

BlyS/BAFF est impliqué dans la modulation du phénotype Breg des lymphocytes B de la zone marginale (MZ)

Kim Doyon-Laliberté^{1,2}, Matheus Naegle Aranguren^{1,2}, Michelle Byrns^{1,2}, Josiane Chagnon-Choquet^{1,2}, Johanne Poudrier^{1,2*}, Michel Roger^{1,2*}

1. CRCHUM 2. Département de Microbiologie, Immunologie et Infectiologie de l'Université de Montréal *co-séniors

INTRODUCTION

- Les MZ sont des lymphocytes B de premières lignes. Elles sont activées via des PRRs tels les TLR ou un BCR polyréactif. Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD1c⁺, IgM⁺, CD27⁺ et CD10, alors que ses précurseurs expriment CD10. Elles expriment de forts niveaux des récepteurs nucléaires NR4A1-3, ainsi que CD83 et de CD39, ce qui est associé à un fort potentiel Breg (Doyon-Laliberté et al. *Antibodies* 2019).
- L'inflammation est contrôlée par la famille des NR4A1-3 qui engendrent l'expression du marqueur CD83, un régulateur de l'activation (Duren et al. *PlosOne* 2016).
- Les ectonucléotidases CD73 et CD39 ont aussi un rôle dans le contrôle de l'inflammation via la voie de l'adénosine qui participe à la régulation de l'expression des NR4A. Cette voie est surtout utilisée par les Bregs (Figuro et al. *Oncoimmunology* 2016).
- Le facteur d'activation des cellules B, BAFF, aussi appelé BlyS (B Lymphocyte stimulator), est un régulateur de l'homéostasie des cellules B ainsi qu'un acteur clé de leur survie, leur activation et leur différenciation. Il se lie à trois récepteurs cellulaires, soit TACI, BCMA et BAFF-R (Mackay et al. *Immunol Rev* 2010). Les MZ sont sélectionnées par BAFF via TACI.
- Dans de nombreuses maladies autoimmunes, comme par exemple le lupus ou encore dans le contexte du VIH, les niveaux de BAFF sont en excès et sont associés à la dérégulation du compartiment B et à l'hyperglobulinémie. Dans le cas du VIH, nous avons également démontré une augmentation de la fréquence des précurseurs MZ exprimant IL-10 dans le sang. Ces changements sont observés dès la phase aiguë et perdurent malgré la thérapie (Chagnon-Choquet et al. *PlosOne* 2014, Fontaine et al. *Blood* 2011).

OBJECTIF/HYPOTHÈSE

- Hypothèse**
Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les niveaux élevés de BAFF modulerait l'expression de NR4A/CD83 et de CD39/CD73 chez les cellules B MZ, ce qui pourrait avoir un impact sur la fonction Breg de ces cellules.
- Objectif**
Étudier *in vitro* l'effet de niveaux élevés de BAFF sur le potentiel Breg des cellules B MZ provenant d'amygdales humaines.

MÉTHODOLOGIE

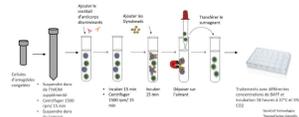
Spécimens

- Cellules d'amygdales provenant de donneurs sains, prélevées et homogénéisées par les membres du laboratoire du Dr Kaufmann.
- PBMCs provenant de donneurs sains.
- Conservés dans l'azote liquide.

Évaluation de la fonction Breg

- Tri des cellules d'amygdales autologues afin de garder les lymphocytes T, les lymphocytes B CD1c⁻ et les MZ précurseurs.
- Mise en co-culture selon le ratio T:B 3:1 avec et sans anti CD83 en plaque de 96 puits avec un anti CD3 et un anti CD28, pour 36 heures
- Récolte et analyse par cytométrie en flux des cellules T Ki-67+.

Isolation, culture *in vitro* et traitements de lymphocytes B pour analyses par cytométrie en flux ou multiplex



- Récolte des cellules B en culture.
- Procéder au marquage extracellulaire et intranucléaire ou multiplex (immunoglobulines).
- Acquisition au FACS sur LSRIB ou sur Luminex pour le kit multiplex.
- Analyse via FlowJo et GraphPad Prism.

Résultats préliminaires

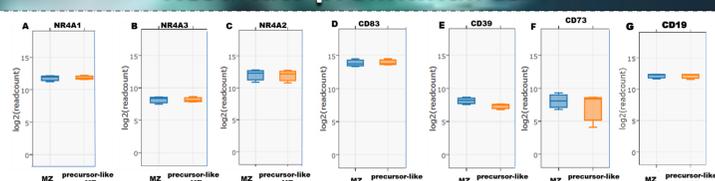


Figure 1. Les NR4A, CD83, CD39 et CD73 sont naturellement exprimés par les MZ et les précurseurs chez des donneurs sains. (A-G) L'expression des molécules est similaire à celle de CD19.

RÉSULTATS

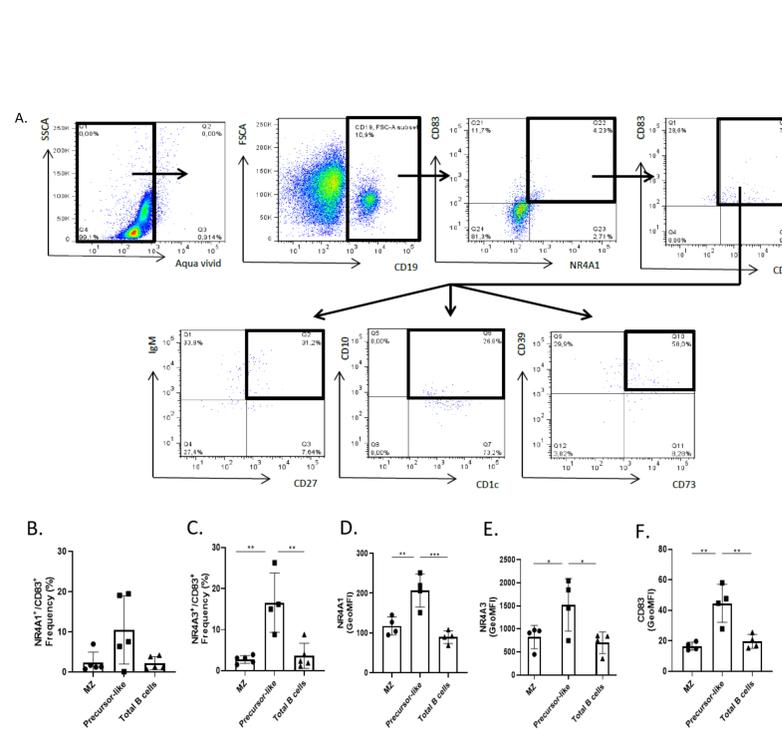


Figure 1. Phénotype des cellules NR4A1⁺/CD83⁺ provenant de PBMCs humains par cytométrie en flux. (A) L'analyse via FlowJo montre que la majorité des cellules NR4A1⁺/CD83⁺ sont des cellules CD1c⁺, comprenant les MZ, les MZ précurseurs et des cellules CD39⁺/CD73⁺. (B-C-D-E-F) Les MZ précurseurs expriment fortement NR4A1, NR4A3 et CD83.

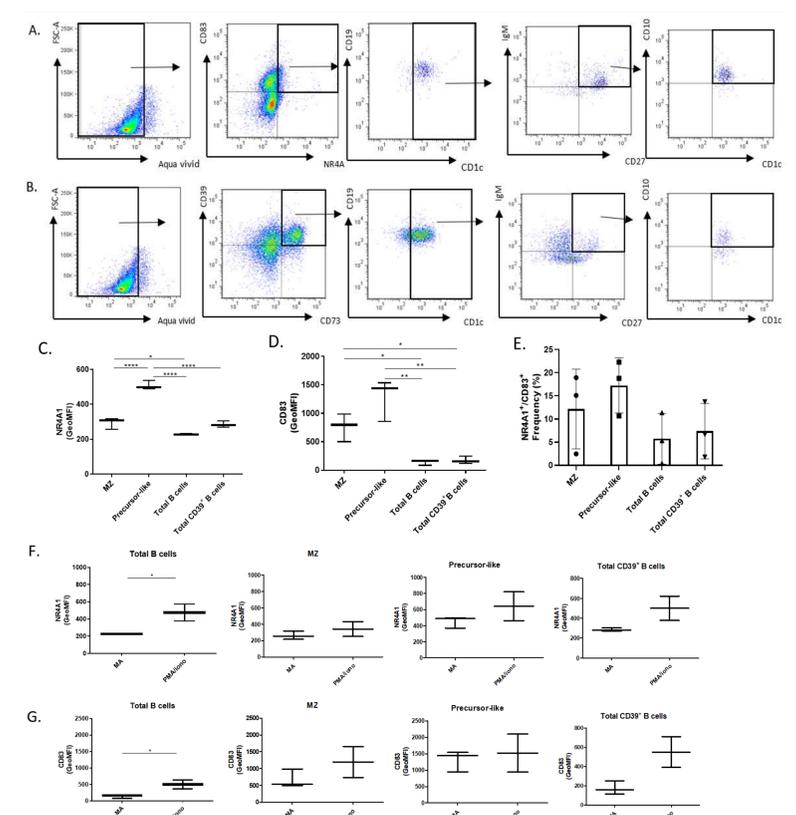


Figure 2. Phénotype des cellules non stimulées NR4A1⁺/CD83⁺ et des cellules CD39⁺/CD73⁺ provenant d'amygdales humaines par cytométrie en flux. (A-B) L'analyse via FlowJo montre que la majorité des cellules NR4A1⁺/CD83⁺ sont des MZ précurseurs et que le phénotype des cellules CD39⁺/CD73⁺ est hétérogène. (C-D-E) Les MZ précurseurs expriment fortement NR4A1 et CD83. (F-G) L'expression de NR4A1 et CD83 est inducible chez les B totales, les MZ, les MZ précurseurs et la population CD19⁺/CD39⁺.

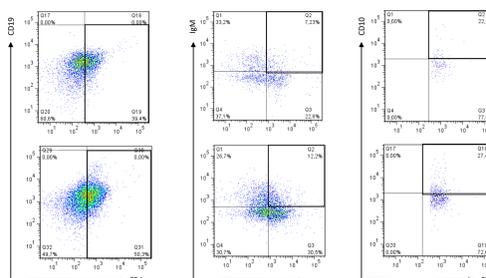


Figure 3. BlyS/BAFF amplifie la population MZ dans les amygdales humaines. Les panneaux du haut montre qu'en milieu seul, il y a 7,23% de MZ, dont 22% sont des précurseurs. En présence de BAFF à 500 ng/mL (panneaux du bas), la proportion de MZ monte à 12,2% et 27% d'entre eux sont des précurseurs.

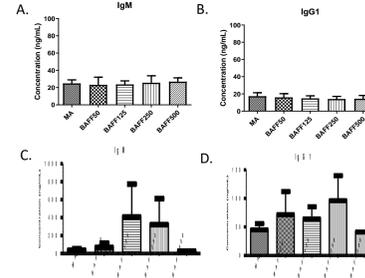


Figure 4. Effet de BlyS/BAFF sur la production d'immunoglobulines de cellules B totales d'amygdales humaines. (A-B) Les différentes concentrations de BAFF n'ont aucun impact sur la production d'IgM et d'IgG1 chez un donneur (D013). (C-D) Les différentes concentrations de BAFF chez un second donneur (LFB-019) modulent la production d'IgM et d'IgG1.

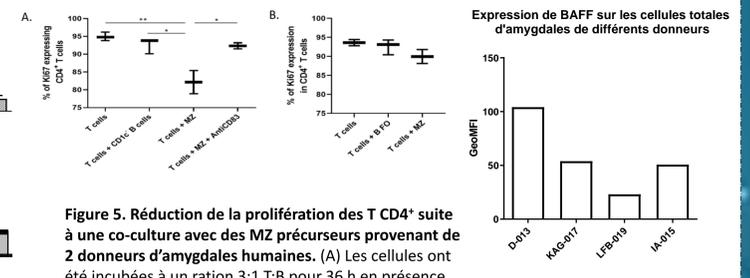


Figure 5. Réduction de la prolifération des T CD4⁺ suite à une co-culture avec des MZ précurseurs provenant de 2 donneurs d'amygdales humaines. (A) Les cellules ont été incubées à un ratio 3:1 T:B pour 36 h en présence ou en absence d'un anti CD83 bloquant. L'anti CD83 bloque la réduction de la prolifération des T CD4⁺ malgré la présence des MZ précurseurs. Aucune fonction Breg n'est observée chez les cellules B CD1c⁻. (B) Chez le 2^e donneur (IA-015), la diminution de prolifération des T CD4⁺ n'est pas similaire à celle observée chez le 1^{er} donneur (LFB-019) (voir figure 6).

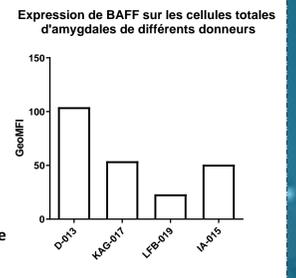


Figure 6. Les différents donneurs de cellules d'amygdales n'ont pas le même niveau d'inflammation initial. Les niveaux d'expression de BAFF présents initialement dans le tissu varient en fonction des différents donneurs.

CONCLUSION

- Les MZ précurseurs expriment fortement NR4A1 et CD83, autant dans le sang que dans les amygdales, donc ces molécules pourraient servir de marqueurs Breg, comme démontré chez les Treg.
- Ces cellules expriment CD39, un marqueur déjà associé au potentiel Breg.
- Les MZ précurseurs ont une fonction Breg et elle peut être réduite par l'ajout d'un anti-CD83.
- BAFF/BlyS enrichie la population MZ.
- BAFF/BlyS augmente la population CD39^{high}/CD19⁺ chez les cellules B d'amygdales.
- L'excès de BAFF/BlyS module la production d'immunoglobulines chez les B totales.
- Les niveaux de BAFF/BlyS des différents donneurs a un effet sur la fonction Breg des MZ précurseurs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêts

Laboratoire d'immunogénétique du Dr Roger, CR CHUM
 • Lyvia Fourcade
 • Alessandro Modica
 • Laurence Blondin-Ladrie
 • Marie-Claude Faucher
 Plateforme de Cytométrie, CR CHUM
 • Dre Dominique Gauchat
 • Philippe St-Onge
 Laboratoire du Dr Kaufmann, CR CHUM
 • Nathalie Brassard

Laboratoire du Dr Stagg, CR CHUM
 • Dr Pavel Chrobak
 • Dr Bertrand Allard
 IRIC
 • Patrick Gendron
 • Raphaële Lambert
 Dre Cécile Tremblay
 Dr Jean-Pierre Routhy
 Dr Mario Legault
 Faculté de médecine
 Université de Montréal

