E., Giltiay, N. V., & Clark, E. A. (2012). Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J Exp Med*, *209*(10), 1825-1840. doi:10.1084/jem.20120774
396. Cunningham, A. F., Gaspal, F., Serre, K., Mohr, E., Henderson, I. R., Scott-Tucker, A., . . . MacLennan, I. C. (2007). Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection. *J Immunol*, *178*(10), 6200-6207. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6200
397. Dammers, P. M., Visser, A., Popa, E. R., Nieuwenhuis, P., & Kroese, F. G. (2000). Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected. *J Immunol*, *165*(11), 6156-6169. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6156
398. Liu, Y. J., Oldfield, S., & MacLennan, I. C. (1988). Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol*, *18*(3), 355-362. doi:10.1002/eji.1830180306

399. Shih, T. A., Meffre, E., Roederer, M., & Nussenzweig, M. C. (2002). Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat Immunol*, 3(6), 570-575. doi:10.1038/ni803
400. Tiller, T., Tsuiji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Nussenzweig, M. C., & Wardemann, H. (2007). Autoreactivity in human IgG⁺ memory B cells. *Immunity*, 26(2), 205-213. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.009
401. Dunn-Walters, D. K., Isaacson, P. G., & Spencer, J. (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med*, 182(2), 559-566. doi:10.1084/jem.182.2.559
402. Seifert, M., & Kuppers, R. (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM⁺(IgD⁺)CD27⁺ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med*, 206(12), 2659-2669. doi:10.1084/jem.20091087
403. Tangye, S. G., & Good, K. L. (2007). Human IgM⁺CD27⁺ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol*, 179(1), 13-19. doi:10.4049/jimmunol.179.1.13
404. Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M. C., Le Deist, F. F., de Saint Basile, G. G., . . . Weill, J. C. (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3), 1166-1170. doi:10.1073/pnas.98.3.1166
405. Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., . . . Reynaud, C. A. (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants. *J Exp Med*, 205(6), 1331-1342. doi:10.1084/jem.20071555
406. Berkowska, M. A., Driessen, G. J., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., . . . van Zelm, M. C. (2011). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood*, 118(8), 2150-2158. doi:10.1182/blood-2011-04-345579
407. Roll, P., Palanichamy, A., Kneitz, C., Dorner, T., & Tony, H. P. (2006). Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(8), 2377-2386. doi:10.1002/art.22019
408. Stein, H., Bonk, A., Tolksdorf, G., Lennert, K., Rodt, H., & Gerdes, J. (1980). Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and

- non-Hodgkin's lymphomas. *J Histochem Cytochem*, 28(8), 746-760.
doi:10.1177/28.8.7003001
409. Spencer, J., Finn, T., Pulford, K. A., Mason, D. Y., & Isaacson, P. G. (1985). The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol*, 62(3), 607-612.
410. Liu, Y. J., Barthelemy, C., de Bouteiller, O., Arpin, C., Durand, I., & Banchereau, J. (1995). Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity*, 2(3), 239-248.
411. Dono, M., Zupo, S., Leanza, N., Melioli, G., Fogli, M., Melagrana, A., . . . Ferrarini, M. (2000). Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. *J Immunol*, 164(11), 5596-5604.
doi:10.4049/jimmunol.164.11.5596
412. Schutze, G. E., Mason, E. O., Jr., Barson, W. J., Kim, K. S., Wald, E. R., Givner, L. B., . . . Kaplan, S. L. (2002). Invasive pneumococcal infections in children with asplenia. *Pediatr Infect Dis J*, 21(4), 278-282.
413. Zandvoort, A., & Timens, W. (2002). The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol*, 130(1), 4-11.
doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01953.x
414. Brendolan, A., Rosado, M. M., Carsetti, R., Selleri, L., & Dear, T. N. (2007). Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*, 29(2), 166-177.
doi:10.1002/bies.20528
415. van den Oord, J. J., de Wolf-Peeters, C., & Desmet, V. J. (1986). The marginal zone in the human reactive lymph node. *Am J Clin Pathol*, 86(4), 475-479.
doi:10.1093/ajcp/86.4.475
416. Spencer, J., Finn, T., & Isaacson, P. G. (1985). Gut associated lymphoid tissue: a morphological and immunocytochemical study of the human appendix. *Gut*, 26(7), 672-679. doi:10.1136/gut.26.7.672
417. Morente, M., Piris, M. A., Orradre, J. L., Rivas, C., & Villuendas, R. (1992). Human tonsil intraepithelial B cells: a marginal zone-related subpopulation. *J Clin Pathol*, 45(8), 668-672. doi:10.1136/jcp.45.8.668

418. Dono, M., Zupo, S., Burgio, V. L., Augliera, A., Tacchetti, C., Favre, A., . . . Ferrarini, M. (1997). Phenotypic and functional characterization of human tonsillar subepithelial (SE) B cells. *Ann N Y Acad Sci*, *815*, 171-181. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb52058.x
419. Stavnezer, J. (1996). Antibody class switching. *Adv Immunol*, *61*, 79-146. doi:10.1016/s0065-2776(08)60866-4
420. Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M., & Honjo, T. (2001). A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(22), 12620-12623. doi:10.1073/pnas.221454398
421. Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., . . . Tschopp, J. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, *189*(11), 1747-1756. doi:10.1084/jem.189.11.1747
422. Bossen, C., Tardivel, A., Willen, L., Fletcher, C. A., Perroud, M., Beermann, F., . . . Schneider, P. (2011). Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses. *Eur J Immunol*, *41*(3), 787-797. doi:10.1002/eji.201040591
423. Hengeveld, P. J., & Kersten, M. J. (2015). B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J*, *5*, e282. doi:10.1038/bcj.2015.3
424. Cachero, T. G., Schwartz, I. M., Qian, F., Day, E. S., Bossen, C., Ingold, K., . . . Whitty, A. (2006). Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor). *Biochemistry*, *45*(7), 2006-2013. doi:10.1021/bi051685o
425. Gavin, A. L., Duong, B., Skog, P., Ait-Azzouzene, D., Greaves, D. R., Scott, M. L., & Nemazee, D. (2005). deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. *J Immunol*, *175*(1), 319-328. doi:10.4049/jimmunol.175.1.319
426. Vincent, F. B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. A., Fairfax, K. A., & Mackay, F. (2013). The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, *24*(3), 203-215. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.04.003

427. Scapini, P., Nardelli, B., Nadali, G., Calzetti, F., Pizzolo, G., Montecucco, C., & Cassatella, M. A. (2003). G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional B_LY_S. *J Exp Med*, *197*(3), 297-302. doi:10.1084/jem.20021343
428. Mackay, F., & Leung, H. (2006). The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol*, *18*(5), 284-289. doi:10.1016/j.smim.2006.04.005
429. Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G., & Berek, C. (2007). In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol*, *179*(9), 5947-5957. doi:10.4049/jimmunol.179.9.5947
430. Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P., & Mackay, F. (2014). The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*, *10*(6), 365-373. doi:10.1038/nrrheum.2014.33
431. Ohata, J., Zvaifler, N. J., Nishio, M., Boyle, D. L., Kalled, S. L., Carson, D. A., & Kipps, T. J. (2005). Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol*, *174*(2), 864-870. doi:10.4049/jimmunol.174.2.864
432. Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., & Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*, *21*, 231-264. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141152
433. Huard, B., Arlettaz, L., Ambrose, C., Kindler, V., Mauri, D., Roosnek, E., . . . French, L. E. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol*, *16*(3), 467-475. doi:10.1093/intimm/dxh043
434. Ittah, M., Miceli-Richard, C., Eric Gottenberg, J., Lavie, F., Lazure, T., Ba, N., . . . Mariette, X. (2006). B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther*, *8*(2), R51. doi:10.1186/ar1912
435. Kato, A., Truong-Tran, A. Q., Scott, A. L., Matsumoto, K., & Schleimer, R. P. (2006). Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol*, *177*(10), 7164-7172. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7164
436. Langat, D. L., Wheaton, D. A., Platt, J. S., Sifers, T., & Hunt, J. S. (2008). Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol*, *172*(5), 1303-1311. doi:10.2353/ajpath.2008.071139

437. Alsaleh, G., Messer, L., Semaan, N., Boulanger, N., Gottenberg, J. E., Sibilia, J., & Wachsmann, D. (2007). BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis Rheum*, 56(10), 3202-3214. doi:10.1002/art.22915
438. Pelekanou, V., Kampa, M., Kafousi, M., Darivianaki, K., Sanidas, E., Tsiftsis, D. D., . . . Castanas, E. (2008). Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC Cancer*, 8, 76. doi:10.1186/1471-2407-8-76
439. Abe, M., Kido, S., Hiasa, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., & Matsumoto, T. (2006). BAFF and APRIL as osteoclast-derived survival factors for myeloma cells: a rationale for TACI-Fc treatment in patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 20(7), 1313-1315. doi:10.1038/sj.leu.2404228
440. Geffroy-Luseau, A., Jegou, G., Bataille, R., Campion, L., & Pellat-Deceunynck, C. (2008). Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. *Int Immunol*, 20(6), 775-782. doi:10.1093/intimm/dxn035
441. Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C. M., . . . Meinel, E. (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med*, 201(2), 195-200. doi:10.1084/jem.20041674
442. Thangarajh, M., Masterman, T., Hillert, J., Moerk, S., & Jonsson, R. (2007). A proliferation-inducing ligand (APRIL) is expressed by astrocytes and is increased in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*, 65(1), 92-98. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01867.x
443. Gross, J. A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S. R., Madden, K., . . . Clegg, C. H. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, 404(6781), 995-999. doi:10.1038/35010115
444. Mihalcik, S. A., Huddleston, P. M., 3rd, Wu, X., & Jelinek, D. F. (2010). The structure of the TNFRSF13C promoter enables differential expression of BAFF-R during B cell ontogeny and terminal differentiation. *J Immunol*, 185(2), 1045-1054. doi:10.4049/jimmunol.1001120
445. Day, E. S., Cachero, T. G., Qian, F., Sun, Y., Wen, D., Pelletier, M., . . . Whitty, A. (2005). Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry*, 44(6), 1919-1931. doi:10.1021/bi048227k

446. Sutherland, J. S., Goldberg, G. L., Hammett, M. V., Uldrich, A. P., Berzins, S. P., Heng, T. S., . . . Boyd, R. L. (2005). Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol*, *175*(4), 2741-2753. doi:10.4049/jimmunol.175.4.2741
447. Ingold, K., Zumsteg, A., Tardivel, A., Huard, B., Steiner, Q. G., Cachero, T. G., . . . Schneider, P. (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med*, *201*(9), 1375-1383. doi:10.1084/jem.20042309
448. Martinez-Gallo, M., Radigan, L., Almejun, M. B., Martinez-Pomar, N., Matamoros, N., & Cunningham-Rundles, C. (2013). TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol*, *131*(2), 468-476. doi:10.1016/j.jaci.2012.10.029
449. Ozcan, E., Garibyan, L., Lee, J. J., Bram, R. J., Lam, K. P., & Geha, R. S. (2009). Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells. *J Allergy Clin Immunol*, *123*(6), 1277-1286.e1275. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.019
450. Groom, J. R., Fletcher, C. A., Walters, S. N., Grey, S. T., Watt, S. V., Sweet, M. J., . . . Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*, *204*(8), 1959-1971. doi:10.1084/jem.20062567
451. Tsuji, S., Cortesao, C., Bram, R. J., Platt, J. L., & Cascalho, M. (2011). TACI deficiency impairs sustained Blimp-1 expression in B cells decreasing long-lived plasma cells in the bone marrow. *Blood*, *118*(22), 5832-5839. doi:10.1182/blood-2011-05-353961
452. Schneider, P., Takatsuka, H., Wilson, A., Mackay, F., Tardivel, A., Lens, S., . . . Tschopp, J. (2001). Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med*, *194*(11), 1691-1697. doi:10.1084/jem.194.11.1691
453. O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., . . . Noelle, R. J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*, *199*(1), 91-98. doi:10.1084/jem.20031330
454. Ng, L. G., Sutherland, A. P., Newton, R., Qian, F., Cachero, T. G., Scott, M. L., . . . Mackay, C. R. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of

- circulating T and B cells. *J Immunol*, 173(2), 807-817.
doi:10.4049/jimmunol.173.2.807
455. Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B., & Ting, A. T. (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol*, 175(5), 2814-2824. doi:10.4049/jimmunol.175.5.2814
456. Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., . . . Scott, M. L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293(5537), 2111-2114. doi:10.1126/science.1061964
457. Xu, S., & Lam, K. P. (2001). B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol*, 21(12), 4067-4074.
doi:10.1128/mcb.21.12.4067-4074.2001
458. Mackay, F., & Schneider, P. (2008). TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(3-4), 263-276. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.04.006
459. Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S. A., Asano, M., Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity*, 23(3), 297-308. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.007
460. Mackay, F., Woodcock, S. A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., . . . Browning, J. L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*, 190(11), 1697-1710. doi:10.1084/jem.190.11.1697
461. Thompson, J. S., Schneider, P., Kalled, S. L., Wang, L., Lefevre, E. A., Cachero, T. G., . . . Ambrose, C. (2000). BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med*, 192(1), 129-135.
doi:10.1084/jem.192.1.129
462. Uzzan, M., Colombel, J. F., Cerutti, A., Treton, X., & Mehandru, S. (2016). B Cell-Activating Factor (BAFF)-Targeted B Cell Therapies in Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci*, 61(12), 3407-3424. doi:10.1007/s10620-016-4317-9
463. Xu, L. G., Wu, M., Hu, J., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2002). Identification of downstream genes up-regulated by the tumor necrosis factor family member TALL-1. *J Leukoc Biol*, 72(2), 410-416.

464. Van Kooten, C., & Banchereau, J. (1996). CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol*, *61*, 1-77.
465. Chang, S. K., Arendt, B. K., Darce, J. R., Wu, X., & Jelinek, D. F. (2006). A role for BLYS in the activation of innate immune cells. *Blood*, *108*(8), 2687-2694. doi:10.1182/blood-2005-12-017319
466. Chang, S. K., Mihalcik, S. A., & Jelinek, D. F. (2008). B lymphocyte stimulator regulates adaptive immune responses by directly promoting dendritic cell maturation. *J Immunol*, *180*(11), 7394-7403. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7394
467. Hsu, B. L., Harless, S. M., Lindsley, R. C., Hilbert, D. M., & Cancro, M. P. (2002). Cutting edge: BLYS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J Immunol*, *168*(12), 5993-5996. doi:10.4049/jimmunol.168.12.5993
468. Amanna, I. J., Clise-Dwyer, K., Nashold, F. E., Hoag, K. A., & Hayes, C. E. (2001). Cutting edge: A/WySnJ transitional B cells overexpress the chromosome 15 proapoptotic Blk gene and succumb to premature apoptosis. *J Immunol*, *167*(11), 6069-6072. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6069
469. Craxton, A., Draves, K. E., Gruppi, A., & Clark, E. A. (2005). BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med*, *202*(10), 1363-1374. doi:10.1084/jem.20051283
470. Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S. L., Hess, D. M., Schwab, S. R., Shu, H. B., & Cyster, J. G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, *20*(4), 441-453.
471. Harless Smith, S., & Cancro, M. P. (2003). BLYS: the pivotal determinant of peripheral B cell selection and lifespan. *Curr Pharm Des*, *9*(23), 1833-1847.
472. Gorelik, L., Cutler, A. H., Thill, G., Miklasz, S. D., Shea, D. E., Ambrose, C., . . . Kalled, S. L. (2004). Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J Immunol*, *172*(2), 762-766. doi:10.4049/jimmunol.172.2.762
473. Tangye, S. G., Bryant, V. L., Cuss, A. K., & Good, K. L. (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin Immunol*, *18*(5), 305-317. doi:10.1016/j.smim.2006.04.004
474. Goenka, R., Matthews, A. H., Zhang, B., O'Neill, P. J., Scholz, J. L., Migone, T. S., . . . Cancro, M. P. (2014). Local BLYS production by T follicular cells

- mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med*, 211(1), 45-56. doi:10.1084/jem.20130505
475. Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., . . . Mackay, F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med*, 192(10), 1453-1466. doi:10.1084/jem.192.10.1453
476. Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758-6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943
477. Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., & Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*, 3(10), 958-965. doi:10.1038/ni842
478. He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E. J., Knowles, D. M., & Cerutti, A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol*, 172(5), 3268-3279. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3268
479. Morrison, M. D., Reiley, W., Zhang, M., & Sun, S. C. (2005). An atypical tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor mediates induction of the noncanonical NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem*, 280(11), 10018-10024. doi:10.1074/jbc.M413634200
480. Lin, W. W., Hildebrand, J. M., & Bishop, G. A. (2013). A Complex Relationship between TRAF3 and Non-Canonical NF-kappaB2 Activation in B Lymphocytes. *Front Immunol*, 4, 477. doi:10.3389/fimmu.2013.00477
481. Xu, L. G., & Shu, H. B. (2002). TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *J Immunol*, 169(12), 6883-6889. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6883
482. Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M. F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., . . . Tsapis, A. (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, 165(3), 1322-1330. doi:10.4049/jimmunol.165.3.1322
483. Marsters, S. A., Yan, M., Pitti, R. M., Haas, P. E., Dixit, V. M., & Ashkenazi, A. (2000). Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF

- receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol*, 10(13), 785-788.
doi:10.1016/s0960-9822(00)00566-2
484. Hildebrand, J. M., Luo, Z., Manske, M. K., Price-Troska, T., Ziesmer, S. C., Lin, W., . . . Novak, A. J. (2010). A BAFF-R mutation associated with non-Hodgkin lymphoma alters TRAF recruitment and reveals new insights into BAFF-R signaling. *J Exp Med*, 207(12), 2569-2579. doi:10.1084/jem.20100857
485. Diaz-de-Durana, Y., Mantchev, G. T., Bram, R. J., & Franco, A. (2006). TACI-BLyS signaling via B-cell-dendritic cell cooperation is required for naive CD8+ T-cell priming in vivo. *Blood*, 107(2), 594-601. doi:10.1182/blood-2004-12-4708
486. Zhou, X., Xia, Z., Lan, Q., Wang, J., Su, W., Han, Y. P., . . . Zheng, S. G. (2011). BAFF promotes Th17 cells and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*, 6(8), e23629. doi:10.1371/journal.pone.0023629
487. Chang, Y., Sun, X., Jia, X., Xu, S., Wei, F., Yang, X., & Wei, W. (2015). Expression and effects of B-lymphocyte stimulator and its receptors in T cell-mediated autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol*, 24(2), 451-457. doi:10.1016/j.intimp.2015.01.001
488. Groom, J., Kalled, S. L., Cutler, A. H., Olson, C., Woodcock, S. A., Schneider, P., . . . Mackay, F. (2002). Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*, 109(1), 59-68. doi:10.1172/jci14121
489. von Bulow, G. U., & Bram, R. J. (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*, 278(5335), 138-141. doi:10.1126/science.278.5335.138
490. Pan, M. G., Xiong, Y., & Chen, F. (2013). NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med*, 13(4), 543-554.
491. Durand, D. B., Shaw, J. P., Bush, M. R., Replogle, R. E., Belagaje, R., & Crabtree, G. R. (1988). Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol*, 8(4), 1715-1724. doi:10.1128/mcb.8.4.1715
492. Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., & Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241(4862), 202-205. doi:10.1126/science.3260404

493. Hawwari, A., Burrows, J., Vadas, M. A., & Cockerill, P. N. (2002). The human IL-3 locus is regulated cooperatively by two NFAT-dependent enhancers that have distinct tissue-specific activities. *J Immunol*, *169*(4), 1876-1886. doi:10.4049/jimmunol.169.4.1876
494. Oum, J. H., Han, J., Myung, H., Hleb, M., Sharma, S., & Park, J. (2002). Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol Cells*, *13*(1), 77-84.
495. Agarwal, S., Avni, O., & Rao, A. (2000). Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity*, *12*(6), 643-652.
496. Kiani, A., Viola, J. P., Lichtman, A. H., & Rao, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity*, *7*(6), 849-860.
497. Pan, M., Winslow, M. M., Chen, L., Kuo, A., Felsher, D., & Crabtree, G. R. (2007). Enhanced NFATc1 nuclear occupancy causes T cell activation independent of CD28 costimulation. *J Immunol*, *178*(7), 4315-4321. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4315
498. Fu, L., Lin-Lee, Y. C., Pham, L. V., Tamayo, A., Yoshimura, L., & Ford, R. J. (2006). Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood*, *107*(11), 4540-4548. doi:10.1182/blood-2005-10-4042
499. Candon, S., Gottenberg, J. E., Bengoufa, D., Chatenoud, L., & Mariette, X. (2009). Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjogren syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. *Ann Rheum Dis*, *68*(7), 1208-1212. doi:10.1136/ard.2008.095257
500. Cheema, G. S., Roschke, V., Hilbert, D. M., & Stohl, W. (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, *44*(6), 1313-1319. doi:10.1002/1529-0131(200106)44:6<1313::Aid-art223>3.0.Co;2-s
501. Munari, F., Fassan, M., Capitani, N., Codolo, G., Vila-Caballer, M., Pizzi, M., . . . de Bernard, M. (2014). Cytokine BAFF released by Helicobacter pylori-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis. *J Immunol*, *193*(11), 5584-5594. doi:10.4049/jimmunol.1302865
502. Lin, J. D., Yang, S. F., Wang, Y. H., Fang, W. F., Lin, Y. C., Lin, Y. F., . . . Cheng, C. W. (2016). Analysis of Associations of Human BAFF Gene

- Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Diseases. *PLoS One*, 11(5), e0154436. doi:10.1371/journal.pone.0154436
503. Zayed, R. A., Sheba, H. F., Abo Elazaem, M. A., Elsaadany, Z. A., Elmessery, L. O., Mahmoud, J. A., . . . Abdou, F. R. (2013). B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci*, 43(3), 289-294.
504. Liu, Z., & Davidson, A. (2011). BAFF inhibition: a new class of drugs for the treatment of autoimmunity. *Exp Cell Res*, 317(9), 1270-1277. doi:10.1016/j.yexcr.2011.02.005
505. Cheingsong-Popov, R., Panagiotidi, C., Bowcock, S., Aronstam, A., Wadsworth, J., & Weber, J. (1991). Relation between humoral responses to HIV gag and env proteins at seroconversion and clinical outcome of HIV infection. *Bmj*, 302(6767), 23-26. doi:10.1136/bmj.302.6767.23
506. Binley, J. M., Klasse, P. J., Cao, Y., Jones, I., Markowitz, M., Ho, D. D., & Moore, J. P. (1997). Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 71(4), 2799-2809.
507. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., . . . van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100(5), 587-597. doi:10.1016/s0092-8674(00)80694-7
508. Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W., & Cunningham, A. L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol*, 3(10), 975-983. doi:10.1038/ni841
509. Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P. A., Olsen, H. S., Migone, T. S., . . . Hilbert, D. M. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, 97(1), 198-204.
510. Melchers, M., Bontjer, I., Tong, T., Chung, N. P., Klasse, P. J., Eggink, D., . . . Sanders, R. W. (2012). Targeting HIV-1 envelope glycoprotein trimers to B cells by using APRIL improves antibody responses. *J Virol*, 86(5), 2488-2500. doi:10.1128/jvi.06259-11
511. Chagnon-Choquet, J., Gauvin, J., Roger, J., Fontaine, J., Poudrier, J., & Roger, M. (2015). HIV Nef promotes expression of B-lymphocyte stimulator by blood dendritic cells during HIV infection in humans. *J Infect Dis*, 211(8), 1229-1240. doi:10.1093/infdis/jiu611

512. Rodriguez, B., Valdez, H., Freimuth, W., Butler, T., Asaad, R., & Lederman, M. M. (2003). Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression. *Aids*, *17*(13), 1983-1985. doi:10.1097/01.aids.0000076325.42412.a1
513. Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., . . . Nussenzweig, M. C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*, *118*(4), 431-438. doi:10.1016/j.cell.2004.08.006
514. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., & Jolicoeur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell*, *95*(2), 163-175.
515. Hanna, Z., Kay, D. G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N., & Jolicoeur, P. (1998). Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J Virol*, *72*(1), 121-132.
516. Hanna, Z., Rebai, N., Poudrier, J., & Jolicoeur, P. (2001). Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice. *Blood*, *98*(7), 2275-2278.
517. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D. G., Pare, G., Calvo, E. L., Hanna, Z., . . . Jolicoeur, P. (2001). The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity*, *15*(2), 173-185. doi:10.1016/s1074-7613(01)00177-7
518. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D. G., Hanna, Z., & Jolicoeur, P. (2003). The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells. *J Virol*, *77*(21), 11733-11744. doi:10.1128/jvi.77.21.11733-11744.2003
519. Emilie, D., Zou, W., Fior, R., Llorente, L., Durandy, A., Crevon, M. C., . . . Galamaud, P. (1997). Production and roles of IL-6, IL-10, and IL-13 in B-lymphocyte malignancies and in B-lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity. *Methods*, *11*(1), 133-142. doi:10.1006/meth.1996.0397
520. Lafeuillade, A., Poizot-Martin, I., Quilichini, R., Gastaut, J. A., Kaplanski, S., Farnarier, C., . . . Bongrand, P. (1991). Increased interleukin-6 production is associated with disease progression in HIV infection. *Aids*, *5*(9), 1139-1140. doi:10.1097/00002030-199109000-00014
521. Bates, J. M., Flanagan, K., Mo, L., Ota, N., Ding, J., Ho, S., . . . Diehl, L. (2015). Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*, *8*(2), 414-428. doi:10.1038/mi.2014.79

522. Maglione, P. J., Gyimesi, G., Cols, M., Radigan, L., Ko, H. M., Weinberger, T., . . . Cunningham-Rundles, C. (2019). BAFF-driven B cell hyperplasia underlies lung disease in common variable immunodeficiency. *JCI Insight*, 4(5). doi:10.1172/jci.insight.122728
523. Fujii, Y., Otake, K., Tashiro, M., & Adachi, A. (1996). Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Lett*, 393(1), 93-96. doi:10.1016/0014-5793(96)00859-9
524. Zhao, Y., & Bruemmer, D. (2010). NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(8), 1535-1541. doi:10.1161/atvbaha.109.191163
525. Iizuka-Koga, M., Nakatsukasa, H., Ito, M., Akanuma, T., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2017). Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun*, 83, 113-121. doi:10.1016/j.jaut.2017.07.002
526. Crean, D., Cummins, E. P., Bahar, B., Mohan, H., McMorrow, J. P., & Murphy, E. P. (2015). Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. *J Immunol*, 195(4), 1436-1448. doi:10.4049/jimmunol.1402039
527. Guy, B., Kieny, M. P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., . . . Lecocq, J. P. (1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*, 330(6145), 266-269. doi:10.1038/330266a0
528. Pantaleo, G., & Fauci, A. S. (1995). New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol*, 13, 487-512. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.002415
529. Watkins, S. C., & Salter, R. D. (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23(3), 309-318. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.009
530. Poudrier, J., Chagnon-Choquet, J., & Roger, M. (2012). Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol*, 2012, 592187. doi:10.1155/2012/592187
531. Stohl, W., Cheema, G. S., Briggs, W. S., Xu, D., Sosnovtseva, S., Roschke, V., . . . Hilbert, D. M. (2002). B lymphocyte stimulator protein-associated increase in

- circulating autoantibody levels may require CD4⁺ T cells: lessons from HIV-infected patients. *Clin Immunol*, 104(2), 115-122. doi:10.1006/clim.2002.5238
532. Krzyzak, L., Seitz, C., Ubat, A., Hutzler, S., Ostalecki, C., Glasner, J., . . . Nitschke, L. (2016). CD83 Modulates B Cell Activation and Germinal Center Responses. *J Immunol*, 196(9), 3581-3594. doi:10.4049/jimmunol.1502163
533. Luthje, K., Kretschmer, B., Fleischer, B., & Breloer, M. (2008). CD83 regulates splenic B cell maturation and peripheral B cell homeostasis. *Int Immunol*, 20(8), 949-960. doi:10.1093/intimm/dxn054
534. Duren, R. P., Boudreaux, S. P., & Conneely, O. M. (2016). Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One*, 11(3), e0150450. doi:10.1371/journal.pone.0150450
535. Pitha, P. M. (2011). Innate antiviral response: role in HIV-1 infection. *Viruses*, 3(7), 1179-1203. doi:10.3390/v3071179
536. Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*, 12(8), 695-708. doi:10.1038/ni.2065
537. Moir, S., Ogwaro, K. M., Malaspina, A., Vasquez, J., Donoghue, E. T., Hallahan, C. W., . . . Fauci, A. S. (2003). Perturbations in B cell responsiveness to CD4⁺ T cell help in HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6057-6062. doi:10.1073/pnas.0730819100
538. Boyle, D. L., Sajjadi, F. G., & Firestein, G. S. (1996). Inhibition of synoviocyte collagenase gene expression by adenosine receptor stimulation. *Arthritis Rheum*, 39(6), 923-930. doi:10.1002/art.1780390608
539. Chorny, A., Puga, I., & Cerutti, A. (2012). Regulation of frontline antibody responses by innate immune signals. *Immunol Res*, 54(1-3), 4-13. doi:10.1007/s12026-012-8307-5
540. Mauri, C., & Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest*, 127(3), 772-779. doi:10.1172/jci85113
541. Brigino, E., Haraguchi, S., Koutsonikolis, A., Cianciolo, G. J., Owens, U., Good, R. A., & Day, N. K. (1997). Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3178-3182. doi:10.1073/pnas.94.7.3178

542. Finnegan, A., Roebuck, K. A., Nakai, B. E., Gu, D. S., Rabbi, M. F., Song, S., & Landay, A. L. (1996). IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage. *J Immunol*, *156*(2), 841-851.

Annexes

Annexe 1 – Article

NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells

Kim Doyon-Laliberté, Josiane Chagnon-Choquet, Michelle Byrns, Matheus Aranguren, Meriam Memmi, Pavel Chrobak, John Stagg, Johanne Poudrier et Michel Roger

Statut : Publié dans *Antibodies*, Volume 2019, Article ID 8040050, 12 pages,
doi:10.3390/antib8040050

Ma contribution principale à cet article est la conception d'une méthodologie permettant la caractérisation des cellules d'amygdales, dont les lymphocytes B et les lymphocytes B de la zone marginale. Le développement de la méthodologie implique l'isolation des lymphocytes B par sélection négative à l'aide d'une technologie immunomagnétique, les temps d'incubation associés, les concentrations des traitements ainsi que les combinaisons de traitement pertinentes. Les tests de contrôle appropriés ont aussi dû être développés. Une procédure de marquage extracellulaire et intracellulaire des lymphocytes B était déjà mise en place, mais celle-ci a dû être optimisée pour les cellules d'amygdales.

Mes expériences démontrent que les lymphocytes B MZ et MZ précurseurs des amygdales sont les populations principales exprimant NR4A1, NR4A3 et CD83 sans stimulation. Nous avons aussi démontré l'expression de CD39 et CD73 par ces populations, molécules liées à l'activité B régulatrice, suggérant le potentiel de régulation des cellules B MZ et MZ précurseurs des amygdales.

NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells

Kim Doyon-Laliberté^{1,2}, Josiane Chagnon-Choquet^{1,2}, Michelle Byrns^{1,2}, Matheus Aranguren^{1,2}, Meriam Memmi^{1,2}, Pavel Chrobak^{1,3,4}, John Stagg^{1,3,4}, Johanne Poudrier^{1,2*} and Michel Roger^{1,2*}

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),
Tour Viger 900 rue St-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Canada.

² Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de
Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

³ Faculte de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

⁴ Institut du Cancer de Montréal CRCHUM, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

* Correspondance: johanne.poudrier@crchum.qc.ca (J.P.); michel.roger@ssss.gouv.qc.ca
(M.R.); Tel.: +1-(514)-890-8000 (ext. 25798) (J.P.); +1-(514)-890-8000 (ext. 31330)
(M.R.)

Financial support: This work was supported by grant # PJT-148529 from the Canadian
Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de
Recherche du Québec en Santé (FRQS).

Abstract

We have previously characterized a human blood CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{lo}CD10⁺ innate-like B-cell population, which presents features shared by both transitional immature and marginal zone (MZ) B-cells, named herein “precursor-like” MZ B-cells. B-cells with similar attributes have been associated with regulatory potential (Breg). In order to clarify this issue and better characterize this population, we have proceeded to RNA-Seq transcriptome profiling of mature MZ and precursor-like MZ B-cells taken from the blood of healthy donors. We report that ex vivo mature MZ and precursor-like MZ B-cells express transcripts for the immunoregulatory marker CD83 and nuclear receptors NR4A1, 2, and 3, known to be associated with T-cell regulatory (Treg) maintenance and function. Breg associated markers such as CD39 and CD73 were also expressed by both populations. We also show that human blood and tonsillar precursor-like MZ B-cells were the main B-cell population to express elevated levels of CD83 and NR4A1-3 proteins ex vivo and without stimulation. Sorted tonsillar precursor-like MZ B-cells exerted regulatory activity on autologous activated CD4⁺ T-cells, and this was affected by a CD83 blocking reagent. We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, and identify NR4A1-3 as potential Breg markers, which as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status. Since expression and activity of these molecules can be modulated therapeutically, our findings may be useful in strategies aiming at modulation of Breg responses.

Abstract word count: 231

Running Title: NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells

Keywords: NR4A; human marginal zone B-cells; B regulatory cells

1. Introduction

We have previously reported a relatively small population (1%–2%) of B-cells expressing the surface markers $CD19^+CD1c^+IgM^+CD27^+CD21^{lo}CD10^+$ that is present in the blood of healthy human individuals [1–3]. These B-cells harbored markers of transitional immature and of innate marginal zone (MZ) B-cells, and were named “precursor-like” MZ B-cells. We previously showed that $CD19^+CD1c^+IgM^+CD27^+CD21^{hi}CD10^-$ mature MZ and precursor-like MZ B-cells expressed IL-10 *ex vivo*; precursor-like more so than mature MZ B-cells [2]. Furthermore, frequencies of IL-10 expressing precursor-like MZ B-cells were increased in the context of excess B-cell activating factor (BAFF) [2]. B-cells sharing some attributes with these precursor-like MZ B-cells have been recognized for B regulatory “Breg” activity [4]. Although the hallmark of Breg activity is IL-10 production, other regulatory factors have been depicted such as expression of PD-L1, production of TGF- β , IL-35, and adenosine via the ectonucleotidases CD39 and CD73 [4]. However, until now no precise marker can allow the identification of Bregs, as it is the case with the marker Forkhead box 3 (FoxP3) for Tregs [5].

NR4A nuclear receptors are important regulators of the inflammatory response, and can be transiently up-regulated following stimulation via the TCR or BCR [6]. However, expressions of NR4As are highly enriched in Tregs when compared to other T-cell subsets [5]. NR4As have been shown to directly promote the expression of the FoxP3 transcription factor, associated with the generation, differentiation and maintenance of Tregs [7,8]. Knockout mice in which all NR4A1-3 genes were specifically deleted in Tregs showed global reduction of FoxP3, and developed systemic autoimmune diseases, suggesting that NR4As are required for Treg cell maintenance and function [5].

We now report gene expression of nuclear receptors NR4A1, 2, and 3 as well as the immunoregulatory surface molecule CD83 [9,10], which NR4As can directly regulate [11], by both mature MZ and precursor-like MZ B-cell populations from *ex vivo* human blood. Moreover, we found that in human blood and tonsils precursor-like MZ B-cells are the main population to co-express NR4A1-3 and CD83 proteins at high levels without

stimulation. Furthermore, we report that sorted tonsillar precursor-like MZ B-cells exert regulatory activity on autologous activated CD4⁺ T-cells, and this is affected by a CD83 blocking reagent. We also report that the Breg associated CD39 and CD73 enzymes [12,13] are co-expressed by both populations in human blood and tonsils. Total CD39⁺ B-cells from blood and tonsils also expressed NR4A1 and CD83, albeit to a lesser extent than precursor-like MZ B-cells. We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, and identify NR4A1-3 as potential Breg markers, which as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics statement

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The methods reported in this paper were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Ethics Committees.

2.2. Cell Sorting of Human Blood MZ and Precursor-Like MZ B-Cells, RNA Isolation, and Sequencing

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated on Ficoll gradient, re-suspended in heat-inactivated fetal bovine serum (hi-FBS) (Wisent Inc., Montreal, QC, Canada) containing 10% dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco Life Technologies, New York, NY, USA), and processed for cell sorting with a FACSariaIII apparatus. Live/dead exclusion was performed using LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead cell Stain (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1X PBS, 2% hi-FBS) supplemented with 20% hi-FBS and 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Cells were stained using the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: PacificBlue-anti-CD19, APC-Cy7-anti-CD10

(BioLegend, San Diego, CA, USA), AlexaFluor700-anti-CD27, FITC-anti-IgM, PE-anti-CD21 (BD-Biosciences), PerCP-eFluor710-anti-CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Live CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{hi}CD10⁻ mature and CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{lo}CD10⁺ precursor-like sorted MZ B-cells were > 95% pure. Total RNA was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was validated using a RNA Pico Chip on the Agilent BioAnalyzer 2100, and RNA was sent to IRIC's Genomics Core Facility for RNAseq transcriptomic profiling and analysis. Libraries were prepared using Clontech Ultra Low RNA SMARTer v4 (Takara) and sequenced on a HiSeq2000. Genes with false discovery rate (FDR) values < 0.05 were considered to be differentially expressed. Gene expression levels were compared using raw read counts and the negative binomial distribution model implemented in DESeq2 [14], a differential expression analysis package developed for R, which adjusts for sample variations with the assumption that the vast majority of genes should have correlating expression levels. More specifically, the regularized log transformation (rlog) implemented in DESeq2 was used to transform raw data into log₂ (readcount) for analysis and visualization.

2.3. Validation of the Cross-Reactivity of the PE-Conjugated Human Anti-Mouse Nurr77 (NR4A1) Monoclonal Antibody (mAb)

The human REA clone anti-mouse Nurr77 (NR4A1) IgG1 antibody cross-reacts with human NR4A1 as specified by MACS Miltenyi Biotec. This was verified on total spleen cells from 8–10 weeks old female C57BL/6 mice (not shown), and on total human PBMCs (Figure S1). Cells were cultured for 3 h at 37°C and 5% CO₂, at a concentration of 10⁶ cells/ml in IMDM supplemented with 10⁻⁴ β-2-mercaptomethanol (Sigma-Aldrich), 10% hi-FBS and penicillin/streptomycin (Gibco Life technologies) in presence or absence of PMA/ionomycin (eBioscience Cell Stimulation Cocktail 500x, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Cells were then harvested, washed with IMDM followed by 1X PBS and processed for flow-cytometry. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1X PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 μg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-

Louis, MO, USA) and/or 5 µg Human BD FCBLOCK (BD Biosciences). For human PBMCs, the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to detect extracellular markers: APC-mouse Anti-Human CD19 and PerCP-eFluor 710 Anti-Human CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Intra-nuclear labelling to detect NR4A1 was performed using the FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS and 5 µg Human BD FCBLOCK (BD Biosciences). The PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1 was used and compared to the use of PE-conjugated human REA isotype control (MACS, Miltenyi Biotec). Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde for 18 h prior to analysis. Data acquisition of 10⁵ events per sample was performed with LSRIIB (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA) and GraphPad Prism. All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

2.4. Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Peripheral Blood Total, MZ, and Precursor-Like MZ B-Cells

PBMCs were thawed, washed with IMDM followed by 1X PBS and processed for flow-cytometry. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEADFixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using FACS buffer (1X PBS, 2% hi-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS, 10 µg mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 5 µg Human BD FCBLOCK (BD Biosciences). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used to detect extracellular markers: APC-mouse Anti-Human CD19, BB515-mouse Anti-Human IgM, BV421-mouse Anti-Human CD10, BUV395-mouse Anti-Human CD73, BV786-mouse Anti-Human CD39, PE-Cy7-mouse Anti-Human CD83 (BD Biosciences) and PerCP-eFluor 710 Anti-Human CD1c (eBioscience, San Diego, CA, USA). Intra-nuclear labelling was performed using the FoxP3/ Transcription Factor Staining Buffer Set. Non-specific binding sites were blocked using 20% hi-FBS and 5 µg Human BD FCBLOCK. The PE-conjugated human REA clone anti-mouse NR4A1 was

used and compared to the use of PE-conjugated human REA isotype control. The PE-conjugated mouse anti-human NR4A3 was from Santa Cruz Biotechnology. Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde for 18 h prior to analysis. Data acquisition of 10⁵ events per sample was performed with LSRIIB, and analysis was done with FlowJo7.6.3 software and GraphPad Prism. All stainings were compared to that of FMO values and isotype controls. Anti-mouse Ig(κ) Compbeads and CS&T Beads were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRIIB, respectively.

2.5. Flow-Cytometry Characterization of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 Expression by Human Tonsillar B-Cells

Human tonsillar samples from healthy individuals who underwent surgical tonsillectomy were mechanically processed and cells were frozen in liquid nitrogen until use. Cells were thawed, washed in IMDM and B-cells were negatively enriched > 95% by an immunomagnetic based technology (Dynabeads Untouched Invitrogen Life technologies). Total B-cells were subsequently cultured at a concentration of 10⁶ cells/ml in IMDM supplemented with 10⁻⁴ β-2-mercaptomethanol, 10% hi-FBS and penicillin/streptomycin, in absence or presence of stimulus (PMA/ionomycin) for 18 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were recovered and processed for flow-cytometry as stated above.

2.6. Functional Assays

Autologous precursor-like marginal zone (MZ) B-cells, total CD1c⁻ B-cells and CD4⁺ T-cells were sorted from human tonsils of healthy donors. T-cells were cultured alone or co-cultured with either of the B-cell populations at a ratio of 3:1 for 36 h at 37°C and 5% CO₂ on anti-CD3 (2 μg/ mL) (ULTRA-LEAF Biolegend) coated flat bottomed 96 well plates with soluble anti-CD28 (2 μg/ mL) (ULTRA-LEAF Biolegend), in presence or absence of an anti-CD83 blocking antibody (2 μg/ mL) (HB15 cat No CBMAB-C1765-CQ Creative Biolabs). T-cell activation was assessed by flow-cytometry analyses of intranuclear Ki67 (eBioscience) expression following the protocol described above.

2.7. Statistical Analyses

Statistical significance of differences between groups was assessed with a unpaired Student's T test for comparison between two groups or with an ANOVA with post-hoc Tukey test for multiple comparisons. Analyses were performed using GraphPad PRISM5.0/ Windows. Results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

Live CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{hi}CD10⁻ mature MZ and CD19⁺CD1c⁺IgM⁺CD27⁺CD21^{lo}CD10⁺ precursor-like MZ B-cells from the blood of human healthy donors were FACS sorted. RNA-Seq transcriptomic analyses allowed us to demonstrate gene transcripts for NR4A1, 2 and 3 (Figure 1A–C), as well as for the immunoregulatory molecule CD83 in both populations (Figure 1D). Note that values obtained for the B-cell marker CD19 stand between 10 and 15 on the same log₂ (readcount) scale. Gene transcripts for NR4A1 and NR4A2 were slightly more elevated than NR4A3, and those for CD83 were relatively high. For means of NR4A1 protein detection by flow-cytometry and because of experimental suitability, we have used the PE-conjugated human REA clonal antibody directed against murine NR4A1, which cross-reacts with human NR4A1. This was first verified on PBMCs (Figure S1). We found that stimulation with PMA/ionomycin for 3 h [6] allowed us to measure increased expression of NR4A1 by total human B-cells, of which 50% were positive for the innate glycolipid binding molecule CD1c [15] (Figure S1). Subsequently, flow-cytometry analyses of NR4A1 and CD83 protein expression on unstimulated ex vivo samples revealed that co-expression of NR4A1 and CD83 was mainly found within CD1c⁺ B-cells, which were heterogeneous and included IgM⁺CD27⁺ MZ and IgM⁺CD27⁺CD10⁺ precursor-like MZ B-cells (Figure 2A). Similar observations were found for NR4A3 and CD83 co-expression (not shown). As for the CD1c-negative B-cells which co-expressed NR4A1 and CD83, all expressed CD10 and were negative for IgM and low for CD27, reminiscent of post-germinal center B-cells, but nature of which has yet to be determined.

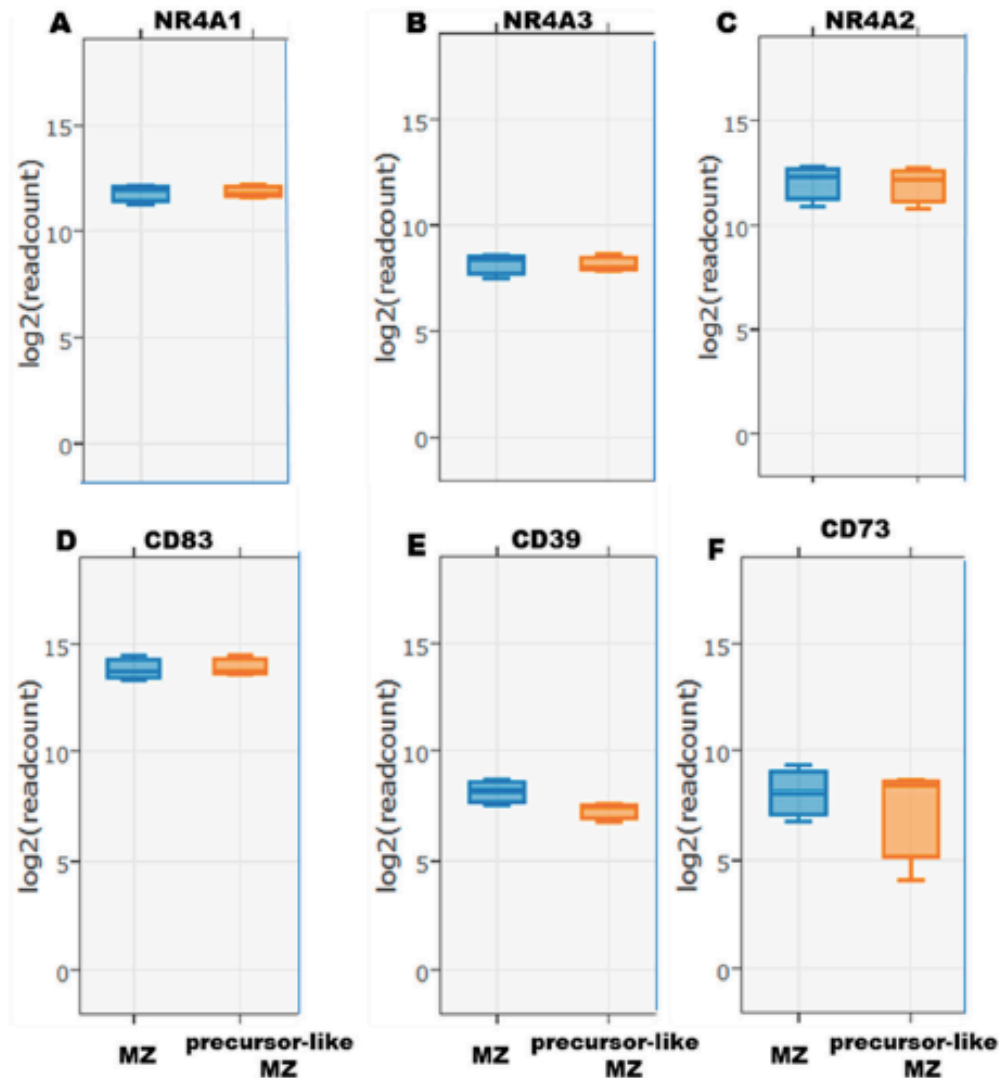


Figure 1. RNA-Seq analyses of (A) NR4A1, (B) NR4A3, (C) NR4A2, and (D) CD83, as well as (E) CD39 and (F) CD73 expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors \pm SD.

Although precursor-like MZ B-cells are less frequent in blood than MZ B-cells (Figure 2A), the analyses of frequencies of NR4A1⁺CD83⁺ (Figure 2B) and NR4A3⁺CD83⁺ (Figure 2C) B-cells from five different donors show that there are more co-expressing cells within the precursor-like MZ population when compared to that of MZ and total B-cells (Figure 2B,C). Levels of expression of NR4A1, NR4A3, and CD83 were also significantly higher in precursor-like MZ B-cells when compared to MZ and total B-cells (Figure 2D–F). Albeit there is discrepancy that exists between the RNA-Seq transcript data in Figure 1 and the GeoMFI data for NR4A1, NR4A3, and CD83 in Figure 2D–F, it

is important to understand that there are different major post-transcriptional mechanisms, not fully elucidated, that might interfere with a straight association between mRNA and protein levels. Furthermore, this can change from gene to gene.

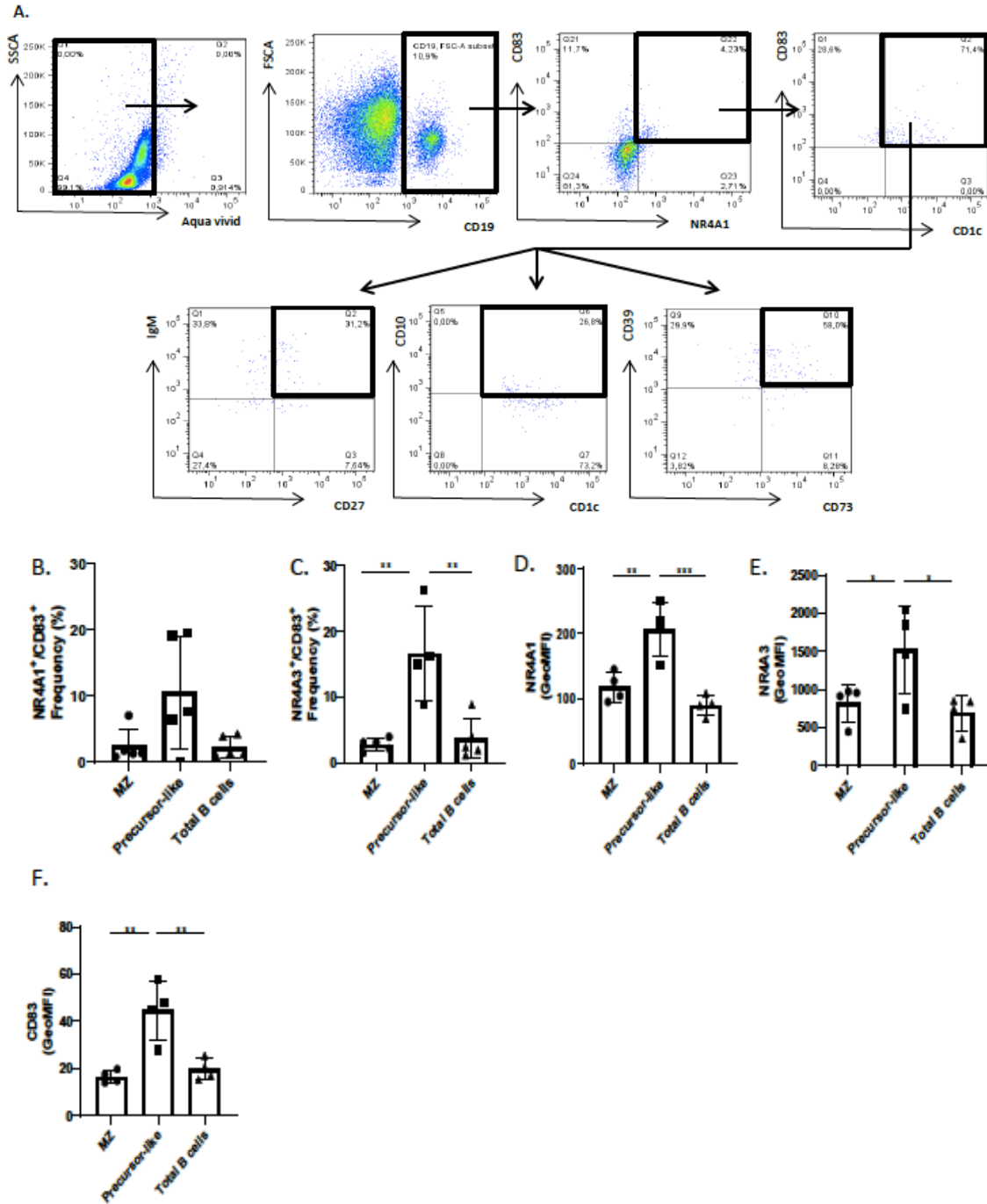


Figure 2. Flow-cytometry analyses of NR4A1, NR4A3, CD83, CD39, and CD73 expression by live ex vivo unstimulated human blood B-cells. (A) Gating strategy: Singlet Live CD19⁺ B-cells were analyzed for NR4A1 or NR4A3 and CD83 co-expression. NR4A1⁺ or NR4A3⁺ (not shown) CD83⁺ B-cells were then analyzed for CD1c expression, and subsequently for IgM and CD27 expression, for CD10 expression, and for CD39 and CD73 expression. (B) Relative frequencies of NR4A1 and CD83 and (C) NR4A3 and CD83 co-expressing marginal zone (MZ), precursor-like MZ and total B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (A–C) Data are representative of 5 healthy donors. (D) Levels of expression as determined by geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of NR4A1, (E) NR4A3, and (F) CD83 for MZ, precursor-like MZ and total B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (D–F) Data are representative of four healthy donors. Significance levels are shown as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

The hydrolysis of extracellular ATP by membrane-bound ectonucleotidases CD39 and CD73 confer Breg potential [13,16] by allowing production of immunosuppressive adenosine. Signaling via the adenosine receptor has been shown to regulate NR4A expression [17]. As such, RNA-Seq (Figure 1E,F) analyses of blood mature MZ and precursor-like MZ B-cells revealed expression of both CD39 and CD73 by these populations. Flow-cytometry analyses of CD1c⁺ B-cells co-expressing NR4A1 and CD83, which include MZ populations, revealed the majority expressed CD39 and a substantial fraction were also CD73⁺ (Figure 2A). On the other hand, flow-cytometry analyses starting from blood MZ populations revealed that not all of these cells expressed CD39 and CD73 proteins, and not all that are CD39⁺CD73⁺ co-expressed NR4A1 and CD83. However, those that did co-express NR4A1 and CD83 were in majority CD39⁺CD73⁺ (Figure S3C).

RNA-Seq analyses also showed that MZ and precursor-like MZ B-cells express other Breg associated molecules [18] (Figure S2). Moreover, MZ and precursor-like MZ B-cells express molecules often associated with regulatory functions such as HLA-G [19] and TLR10 [20,21] (Figure 3). Of note, both populations did not express transcripts for TLR9, and rather expressed TLR7 (Figure 3). RNA-Seq detected CD1d transcripts in both populations (Figure 3), the latter which is expressed by most Bregs in mice and in humans [18], and which has recently been shown to be important for induction of iNKT cell suppressive functions, identifying another way by which Bregs may exert regulatory functions [22]. Interestingly, we found CD1a and IL-21R gene transcripts mainly in precursor-like MZ B-cells (Figure 3), and IL-21 has been shown to modulate B-cell

suppressive functions [23]. Although appealing, a role for IL-21 in modulating Breg activity of precursor-like MZ B-cells remains to be established.

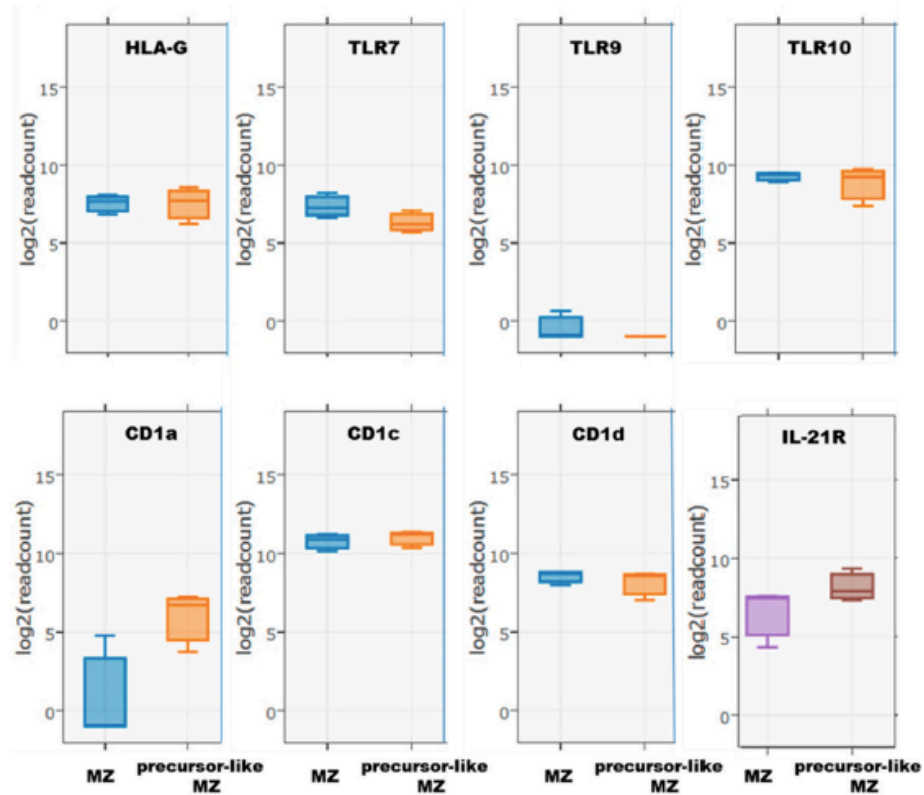


Figure 3. RNA-Seq analysis of HLA-G, TLR7, 9, 10, and CD1a, c, d, and IL-21R expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors \pm SD.

RNA-Seq demonstrated relatively high levels of gene transcripts for TGF- β 1 and IL-10R in both B-cell populations (Figure 4). IL-35 and IL-10 gene transcripts were lower, which could be consistent with the capacity to produce these cytokines upon stimulation [18]. We also found several molecules associated with Breg activity, such as Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1) and granzyme B (GZMB) [18] that were not expressed neither by blood mature MZ nor precursor-like MZ B-cells ex vivo (Figure 4).

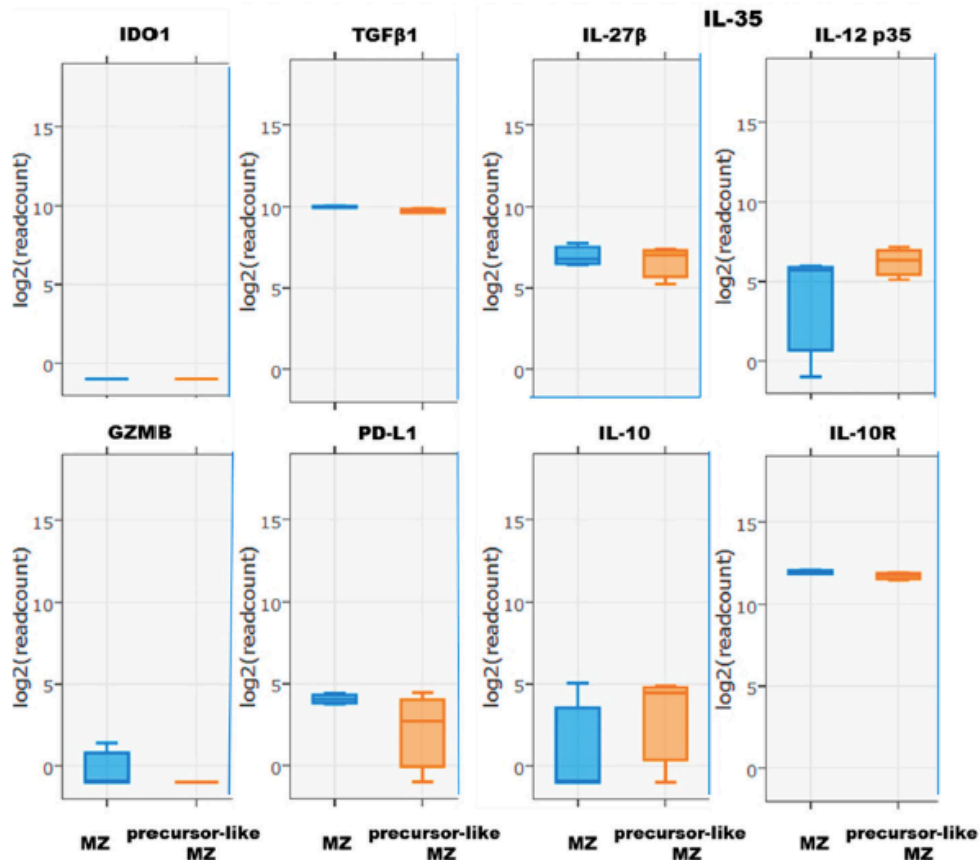
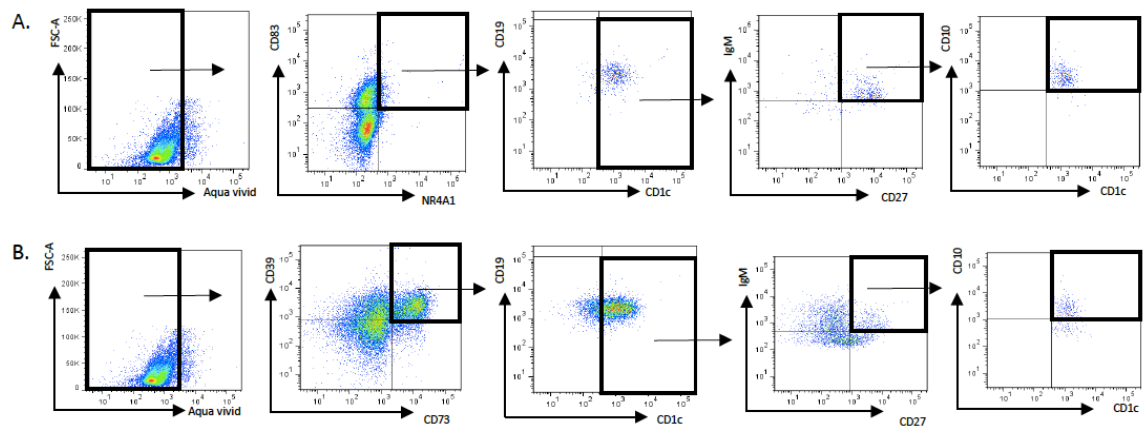


Figure 4. RNA-Seq analyses of Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1), TGF β 1, IL-35, granzyme B, PD-L1, IL-10, and IL-10R expression by ex vivo human blood marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors \pm SD.

In contrast to what was found in blood, precursor-like MZ B-cells were more abundant than MZ in human tonsils (Figure S3A). Reminiscent of our observations in blood, we found that when unstimulated, precursor-like MZ B-cells were the main population co-expressing the NR4A1 and CD83 proteins (Figure 5A,E), and levels of expression of NR4A1 and CD83 were significantly higher in precursor-like MZ B-cells when compared to total, total CD39⁺ or MZ B-cells (Figure 5C,D). Similar preliminary observations were found for NR4A3⁺CD83⁺ B-cells (Figure S3B). Unstimulated live B-cells which co-expressed CD39 and CD73 were mostly CD1c⁺ B-cells, which included IgM⁺CD27⁺CD10⁻ MZ and CD10⁺ precursor-like MZ B-cells (Figure 5B). Flow-cytometry analyses of precursor-like MZ B-cells revealed that not all these cells expressed CD39 and CD73, but it is within the latter that we found the highest proportion of NR4A1⁺CD83⁺ cells (Figure S3A). Following stimulation with PMA/ionomycin, NR4A1 and CD83 expression levels were significantly upregulated in total B-cells (Figure 5F,G

left panels) and there was a strong trend for increased expression by total CD39⁺ B-cells (Figure 5F,G right panels), but levels of expression by MZ populations were less significantly affected (Figure 5F,G middle panels) presumably in relation to their already elevated expression levels *ex vivo*.

Finally, we have assessed the capacity of tonsillar precursor-like MZ B-cells to regulate T-cell activation *in vitro*. We show that percentages of activated T-cells expressing Ki-67 (Figure 6) are reduced (approximately 15%) following co-culture at a 3:1 ratio with precursor-like MZ B-cells, but not in presence of CD1c⁻ B-cells. These findings are similar to what has been reported for Breg activity at similar T:B ratios [24]. Furthermore, this regulatory function was affected in presence of an anti-CD83 blocking antibody (Figure 6). Given the low yield of precursor-like MZ B-cells, studies with an isotype control have been performed with CD1c⁻ B-cells co-cultured with autologous T-cells on anti-CD3⁺ anti-CD28. Both anti-CD83 and the isotype control had no effect on T-cell Ki-67 expression.



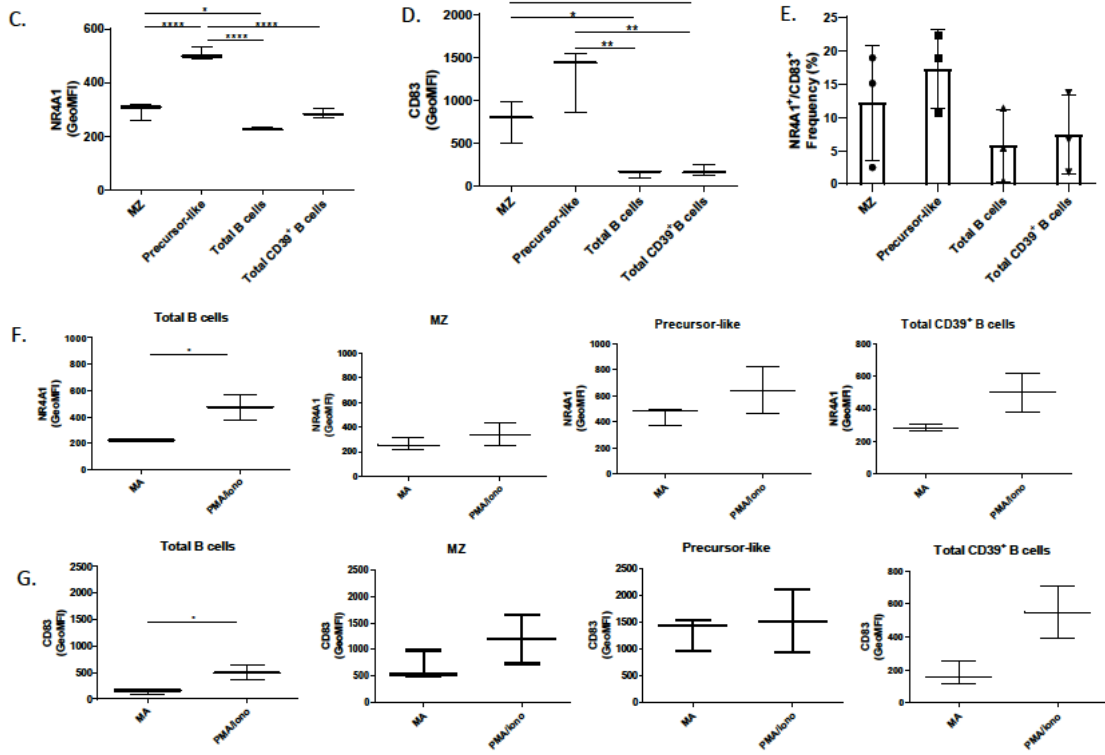


Figure 5. Flow-cytometry analyses of live unstimulated human tonsillar B-cells. (A) B-cells which co-expressed NR4A1 and CD83 were further analyzed for CD1c⁺ expression, the latter were then analyzed for IgM and CD27 expression, and IgM⁺CD27⁺ cells were analyzed for CD10 expression. (B) B-cells which co-expressed CD39 and CD73 were analyzed for CD1c⁺ expression, the latter were then analyzed for IgM and CD27 expression, and IgM⁺CD27⁺ cells were analyzed for CD10 expression. (C) Levels of expression of NR4A1, (D) CD83 for total, MZ, precursor-like MZ and total CD39⁺ B-cells, and (E) Frequencies of NR4A1 and CD83 co-expressing total, MZ, precursor-like MZ and total CD39⁺ B-cells were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. (F) NR4A1 and (G) CD83 expression levels for total, MZ, precursor-like MZ and total CD39⁺ B-cells following stimulation or not with PMA/ionomycin were compared with an unpaired Student's *t* test. Data are representative of at least 3 different donors (A,B). Data are presented as mean value of 3 independent experiments for the same donor ± SD (C–G), and was repeated for at least 3 healthy donors. Geometric Mean fluorescence Intensity (GeoMFI), Medium Alone (MA). Significance levels are shown as * (*p* < 0.05), ** (*p* < 0.01), **** (*p* < 0.0001).

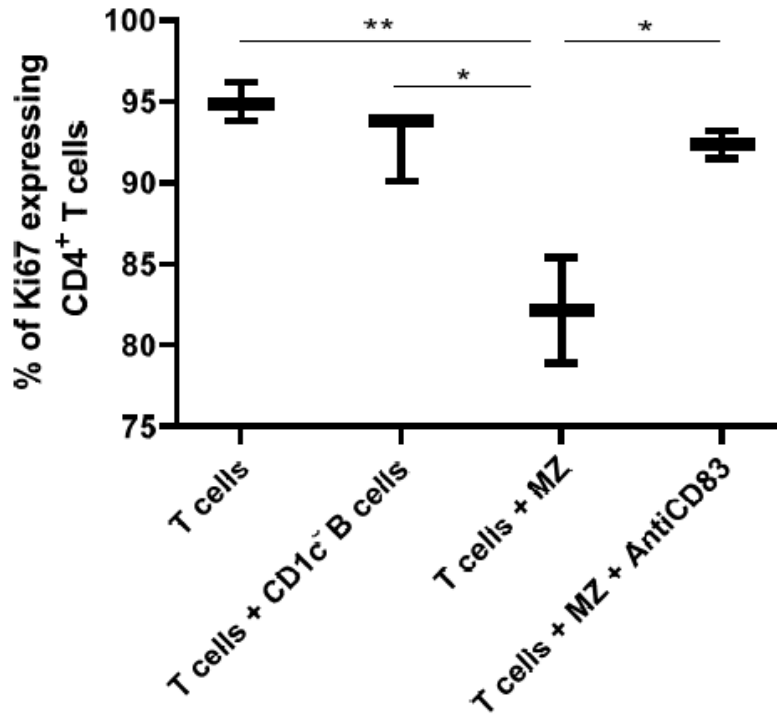


Figure 6. Reduced CD4⁺ T-cell proliferation following co-culture with precursor-like MZ B-cells. Sorted tonsillar precursor-like MZ or total CD1c⁻ B-cells were co-cultured for 36 h with anti-CD3 + anti-CD28, with autologous sorted tonsillar CD4⁺ T-cells, at a ratio of 3:1 T:B cells, in presence or absence of an anti-CD83 blocking antibody. Note that because of limited tonsillar samples, we could not assess ratios above 3:1. Data are presented as percentages (%) of Ki67 (cell cycle) expressing T-cells and % between groups were compared with an ANOVA with post-hoc Tukey test. The data are presented as mean values of triplicates ± SEM for one donor and are representative of two independent donors. Anti-CD83 blocking was done once. Significance levels are shown as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

Altogether, our data show that human blood MZ and precursor-like MZ B-cells express NR4A1, 2 and 3 as well as high levels of CD83 gene transcripts. They also express CD39 and CD73 gene transcripts. However, we found that not all blood MZ and precursor-like MZ B-cells express proteins for these markers. Co-expression of NR4A1 or NR4A3 and CD83 proteins is heterogeneous, and the majority of B-cells co-expressing these markers are CD1c⁺ and express CD39, of which a proportion is also CD73⁺. Strikingly, elevated frequencies of cells co-expressing NR4A and CD83 are found within the precursor-like MZ B-cell population. Moreover, it is within the latter that we found significantly elevated expression levels of these proteins. As for blood, we found that in tonsils the main population to co-express NR4A and CD83 are precursor-like MZ B-cells, which bear the highest levels of expression for these markers. We found that cells co-expressing NR4A1 and CD83 are mostly CD39⁺CD73⁺ but not all CD39⁺CD73⁺ cells

express NR4A1 and CD83. We found that sorted total precursor-like MZ B cells exerted regulatory activity on activated autologous tonsil CD4⁺ T-cells, and this activity was reduced by an anti-CD83 blocking antibody.

Breg potential within precursor-like MZ B cells might be found within an NR4A and CD83 co-expressing sub-population or differentiation stage. However, further experimentation would be required to ascertain this point, and we feel it is beyond the scope of this manuscript.

MZ populations are known for their polyreactive BCR and its autoreactive potential [24,25]. It is therefore possible that NR4A1-3 expression in these cells be maintained similarly to that observed for Tregs, where NR4A1-3 expression is likely maintained through a tonic autoreactive TCR signal [5]. Despite the requirement for further experimentation, our data suggest that maintenance of NR4As expression allows for high CD83 expression, which regulatory properties could be important to Breg function. Given that activated tonsillar T-cells expressed CD83, we propose that homotypic interactions with high CD83 on precursor-like MZ B-cells might have delivered regulatory signals, as has been described for dendritic cells whereby CD83 interactions via cell to cell contact mediated inhibition of pro-inflammatory signaling by inhibiting p38 α phosphorylation [26]. This however will require further experimentation.

4. Conclusions

We believe these observations shed light on the Breg potential of MZ populations, mainly within the precursor-like fraction and identify potential Breg markers NR4A1-3 and CD83, which as for Tregs, may be involved in stabilization of a regulatory status. Our findings may be useful to therapeutic strategies aiming at modulation of Breg responses.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4468/8/4/50/s1>, Figure S1: NR4A1 expression by human blood B-cells following 3 h incubation in absence or presence of PMA/ionomycin. Figure S2: RNA-Seq analyses of expression of Breg associated molecules by ex vivo human blood

marginal zone (MZ) and precursor-like MZ B-cells. Figure S3: Flow-cytometry analyses of blood and tonsil marginal zone (MZ) B-cells.

Author Contributions: K.D.-L. and M.B. performed the human tonsil *in vitro* cellular experiments and analyzed the data. K.D.-L. and M.A. performed the functional studies. M.M. performed the murine and human PBMC flow-cytometry experiments, and analyzed the data along with K.D.-L. and P.C., J.C.-C. prepared human PBMCs for cell sorting of human blood MZ and precursor-like MZ B-cells, and performed RNA isolation. P.C. and J.S. provided and processed murine samples as well as technical and scientific guidance. J.P. and M.R. designed the experiments, analyzed the data and wrote the article. All authors revised the last version of the manuscript. J.P. and M.R. are senior co-authors.

Acknowledgments: We are grateful to Lyvia Fourcade for help with lab management. Raphaële Lambert, Jennifer Huber and Patrick Gendron (IRIC Genomic and Bioinformatics core facilities) for RNASeq transcriptomic and data analyses, respectively. We are grateful to Bertrand Allard (CRCHUM) for helpful discussions. We are grateful to Daniel Kaufmann and Nathalie Brassard (CRCHUM) for providing human tonsil samples and the Réseau Sida FRQS for providing human blood samples. We are grateful to Dre Dominique Gauchat and the CRCHUM flow-cytometry core facility.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fontaine, J.; Chagnon-Choquet, J.; Valcke, H.S.; Poudrier, J.; Roger, M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood* 2011, 117, 145–155.
2. Chagnon-Choquet, J.; Fontaine, J.; Poudrier, J.; Roger, M. IL-10 and lymphotoxin- α expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS ONE* 2014, 9, e101949.
3. Sabourin-Poirier, C.; Fourcade, L.; Chagnon-Choquet, J.; Labbé, A.-C.; Alary, M.; Guédou, F.; Poudrier, J.; Roger, M. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci. Rep.* 2016, 6, 32318.
4. Mauri, C.; Bosma, A. Immune regulatory function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2012, 30, 221–241.
5. Iizuka-Koga, M.; Nakatsukasa, H.; Ito, M.; Akanuma, T.; Lu, Q.; Yoshimura, A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J. Autoimmun.* 2017, 83, 113–121.
6. Ashouri, J.F.; Weiss, A. Endogenous Nur77 is a specific indicator of antigen receptor signaling in human T and B cells. *J. Immunol.* 2016, 198, 657–668.
7. Sekiya, T.; Kashiwagi, I.; Yoshida, R.; Fukaya, T.; Morita, R.; Kimura, A.; Ichinose, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; Yoshimura, A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat. Immunol.* 2013, 14, 230–237.
8. Bandukwala, H.S.; Rao, A. ‘Nurr’ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression. *Nat. Immunol.* 2013, 14, 201–203.

9. Breloer, M.; Kretschmer, B.; Lüthje, K.; Ehrlich, S.; Ritter, U.; Bickert, T.; Steeg, C.; Fillatreau, S.; Hoehlig, K.; Lampropoulou, V.; et al. CD83 is a regular of murine B cell function *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 2007, 37, 634–648.
10. Breloer, M.; Fleischer, B. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol.* 2008, 29, 186–194.
11. Duren, R.P.; Boudreaux, S.P.; Conneely, O.M. Genome wide mapping of NR4A binding reveals cooperativity with ETS factors to promote epigenetic activation of distal enhancers in acute myeloid leukemia cells. *PLoS ONE* 2016, 11, e0150450.
12. Figueiró, F.; Muller, L.; Funk, S.; Jackson, E.K.; Battastini, A.M.O.; Whiteside, T.L. Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology* 2016, 5.
13. Hong, C.-S.; Whiteside, T.L.; Schuler, P.J.; Saze, Z.; Cheng, D.; Jackson, E.K. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* 2013, 122, 9–18.
14. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014, 15, 550.
15. van Rhijn, I.; Godfrey, D.I.; Rossjohn, J.; Moody, D.B. Lipid and small-molecule display by CD1 and MR1. *Nat. Rev. Immunol.* 2015, 15, 643–654.
16. Allard, B.; Longhi, M.S.; Robson, S.C.; Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* 2017, 276, 121–144.

17. Bahar, B.; Crean, D.; McMorrow, J.P.; Cummins, E.P.; Mohan, H.; Murphy, E.P. Adenosine modulates NR4A orphan nuclear receptors to attenuate hyperinflammatory responses in monocytic cells. *J. Immunol.* 2015, 195, 1436–1448.
18. Mauri, C.; Menon, M. Human regulatory B cells in health and disease: Therapeutic potential. *J. Clin. Investig.* 2017, 127, 772–779.
19. Amodio, G.; de Albuquerque, R.S.; Gregori, S. New insights into HLA-G mediated tolerance. *Tissue Antigens* 2014, 84, 255–263.
20. Abdollahi-Roodsaz, S.; Dinarello, C.A.; O'Neill, L.; Netea, M.G.; Joosten, L.A.B. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: New developments. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016, 12, 344–357.
21. Guan, Y.; Hess, N.J.; Tapping, R.I.; Jiang, S.; Li, X. TLR10 is a B cell intrinsic suppressor of adaptive immune responses. *J. Immunol.* 2016, 198, 699–707.
22. Oleinika, K.; Rosser, E.C.; Matei, D.E.; Nistala, K.; Bosma, A.; Drozdov, I.; Mauri, C. CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nat. Commun.* 2018, 9.
23. Yoshizaki, A.; Miyagaki, T.; Dillillo, D.J.; Matsushita, T.; Horikawa, M.; Kountikov, E.I.; Spolski, R.; Poe, J.C.; Leonard, W.J.; Tedder, T.F. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012, 491, 264–268.
24. Blair, P.A.; Norena, L.Y.; Flores-Borja, F.; Rawlings, D.J.; Isenberg, D.A.; Ehrenstein, M.R.; Mauri, C. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 2009.

25. Cerutti, A.; Cols, M.; Puga, I. Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, 13, 118–132.

26. Bates, J.M.; Flanagan, K.; Mo, L.; Ota, N.; Ding, J.; Ho, S.; Liu, S.; Roose-Girma, M.; Warming, S.; Diehl, L. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2015, 8, 414–428.

Annexe 2 – Affiche présentée lors du 20^e congrès des étudiants, stagiaires et résidents du CRCHUM. Montréal, QC, Canada (3 mai 2018)

Étude de l'impact des niveaux élevés de BAFF sur la dérégulation des lymphocytes B de la zone marginale associée avec l'infection au VIH

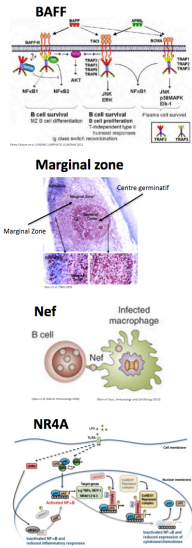


Michelle Byrns, Josiane Chagnon-Choquet, Johanne Poudrier* et Michel Roger* CRCHUM.

Laboratoire d'immunogénétique, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal, *co-séniors

Introduction

- Malgré la thérapie antirétrovirale, de l'inflammation et une dérégulation des cellules B persiste chez les patients infectés du VIH. On observe l'augmentation de la fréquence des cellules B de type précurseur de la zone marginale, du B-cell activating factor (BAFF), et l'hyperglobulinémie.¹ Nef dans le sérum et dans les cellules dendritiques des patients corrèle avec leurs niveaux de BAFF.²
- BAFF est un facteur de survie, de différenciation et d'activation des cellules B. Les marginal-zone B-cells ont besoin de BAFF pour leur sélection. Par contre, lorsque BAFF est en excès, il y a bris de tolérance, polyréactivité et autoréactivité.
- La zone marginale est une zone hétérogène où on retrouve des cellules de première ligne innées dont les cellules B de la zone marginale. Cette zone est en pourtour des centres germinatifs.
- Nef (protéine accessoire du VIH) pirate la machinerie intracellulaire des cellules B, et interfère avec la permutation de classe des immunoglobulines³.
- Les NR4As, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réponse inflammatoire et l'apoptose, sont dérégulés chez les MZ des progressifs.



Résultats

Figure 1. Gene expression array des MZ du sang d'individus VIH+ et contrôles

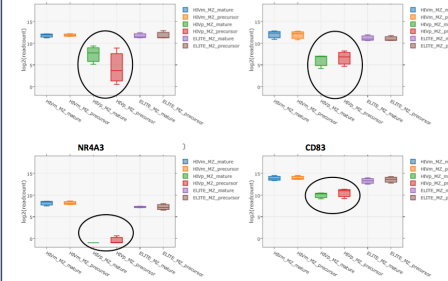


Figure 3. Cellules B isolées totales d'amygdales CD19/CD83 incubées en 4 différentes conditions

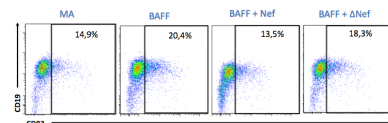


Figure 5. Cellules B isolées totales d'amygdales CD83+ CD19/NR4A1

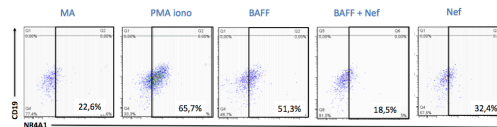


Figure 7. Cellules B isolées totales d'amygdales CD19/CD73 incubées en 4 différentes conditions

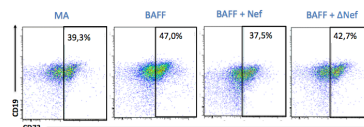


Figure 2. Analyse de l'expression des gènes des MZ de progressifs

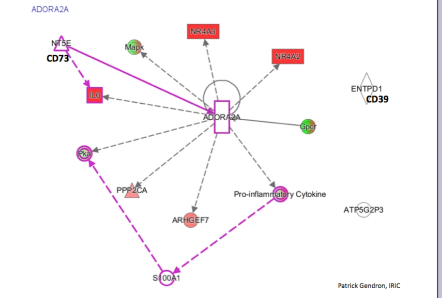


Figure 4. Géométrie des cellules B isolées totales d'amygdales CD83

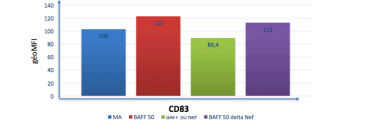


Figure 6. Géométrie des cellules B isolées totales d'amygdales CD83+ NR4A1+

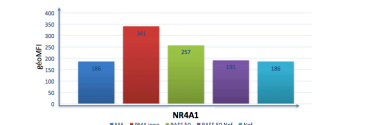
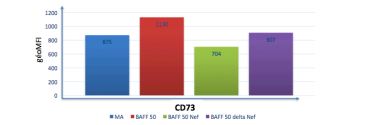


Figure 8. Géométrie des cellules B isolées totales d'amygdales CD19/CD73



Hypothèse

- Des niveaux élevés de BAFF et Nef contribuent à la modulation de l'expression des NR4As chez les MZ

Objectifs

- Étudier *in vitro* si des niveaux élevés de BAFF seul ou en présence de Nef agissent directement sur l'expression des NR4As au niveau de populations MZ et autres cellules B des amygdales humaines

Cellules d'amygdales

- Nous avons choisi d'utiliser des cellules d'amygdales puisque ceux-ci sont riches en cellules B. L'amygdale fait partie du nasal associated lymphoid tissue (NALT) faisant partie du MALT.

Méthodes

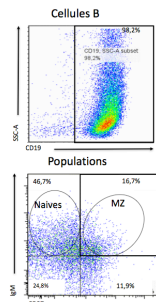
Protocole d'isolation des cellules d'amygdales



- Après isolation par méthode immunomagnétique, les cellules B sont enrichies à 98% et mises en culture en présence de BAFF et/ou Nef O/N

Analyse

- Le cocktail utilisé pour analyse en cytofluorométrie contient les marqueurs suivants:
 - CD19 : Cellules B
 - CD27, IgM, CD1c : Cellules B de la zone marginale
 - CD10 : Cellules immatures
 - CD73, CD39 : Voie de l'adénosine
 - NR4A1, CD83 : Régulation de l'inflammation



Perspectives

- Préincubation avec Nef
 - 3 heures
- Mesure des niveaux des NR4As par Q-PCR
- Mesure d'adénosine et de CD73 solubles (surnageant)
- Vérification de la signalisation de l'adénosine récepteur en utilisant un agoniste de celui-ci en mesurant l'AMPc
- Mesure de la production d'IL-10 et évaluation des isotypes d'immunoglobulines par Multiplex
- Ajout d'un régulateur synthétique des NR4As

Remerciements

- Dr Pavel Chrobak
- Dr Dominique Gauchat
- Laboratoire du Dr. Kaufmann
- Mario Legault
- Dr. Cécile Tremblay
- Dr. Patrick Gendron (IRIC)



Conclusion

- BAFF augmente l'expression de:
 - NR4A1
 - CD83
 - CD73
- Nef interfère avec l'effet de BAFF
 - CD73 → Adénosine → A2AR → NR4A1 → Inflammation
 - CD83
- Donc, l'inflammation
- NR4A pourrait être ciblé de façon thérapeutique pour restaurer les populations dérégulées dans le contexte du VIH et d'autres maladies inflammatoires

Références

- Fontaine, J., Chagnon-Choquet, J., Vaicik, H.S., Poudrier, J., Roger, M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-infected B-cell disease progression in humans. *Blood*. 117, 1454-1455 (2011).
- Chagnon-Choquet, J., Gauvin, J., Roger, J., Fontaine, J., Poudrier, J., Roger, M. HIV Nef promotes expression of B-lymphocyte stimulator by blood dendritic cells during HIV infection in humans. *JID*. 211 (8), 1229-1240 (2014).
- Quake, X., He, B., Chiu, A., Knowles, D.M., Chabbert, A., Gerutti, A. Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat Immunol.* 7 (3), 302-310 (2006).