



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle et phénotypique de lymphocytes B transitionnels CD24hi CD38hi associés à un phénotype régulateur chez des patients transplantés rénaux traités par Belatacept

Jérémy Bigot

► **To cite this version:**

Jérémy Bigot. Caractérisation fonctionnelle et phénotypique de lymphocytes B transitionnels CD24hi CD38hi associés à un phénotype régulateur chez des patients transplantés rénaux traités par Belatacept. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC0071 . tel-01523448

HAL Id: tel-01523448

<https://theses.hal.science/tel-01523448>

Submitted on 16 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ — — PARIS-EST

**Thèse de doctorat
Université Paris-Est
Spécialité : Immunologie
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

**Thèse présentée par
Jérémy Bigot
Soutenue le 10/11/2016**

**Caractérisation fonctionnelle et phénotypique de
lymphocytes B transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi}
associés à un phénotype régulateur chez des
patients transplantés rénaux traités par Belatacept**

Membres du jury :

Dr Flora Zavala	Rapporteur
Dr Odile Devergne	Rapporteur
Dr Matthieu Mahevas	Examineur
Pr Antoine Durrbach	Examineur
Pr Philippe Grimbert	Directeur de thèse
Pr José Cohen	Co-directeur de thèse

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale
INSERM U955 – équipe 21
Hôpital Henri Mondor
51, Av. du M^{al} de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil

Remerciements :

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à José Cohen de m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'abord comme ingénieur d'étude puis comme doctorant. Merci pour ton aide, de m'avoir fait confiance et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie Philippe Grimbert qui a encadré mon travail tout au long de cette thèse, je te remercie pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées durant ma thèse. Merci pour tes conseils et ton aide.

Je tiens à remercier Flora Zavala et Odile Devergne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Un grand merci pour le temps que vous m'avez accordé, votre gentillesse et votre disponibilité.

Je tiens également à remercier Matthieu Mahevas et Antoine Durrbach d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Caroline Pilon de m'avoir aidé et soutenu tout au long de ce travail, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci d'avoir toujours répondu présente à mes multiples demandes. Tu as été un acteur essentiel à la réalisation et au bon déroulement de mon projet. Merci pour tous ces bons moments et ta bonne humeur permanente.

Je remercie tous mes collègues de bureau encore présents ou déjà partis vers de nouveaux horizons. Merci pour votre aide et vos nombreux conseils. Merci à Allan pour ton expertise technique et scientifique, Salim pour nos multiples discussions et tes petites histoires. Merci à Claire, Cynthia, Ismail, Ryan, Matthieu, Asma pour tous ces moments passés ensemble, merci d'avoir fait de ces années passées avec vous une expérience humaine très enrichissante. Merci Marie d'avoir toujours répondu à mes demandes et pour ton aide dans la sélection et l'organisation des prélèvements de patients. Un grand merci à toi, Sina, pour tous ces moments d'échanges et ces multiples parties de rigolade.

Merci aux infirmières de l'hôpital de jour du service de néphrologie de m'avoir fourni les prélèvements nécessaires à la bonne réalisation de ce travail.

Je remercie le personnel des différentes plateformes de l'IMRB et je remercie tout particulièrement Adeline et Aurélie de la plateforme de cytométrie pour votre gentillesse et pour avoir toujours répondu favorablement à toutes mes demandes.

Merci à toute l'équipe de l'EFS pour leur aide et merci de m'avoir toujours permis d'utiliser votre cytomètre en flux dans les meilleures conditions.

Merci à toutes les personnes de l'équipe 21 qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de mon projet.

Un grand merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien. Un remerciement tout particulier à toi, Perrine, d'avoir toujours cru en moi et pour ton soutien indéfectible.

Résumé :

A l'instar des lymphocytes T régulateurs, l'étude de populations lymphocytaires B au potentiel immunosuppresseur a émergé ces dernières années. La capacité immunosuppressive des lymphocytes B régulateurs CD24^{hi} CD38^{hi} passant notamment par leur capacité à exprimer l'IL-10 a été mise en évidence dans plusieurs pathologies notamment chez les patients atteints de maladies auto-immunes. En transplantation rénale, le rôle de ces cellules dans la tolérance du greffon a également été suggéré. Néanmoins, la caractérisation de ces cellules semble très controversée et complexe. En effet à ce jour, il n'a été mis en évidence aucun marqueur spécifique permettant d'identifier clairement cette population régulatrice chez l'homme. L'analyse transcriptomique de ces cellules issues de donneurs sains nous a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs qui leur sont associés tels que CD9, CD10, CD5, ICOS-L (inducible T cell co-stimulator ligand), GARP (glycoprotein-A repetitions predominant protein) et CD1b. Nous avons pu montrer que la présence de ces marqueurs était corrélée à l'expression d'IL-10 et que l'expression de CD1b sur les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} était associée à une augmentation de la capacité suppressive de ces cellules. La présence de ces cellules CD1b⁺ a également été retrouvée en plus forte proportion chez les patients traités par belatacept identifiés comme présentant un meilleur pronostic clinique du greffon. Des résultats préliminaires suggèrent également que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la fonction immunorégulatrice des LB CD24^{hi} CD38^{hi} comme la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'IL-35. L'identification de ces molécules permet d'améliorer la caractérisation et la compréhension des mécanismes immunorégulateurs de ces cellules et pourrait être d'une grande aide pour le monitoring immunologique de la réponse humorale en transplantation.

Mots clés : Lymphocyte B régulateur, transplantation, tolérance, IL-10.

Abstract :

Like for regulatory T cells, many studies on B cells immunoregulatory functions have emerged in the past few years. The immunosuppressive capacity of CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B cells known for their ability to produce IL-10 has been demonstrated in several pathologies, in particular in autoimmune diseases. In kidney transplant, the role of these cells in graft tolerance has also been suggested. So far, accurate phenotypic and functional analyses of these Breg are still lacking. Transcriptomic microarray analysis of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells from healthy donors led us to identify new phenotypic markers as CD9, CD10, CD5, ICOS-L (inducible T cell co-stimulator ligand), GARP (glycoprotein-A repetitions predominant protein) and CD1b. We showed a link between these markers and IL-10 expression and we demonstrated that a CD1b marker on CD24^{hi}CD38^{hi} B cells was associated with an increase of regulatory properties. Breg CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ was also found in higher frequencies in kidney transplant recipients treated with belatacept. Finally, preliminary results also suggest that other regulatory mechanisms may be involved in immunoregulatory function of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, especially through immunoregulatory cytokines such as IL-35. The identification of these molecules can improve characterization and understanding of immune-regulatory mechanisms of these cells and could be helpful in humoral response immuno-monitoring in transplantation.

Key words : Regulatory B cell, transplantation, tolerance, IL-10.

INTRODUCTION	10
1 Les lymphocytes B.....	12
1.1 Origine et développement des lymphocytes B	12
1.1.1 Lymphocytes B transitionnels	14
1.2 Maturation et développement des sous populations de lymphocytes B.....	16
1.2.1 Lymphocytes B folliculaires.....	17
1.2.2 Lymphocytes B de la zone marginale	18
1.2.3 Lymphocytes B périphériques.....	19
1.3 Rôle des lymphocytes B	20
1.3.1 Sécrétion d'anticorps	20
1.3.2 Présentation d'antigènes	20
1.3.3 Sécrétion de cytokines.....	21
1.3.4 Formation de centres germinatifs ectopiques	22
1.4 Les lymphocytes B régulateurs	23
1.4.1 Phénotype des Breg	25
♦ Breg murin	27
♦ Breg humains.....	32
1.4.2 Mécanismes impliqués dans l'induction de Breg	38
♦ Toll-Like Receptors (TLR).....	38
♦ CD40.....	40
♦ B-cell receptor (BCR).....	41
♦ CD80/CD86.....	42
1.4.3 Voies métaboliques impliquées dans l'induction des Breg	43
1.4.4 Mécanismes d'immunorégulation des Bregs	46
♦ Sécrétion d'IL-10.....	46
♦ Transforming Growth Fator-beta (TGF- β).....	50
♦ Sécrétion d'IgG4	51
♦ Sécrétion d'IgM.....	52
♦ Granzyme B :	53
♦ L'indoleamine 2.3-dioxygénase (IDO).....	54
♦ Programmed cell death 1 ligand (PD-L1).....	55
♦ Ligand induisant l'apoptose	56
1.4.5 Mécanismes de régulation via les cytokines de la famille de l'IL-12.....	57
♦ Epstein Barr virus induced gene 3 (EBI3).....	58
♦ IL-35.....	59
♦ IL-27.....	60
2 Transplantation	62
2.1 Le rejet de greffe	62

2.1.1	La présentation directe	63
2.1.2	Présentation indirecte	64
2.1.3	Présentation semi-directe	64
2.2	Physiopathologie du rejet de greffe solide	65
2.3	La réponse humorale en transplantation	67
2.3.1	Les différents types de rejets humoraux	68
2.3.2	Rejet humoral aigu	68
2.3.3	Rejet humoral chronique	69
2.4	Stratégies immunosuppressives	71
2.4.1	Inhibiteurs de la calcineurine	71
2.4.2	Inhibiteurs de la voie mTOR	73
2.4.3	Belatacept	73
2.4.4	Déplétion des lymphocytes B	76
2.4.5	Les immunoglobulines intraveineuses	77
2.5	Lymphocytes B et tolérance en transplantation	77
2.5.1	Lymphocytes B et tolérance chez l'animal	78
2.5.2	Lymphocytes B et tolérance chez l'homme	79
♦	Signature B en transplantation	79
♦	Lymphocytes B transitionnels dans la tolérance	81
	Objectif du travail de thèse	83
	RESULTATS	85
1	Article : Signature transcriptomique des cellules transitionnelles CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} associée à un phénotype régulateur chez des patients greffés rénaux	86
2	Résultats complémentaires	110
	DISCUSSION	117
1	Caractérisation phénotypique des Breg	118
2	Immunomonitoring en transplantation	125
3	Lymphocytes B et autres cytokines immuno-modulatrices	126
4	Conclusion et perspectives	128
	BIBLIOGRAPHIE	131
	ANNEXES	152

Liste des figures :

<i>Figure 1 Ontogénèse des lymphocytes B.</i>	13
<i>Figure 2 Activation des LB dans le centre germinatif.</i>	18
<i>Figure 4 : Représentation schématique des voies impliquées dans l'induction de Breg.</i>	43
<i>Figure 5 : Modèle des voies de signalisation (TLR, BCR et CD40) impliquées dans l'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B.</i>	46
<i>Figure 6 : Les différentes voies d'immunorégulation par l'IL-10.</i>	50
<i>Figure 7 : Cytokines de la famille de l'IL-12 et leurs récepteurs.</i>	57
<i>Figure 8 : Voies de présentation des antigènes allogéniques.</i>	64
<i>Figure 9 : Mécanismes mis en jeu dans le rejet de greffe.</i>	66
<i>Figure 10 : Inhibition de la costimulation des LT par le belatacept.</i>	76
<i>Figure 11 : Expression d'EBI3 après stimulation de LB totaux.</i>	111
<i>Figure 12 : Les LB CD24^{hi} CD38^{hi} sont enrichis en LB EBI3⁺.</i>	112
<i>Figure 13 : Profil d'expression d'EBI3, p35 et p28 sur LB triés.</i>	114
<i>Figure 14 : Analyse ontologique des gènes dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi}.</i>	120
<i>Figure 15 : Schéma théorique de l'effet synergique de l'IL-35 sur la production d'IL-10 par les LB ...</i>	127

Liste des tableaux :

<i>Tableau 1 : Marqueurs des LB transitionnels humains.</i>	16
<i>Tableau 2 : Phénotype des lymphocytes B régulateurs murins.</i>	32
<i>Tableau 3 : Phénotype des lymphocytes B régulateurs humains.</i>	37

Liste des annexes :

<i>Article : Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naive and transitional B cell.</i>	153
--	-----

Liste des abréviations :

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

Ag : Antigène

AMP : Adénosine monophosphate

ARNm : Acide ribonucléique messagé

ATP : Adénosine triphosphate

BAFF-R : Receptor B-cell-Activating Factor

BCR : B cell receptor

Breg : Lymphocytes B régulateurs

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CIA : Arthrite induite par le collagène

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CSH : cellule souche hématopoïétique

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4

CVID : Common variable immunodeficiency

DM : Dermatomyositis

dnDSA : DSA *de novo*

DSA : Anticorps spécifique du donneur

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

Fas-L : Fas-ligand

Foxp3 : Forkhead box P3

GARP : Glycoprotein-A repetitions predominant protein

GC : Centre germinatif

GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte

HLA : Human leukocyte antigen

HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

ICOS-L : Inducible T cell co-stimulator ligand

IFN : Interferon

Ig : Immunoglobuline

IGIV : Immunoglobulines intraveineuses

IL : Interleukine

ILB : Innate-like-B cells
LB : Lymphocyte B
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LT α : Lymphotoxine alpha
MICA : Major histocompatibility class I related chain A
MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
NK : Natural killer
NKT : Lymphocytes T natural killer
NOD : Diabétique non obèse
OVA : Ovalbumine
PAMP : Pathogen associated molecular patterns
PD-L1 : Programmed death ligand 1
PIG : PMA, ionomycine et Golgi Plug
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR : Pattern recognition receptors
qPCR : PCR quantitative
RE : Reticulum endoplasmique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Scid : Severe combined immunodéficiciency
SLE : Lupus systémique érythémateux
STAT : Signal transducer and activator of transcription
STIM : Stromal interaction molecule
T2-MZP : Lymphocytes B transitionnels de type 2 issus de la zone marginale
TGF- β : Transforming growth factor beta
Th : Lymphocyte T helper
TLR : Toll like receptor
TLT : Tissu lymphoïde tertiaire
TNF : Tumor necrosis factor
Tr1 : Lymphocyte T régulateur de type1
Treg : Lymphocyte T régulateur
WT : Wild type (phénotype sauvage)

INTRODUCTION

Avant-propos:

Afin de se protéger contre d'éventuelles agressions par des pathogènes tels que virus, parasites, bactéries, cellules étrangères mais également empêcher la prolifération tumorale, l'organisme s'est pourvu d'un système immunitaire extrêmement complexe. Le système immunitaire répond à des signaux de « danger » induits par la capacité de certaines cellules à reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMP) tandis que d'autres cellules peuvent reconnaître spécifiquement des antigènes (Ag) ou molécules identifiées comme étrangères à notre organisme appelées le « non soi ». Cette réponse immunitaire ne s'applique pas aux molécules ou cellules identifiées comme appartenant à l'organisme appelé « antigènes du soi »

Ce système se compose en deux parties : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée correspondant à une réponse immédiate, non spécifique et non adaptative de l'antigène. Celle-ci fait intervenir les phagocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles) et cellules natural killer (NK). L'immunité adaptative est apparue bien plus récemment. Cette réponse est spécifique de l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T (LT) (réponse à médiation cellulaire) et les lymphocytes B (LB) (réponse à médiation humorale) portent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique appelé épitope. La réponse adaptative est limitée dans le temps sur une distinction très fine du non-soi.

1 Les lymphocytes B

1.1 Origine et développement des lymphocytes B

Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'immunoglobulines (Ig) de surface. Ces immunoglobulines, produites par la cellule elle-même, jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène et sont appelées B cell receptor (BCR). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui possèdent à la fois une capacité d'auto-renouvellement et de multipotence (capacité d'engagement dans différents lignages) sont à l'origine de toutes les cellules du sang et donc des lymphocytes B.

Le développement des LB s'effectue en deux phases principales, la première qui s'effectue dans la moëlle osseuse est indépendante d'antigène et la seconde s'effectuant au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, plaque de Peyer, rate, amygdale) et durant laquelle des Ig fonctionnelles sont élaborées et sélectionnées.

Le développement des LB dépend de plusieurs stimuli. Les LB dérivent de progéniteurs lymphoïdes précoces qui passent par le stade de progéniteurs lymphoïdes communs qui conduisent à la lignée des LB. Le développement de la lignée LB est dépendante des cellules stromales de la moëlle osseuse qui apportent un contact cellulaire spécifique ainsi que la sécrétion de cytokines comme l'IL-7 (interleukine 7) indispensable dans le développement de la lignée B. Dans la moëlle, les progéniteurs de LB passent par différentes étapes (Pro- B, pré-B, B immature, B transitionnel, B mature) durant lesquelles ils acquièrent leur spécificité antigénique par différents arrangements des chaînes lourdes et légères du BCR (initialement une IgM) déterminant leur stade de maturation. Les lymphocytes B dont le réarrangement des gènes des immunoglobulines (Ig) s'est effectué avec succès quittent la moëlle

osseuse pour passer dans la circulation périphérique pour devenir des LB transitionnels et vont acquérir une IgD en addition de l'IgM à la surface de la cellule (Figure 1). Cette étape de développement s'effectue en absence complète d'antigènes. Durant tout le processus de maturation, une grande partie des lymphocytes B portant un BCR autoréactif sont éliminés. Le BCR mature inclut des protéines membranaires additionnelles comme Ig α et Ig β jouant un rôle dans le signal d'activation après reconnaissance d'un antigène par le BCR. Chez la souris, la lignée des LB peut être divisée en 2 grandes catégories, les cellules B1 et B2.

Les cellules B1 qui prédominent durant la vie foétale et le développement néonatal sont auto-renouvelées à partir de cellules souches résidant principalement au niveau des cavités péritonéales et pleurales. Les cellules B2 sont quant à elles libérées au stade de cellules transitionnelles dans le sang et circulent à travers les organes lymphoïdes secondaires pour devenir des lymphocytes B matures naïfs. Bien que chez l'homme, l'existence des cellules B1 soit encore controversée, ces LB sont reconnus comme producteurs de la majorité des IgM naturelles et représentent la première ligne de défense contre les pathogènes.

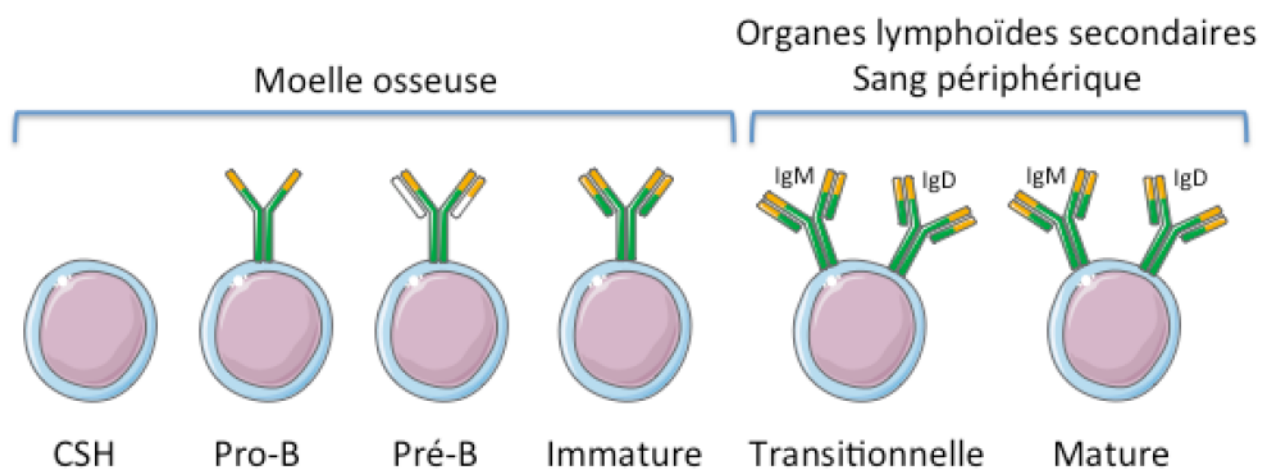


Figure 1 Ontogénèse des lymphocytes B.

1.1.1 Lymphocytes B transitionnels

Seulement une petite partie des LB quittent la moelle osseuse et vont maturer vers un phénotype de LB matures naïfs. L'interaction des auto-antigènes avec le BCR engendre l'inactivation et la déplétion des LB immatures avant qu'ils ne deviennent matures. Le signal du BCR sélectionne à travers une sélection positive ou négative les lymphocytes B tout au long de leur maturation. Ces lymphocytes venant de quitter la moelle osseuse sont appelés LB transitionnels (Carsetti, Köhler et al. 1995) mais leur développement n'est pas encore clair. Ces cellules immatures requièrent différents signaux pour leur maturation mais répondent cependant de la même façon que les LB matures à la stimulation du CD40 mais avec une sécrétion d'IL-10 plus importante.

Le marqueur de surface CD10 a été décrit comme un marqueur de LB immature mais il est également présent au niveau du centre germinatif (GC) (Palanichamy, Barnard et al. 2009). Il n'est pas clairement établi que le CD10 soit un marqueur de lymphocyte B transitionnel. D'autres études ont défini que les LB transitionnels auraient un phénotype $CD24^{hi}CD38^{hi}CD43^{+}CD10^{+}CD5^{+}IgM^{hi}IgD^{+}$ (Sims, Ettinger et al. 2005). Ces cellules représentent moins de 5% de LB totaux dans le sang périphérique chez l'homme et sont également présentes au niveau de la moelle osseuse à hauteur de 3% (Agrawal, Smith et al. 2013). L'expression des marqueurs CD24, CD38, CD10 et IgM diminue progressivement lors du développement vers un phénotype mature.

Ces lymphocytes B transitionnels peuvent être divisés en 2 sous populations selon l'expression du marqueur CD5. La population T1 exprime plus faiblement le CD5 que la population T2 et semble être la population la plus précoce (Lee, Kuchen et al. 2009). Les lymphocytes B T1 ne semblent pas proliférer et s'orientent vers la voie apoptotique après stimulation contrairement aux lymphocytes T2 (Chung, Silverman

et al. 2003). D'autres marqueurs sont également différentiellement exprimés entre les LB T1 et T2 (Tableau 1) comme le CD21 qui est plus faiblement exprimé dans la rate alors qu'il est fortement exprimé en périphérie (Suryani, Fulcher et al. 2010). Cette étude montre également que les LB CD21^{low} précèdent les LB CD21^{hi} dans le développement vers un phénotype mature suggérant que la population CD21^{low} représente le précurseur de la population CD21^{hi}. Néanmoins, la maturation des LB CD21^{low} vers CD21^{hi} ne semble pas corrélérer avec la diminution d'expression du CD5. D'autres études suggèrent également l'existence chez la souris d'une population de lymphocytes B transitionnels T3 ayant un phénotype quasi identique aux LB T2 mais qui diffère avec l'expression d'une IgM^{low} et semble anergique après stimulation du BCR (Teague, Pan et al. 2007, Liubchenko, Appleberry et al. 2012). Chez l'homme, l'existence de cette population T3 a été suggérée récemment avec un phénotype IgM^{low}, IgD^{low} CD10^{low} et présente un statut similaire aux cellules anergiques (Simon, Pers et al. 2015).

Ce processus de développement passant par différentes étapes est présumé existant chez l'homme. La définition de lymphocytes transitionnels basée sur ces différences d'expressions est très subjective chez l'homme et reste essentiellement basée en clinique humaine sur la forte expression des marqueurs CD24 et CD38.

La signalisation via le BAFF-R (Receptor B-cell-activating factor) qui fait partie de la famille des récepteurs de TNF est connue pour être importante dans la survie des cellules B immatures ainsi que pour la poursuite de leur développement vers un phénotype mature. Les souris déficientes en BAFF ou BAFF-R montrent un blocage de la différenciation des LB au stade T1 résultant en une diminution du nombre de cellules au stade T2 (Schiemann, Gommerman et al. 2001). De plus, l'injection

d'anticorps anti-BAFF-R réduit drastiquement le nombre de LB folliculaires et de la zone marginale (MZ) (Rauch, Tussiwand et al. 2009). Chez l'homme, l'expression de BAFF-R commence au stade immature avec une corrélation existante entre BAFF-R et l'expression d'IgM, ce qui suggère que le BCR est impliqué dans la régulation de BAFF-R (Tussiwand, Rauch et al. 2012). Collectivement, ces résultats indiquent que la voie BAFF/BAFF-R joue un rôle central dans la survie et le développement du compartiment B.

Marqueurs	Sous-population de LB		
	T1	T2	Mature naïf
CD5	+	++	-
CD10	++	+	+/-
CD20	++	+	+
CD21	+	++	++
CD23	+	++	++
CD24	+++	+++	+/-
CD38	+++	+++	+/-
IgM	+++	++	+
IgD	++	++	++

Tableau 1 : Marqueurs des LB transitionnels humains.

1.2 Maturation et développement des sous populations de lymphocytes B

Les lymphocytes B immatures ayant quitté la moëlle osseuse subissent de nombreux changements phénotypiques avant d'aboutir à des lymphocytes B matures. Chez la souris, il est connu que le lieu de maturation des LB se situe au niveau de la rate mais ce lieu reste à être éclairci chez l'homme (Sims, Ettinger et al. 2005). Les lymphocytes B matures naïfs s'individualisent principalement en deux types: les LB folliculaires et LB de la zone marginale.

1.2.1 Lymphocytes B folliculaires

La plupart des lymphocytes B matures circulants se regroupent sous forme de follicules (LB folliculaires) au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les follicules sont toujours adjacents à une zone cellulaire T ce qui permet aux cellules B activées et aux cellules T activées de migrer facilement l'une vers l'autre et d'interagir à l'interface de ces 2 zones. Les lymphocytes B folliculaires sont donc particulièrement bien situés pour participer à une réponse T dépendante d'un antigène.

Ces LB folliculaires peuvent également occuper une seconde niche au niveau de la moëlle osseuse où il peuvent répondre aux Ag indépendamment des LT (Cariappa, Mazo et al. 2005).

Au niveau des ganglions lymphatiques, la présentation de l'Ag associé au CMH fournit le premier signal d'activation. Le deuxième signal d'activation est apporté lorsque le LB rentre en contact avec un LT extra-folliculaire spécifique de cet Ag ce qui engendre l'activation du LB qui va migrer au niveau du GC qui se compose en deux zones (claire et sombre). Au niveau du GC, les LB subissent une rapide prolifération et forment ainsi la zone sombre du GC. Ces lymphocytes en forte division sont nommés centroblastes.

Au niveau de la zone sombre, les LB (centroblastes) subissent une hypermutation somatique de la chaîne lourde et légère du BCR modifiant l'affinité avec l'antigène. Ce processus favorise la survie et la prolifération clonale de ces cellules portant un BCR de haute affinité pour l'antigène. Ces LB vont ensuite subir une sélection en fonction de l'affinité du BCR pour l'Ag. Cette sélection s'effectue dans la zone claire où elles interagissent avec les cellules dendritiques folliculaires. Les lymphocytes B qui ont perdu l'affinité pour l'antigène sont éliminés par apoptose. Les cellules sélectionnées vont subir une commutation de classe et se différencier soit en cellules

sécrétrices d'anticorps soit en cellules mémoire (Figure 2). Une fraction de ces cellules deviendra des plasmocytes à longue durée de vie qui migreront dans la moëlle osseuse où ils occuperont une niche essentielle et persisteront parfois tout au long de la vie. Une petite fraction de ces cellules est capable de s'échapper du GC pour se retrouver dans la circulation périphérique.

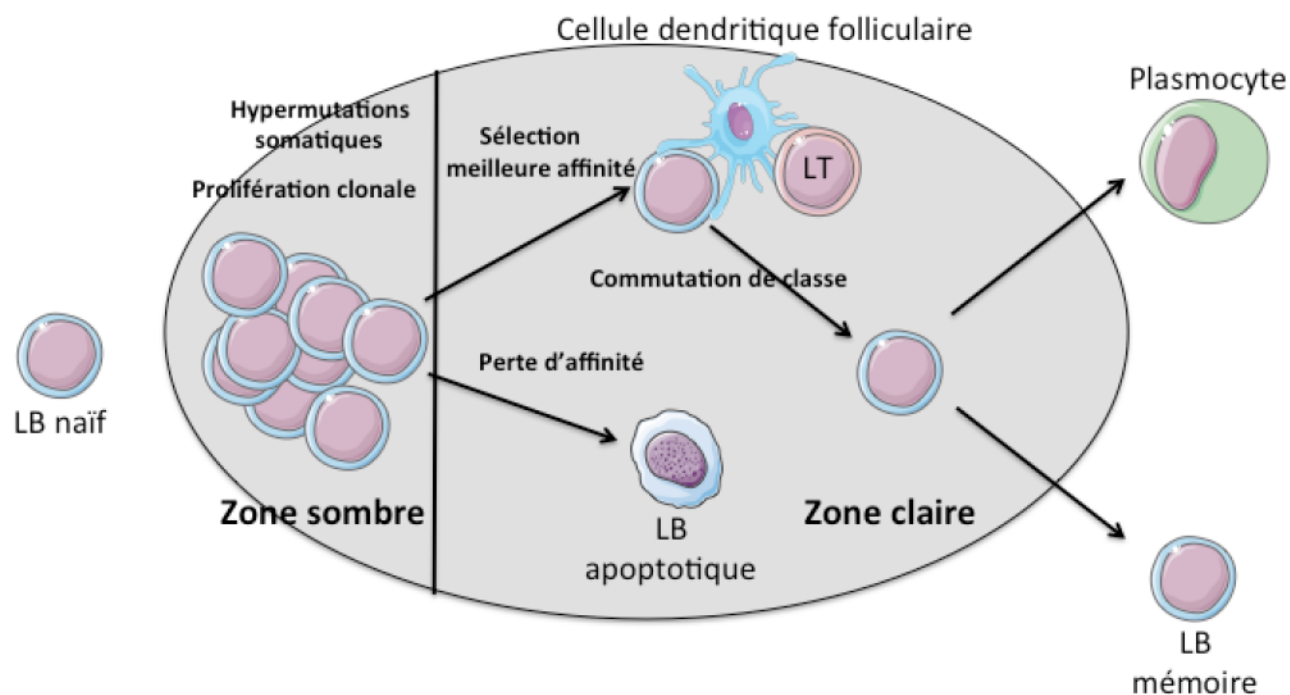


Figure 2 Activation des LB dans le centre germinatif.

1.2.2 Lymphocytes B de la zone marginale

La zone marginale démarque le périmètre entre la pulpe blanche et la pulpe rouge au niveau de la rate. Elle est fortement vascularisée et contient également des cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes B de la zone marginale sont majoritairement IgM^{hi} et expriment fortement les TLR (Toll Like Receptor) capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez de nombreux pathogènes (protéine, acide nucléique...). Ces LB sont stratégiquement placés pour répondre au pathogènes circulants. Ces cellules sont capables de se différencier rapidement en

plasmocytes extra-folliculaires à durée de vie courte en l'absence d'activation via le BCR et de façon indépendante des lymphocytes T. Ces cellules expriment fortement le CD1d qui est notamment impliqué dans la présentation d'antigènes lipidiques aux lymphocytes T natural killer (NKT).

1.2.3 Lymphocytes B périphériques

La plupart des lymphocytes B issus de la moëlle osseuse et des organes lymphoïdes secondaires sont susceptibles de se retrouver dans la circulation sanguine. Chez des individus sains, les lymphocytes B naïfs représentent 60 à 70% des LB circulants (Perez-Andres, Paiva et al. 2010). Ces cellules coexpriment les immunoglobulines IgM et IgD et sont majoritairement CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ CD38^{+/-}. On retrouve également des cellules B mémoires caractérisées majoritairement par l'expression du CD27, l'absence de CD38 et représentant environ 30% des lymphocytes B. Dans le sang, on retrouve également d'autres populations en plus faible proportion comme les plasmocytes et plasmablastes qui représentent environ 2% des LB. Ces cellules sont souvent caractérisées par l'expression du CD138 et sont capables de perdre l'expression du CD19 et du CD20. Une autre population minoritaire de LB immatures transitionnels exprimant fortement le CD24 et CD38 est également retrouvée à hauteur de 2 à 4% (Caraux, Klein et al. 2010).

Les lymphocytes B peuvent être subdivisés en 3 catégories basées sur l'expression du CD24 et du CD38: d'une part, les cellules transitionnelles CD24^{hi} CD38^{hi}, puis les cellules matures naïves CD24^{int} CD38^{int} et enfin les cellules CD24⁺ CD38⁻ exprimant majoritairement le CD27 (phénotype mémoire).

1.3 Rôle des lymphocytes B

1.3.1 Sécrétion d'anticorps

La génération d'anticorps est une part importante dans la réponse immunitaire adaptative. Elle est entre autre l'élément de base des stratégies vaccinales et fait partie de la réponse humorale.

La production d'anticorps dépend de l'activation des lymphocytes B. Ces anticorps sont produits par des lymphocytes B matures hautement différenciés appelés plasmocytes et plasmablastes. Les plasmablastes sont des cellules effectrices qui peuvent produire rapidement des anticorps en réponse à une activation précoce alors que les plasmocytes sont des médiateurs à durée de vie longue et participent à l'immunité humorale à long terme (Nutt, Hodgkin et al. 2015).

1.3.2 Présentation d'antigènes

Bien que les cellules dendritiques soient les cellules présentatrices d'antigène (CPA) les plus efficaces, les lymphocytes B sont également capables d'agir comme cellules présentatrices d'antigènes (Rivera, Chen et al. 2001). Dans la réponse immunitaire adaptative, la capacité des lymphocytes B à présenter un antigène est cruciale. L'antigène est présenté sous forme de peptide antigénique associé au CMH de classe II pour être présenté aux lymphocytes T CD4. Cette coopération entre lymphocytes B et lymphocytes T est nécessaire à la formation de centres germinatifs, à la différenciation en cellules productrices d'anticorps de haute affinité et au développement des lymphocytes B mémoires. Ce processus de présentation de peptide antigénique via le CMH de classe II est assez complexe. Il est associé à la liaison de corécepteurs comme le complexe CD40/CD40L et les molécules de la famille B7 (CD80/CD86) (Figure 3). Dans un premier temps, l'antigène est reconnu et capturé par les lymphocytes B portant un BCR de forte affinité pour cet antigène.

Dans un second temps, l'antigène est internalisé et subit dans un compartiment interne de la cellule, un processus de dégradation sous forme de fragment peptidique qui est ensuite pris en charge par des molécules du CMH de classe II. Dans un dernier temps, le peptide est présenté aux lymphocyte T CD4 via un complexe CMH II/peptide aboutissant alors à la formation d'une synapse immunologique indispensable à la pleine activation des lymphocytes B.

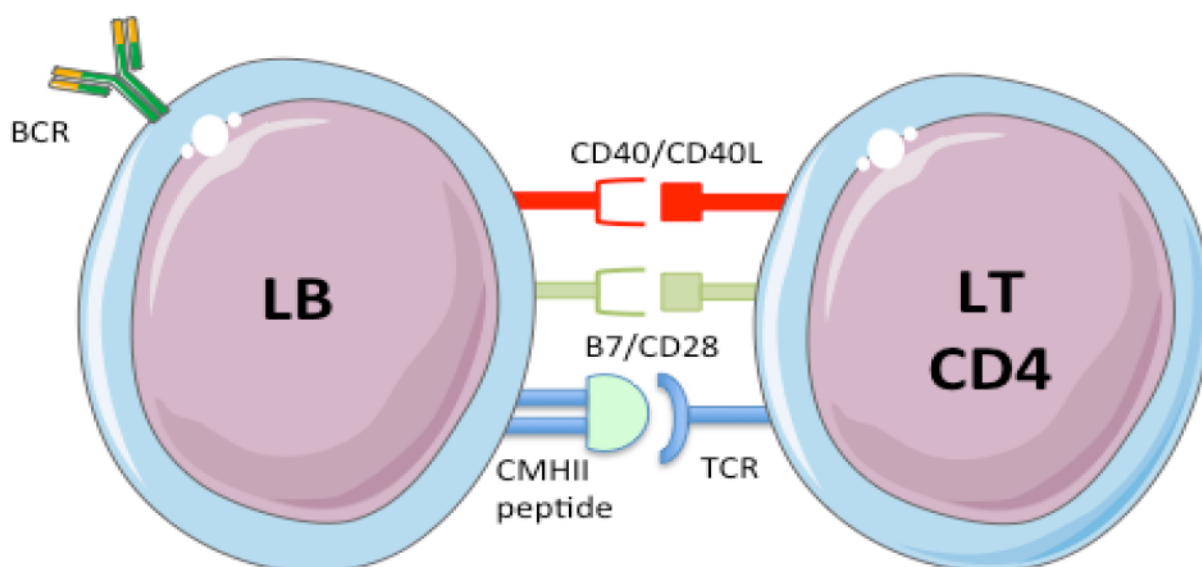


Figure 3 : Mécanisme de présentation de l'antigène par un lymphocyte B.

1.3.3 Sécrétion de cytokines

Il est maintenant admis que les lymphocytes B peuvent être impliqués à la fois dans l'amplification de la réponse immune et dans sa régulation par des mécanismes indépendants de la sécrétion d'anticorps. Cette réponse peut être orientée différemment selon les signaux reçus. Ces signaux sont majoritairement transmis sous forme de cytokines sécrétées par d'autres cellules de l'immunité ou bien produites par les lymphocytes B eux-mêmes.

Les lymphocytes B effecteurs peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, IL-4, TNF α (tumor necrosis factor alpha), IL-6, IFN γ (interferon

gamma), IL-12 et LT α (lymphotoxine alpha). Des études sur le rôle des LT α et du TNF α montrent que la sécrétion de ces cytokines est capable de contrôler le développement des cellules dendritiques folliculaires (Fu, Huang et al. 1998), la formation de follicules B (Gonzalez, Mackay et al. 1998) ainsi que le développement de cellules stromales (Ngo, Cornall et al. 2001) et de la zone marginale au niveau de la rate.

De plus, l'expression de LT α peut également jouer un rôle dans la formation de centres germinaux ectopiques au niveau d'organes cibles dans le cadre de maladies auto-immunes ou de greffes d'organes.

Les lymphocyte B1 sont capables d'orienter la réponse Th1 (T helper 1) par la sécrétion d'IFN γ et d'IL-12, alors que les cellules B2 orientent plutôt vers une réponse Th2 par la sécrétion d'IL-13, d'IL4 et d'IL-2 (Harris, Haynes et al. 2000).

Les lymphocytes B sont également capables de produire des cytokines participant à l'inhibition de la réponse immune comme le TGF- β (transforming growth factor beta) (Lee, Stott et al. 2014) l'IL-10 (Fillatreau, Sweenie et al. 2002) et une cytokine plus récemment découverte, l'IL-35 (Shen, Roch et al. 2014). Ces deux dernières ont notamment été corrélées à une diminution de la réponse autoréactive Th1 et Th17 dans un modèle murin Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE).

1.3.4 Formation de centres germinatifs ectopiques

Une autre fonction des lymphocytes B est leur rôle joué dans la formation de centres germinatifs ectopiques au niveau de tissus inflammatoires. Ces structures sont similaires aux centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et ont été décrites dans plusieurs maladies chroniques inflammatoires (Aloisi and Pujol-Borrell 2006). Le rôle de ces centre germinatifs ectopiques n'est pas encore bien clarifié,

cependant il est montré que certains plasmocytes résident dans ces centres ectopiques, secrètent des auto-anticorps qui pourraient avoir un rôle dans le maintien de l'inflammation (Manzo, Paoletti et al. 2005).

1.4 Les lymphocytes B régulateurs

Les lymphocytes B remplissent plusieurs fonctions immunologiques et étaient considérés jusqu'à peu comme des régulateurs positifs de la réponse immune notamment à travers leur fonction de sécrétion d'anticorps. Ils sont également connus pour leur rôle joué dans l'activation des lymphocytes T CD4 et le développement du tissu lymphoïde (LeBien and Tedder 2008). Depuis trois décennies, les chercheurs ont commencé à donner à ces cellules des fonctions supplémentaires comme leur capacité à présenter l'antigène, la production de cytokines et une capacité immunosuppressive. En effet il a été suggéré que les lymphocytes B sont capables de réguler négativement une réponse immune normale et interviennent également dans le contrôle de cette réponse afin d'éviter un échappement de la réponse immune et l'apparition de maladies auto-immunes. Il y a 40 ans, des chercheurs ont observé pour la première fois une augmentation de la gravité de l'hyper sensibilité de contact chez le cochon d'Inde après une déplétion des lymphocytes B (Katz, Parker et al. 1974). Bien que l'implication des anticorps n'ait pas été formellement exclue, il est rapporté que la baisse de l'hyper sensibilité de contact de la peau intervient avant que les anticorps circulants ne soient détectés (Neta and Salvin 1974). Ces études suggèrent donc que les LB sont capables d'inhiber l'activation des lymphocytes T CD4. Cependant ces études n'ont pas eu de fort impact puisque ce n'est que dans les années 90 que d'autres études mettent à nouveau en évidence un effet régulateur de la réponse immune par les lymphocytes

B. En 1996, Wolf et ses collaborateurs décrivent à nouveau dans un modèle murin que la déficience en LB n'a pas d'effet sur l'apparition de l'EAE mais que ces souris sont incapables de se remettre de la maladie comme classiquement observé (Wolf, Dittel et al. 1996). Une autre étude montre également dans un modèle murin de greffe de peau mâle sur receveur femelle, que le transfert adoptif de LB naïfs provenant du donneur induit une tolérance de la greffe (Fuchs and Matzinger 1992). Dans un autre modèle de greffe cardiaque, il est mis en évidence que les souris prétraitées avec des LB non activés accompagnés d'un anti-CD40L permettant de bloquer la voie du CD40 induit une prolongation de la survie du greffon (Niimi, Pearson et al. 1998).

Malgré ces observations, il est resté difficile de déterminer si cette fonction régulatrice était liée à toute ou à une partie de la population lymphocytaire B et à quels mécanismes étaient liées cette fonction. Ce n'est qu'en 2002 que le terme de lymphocyte B régulateur est utilisé pour la première fois (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002). Cette équipe montre dans un modèle murin d'inflammation chronique, la capacité d'un sous ensemble de lymphocytes B CD1⁺ à supprimer la production de cytokines inflammatoires au cours de la progression de la colite en sécrétant la cytokine anti-inflammatoire IL-10. La même année, c'est au tour d'une autre équipe de montrer le rôle des lymphocytes B sécrétant de l'IL-10 appelés B10 dans la rémission d'EAE dans un modèle murin de sclérose en plaque (Fillatreau, Sweenie et al. 2002).

Depuis, plusieurs études montrent l'implication de lymphocytes B sécréteurs d'IL-10 dans différents modèles d'infection, de maladies auto-immunes ou de cancer (Bouaziz, Yanaba et al. 2008, DiLillo, Matsushita et al. 2010). Cependant, malgré toutes ces études, la caractérisation phénotypique de ces cellules reste difficile à

évaluer. En réalité, le terme de lymphocytes B régulateurs (Breg) tel qu'il est utilisé dans la littérature est susceptible de désigner différentes populations de LB régulateurs exprimant l'IL-10.

Bien que certaines équipes aient identifié des populations avec une action régulatrice indépendante de l'IL-10, les cellules B régulatrices fonctionnelles sont majoritairement caractérisées par leur simple capacité à sécréter de l'IL-10.

Ces lymphocytes B ont aussi été décrits comme ayant des capacités régulatrices dans différents modèles animaux de maladie auto-immune, comme l'arthrite rhumatoïde (Mauri, Gray et al. 2003), le diabète auto-immun (Hussain and Delovitch 2007) et le lupus systémique érythémateux (SLE), mais aussi dans le cancer (Horikawa, Minard-Colin et al. 2011) ainsi que d'autres modèles d'infections causés par des bactéries (Horikawa, Weimer et al. 2013), virus (Siewe, Stapleton et al. 2013) ou parasites (Correale, Farez et al. 2008). D'après la diversité de ces études, il paraît évident que plusieurs mécanismes autres que la sécrétion d'IL-10 sont impliqués dans la régulation de la réponse par les lymphocytes B.

1.4.1 Phénotype des Breg

Beaucoup d'études montrent l'importance des cellules B sécrétrices d'IL-10 (B10) chez la souris, cependant l'existence de ces cellules chez l'homme reste mal connue. Bien qu'un consensus partiel au sujet de la fonction régulatrice des lymphocytes B soit établie par la communauté scientifique, celle-ci est encore loin d'être d'accord sur l'établissement d'un phénotype commun aux Breg. A ce jour, beaucoup d'études montrent une similitude des fonctions effectrices et de certains marqueurs phénotypiques des Breg. Cependant, nous ignorons si ces différences

observées sont la résultante de lignées distinctes ou si ce changement dépend de l'environnement immunologique dans lequel baignent ces cellules.

Chez la souris, plusieurs populations sécrétrices d'IL-10 présentant une capacité immunosuppressive ont été décrites. Ces populations incluent pour les modèles murins, les lymphocytes B transitionnels de type 2 issus de la zone marginale (T2-MZP) (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007) mais aussi des lymphocytes matures $CD5^+$ $CD1d^{hi}$ (Yanaba, Bouaziz et al. 2008) ou encore des plasmablastes $CD138^+$ $CD44^{hi}$ (Matsumoto, Baba et al. 2014). Chez l'homme, plusieurs phénotypes de lymphocytes B régulateurs sécréteurs d'IL-10 ont été identifiés comme les cellules matures $CD24^{hi}$ $CD27^+$ décrites en 2011 qui sont assimilées aux cellules B10 murines (Iwata, Matsushita et al. 2011), les cellules transitionnelles $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$ qui sont majoritairement décrites chez l'homme comme étant des Breg (Blair, Norena et al. 2010, Bosma, Abdel-Gadir et al. 2012, Flores-Borja, Bosma et al. 2013). Actuellement il est très difficile d'établir un lien entre ces différentes populations de lymphocyte B qui présentent toutes des capacités immunorégulatrices. Bien que la sécrétion d'IL-10 soit acceptée comme critère pour définir les lymphocytes B régulateurs, d'autres marqueurs phénotypiques comme cités précédemment sont également utilisés pour décrire ces cellules qu'elles soient à l'état naïves ou activées. Malgré ces efforts, aucune étude, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, ne parvient à uniformiser toutes ces données autour d'un phénotype B régulateur commun.

D'autres travaux suggèrent également un rôle immunosuppresseur indépendant de la sécrétion d'IL-10 comme la sécrétion d'IL-35 (Shen, Roch et al. 2014) ou la production de granzyme B (Lindner, Dahlke et al. 2013). Ces cellules peuvent aussi

jouer un rôle dans la régulation de la réponse immune et peuvent donc être également assimilées aux Breg.

◆ **Breg murin**

Lymphocytes B CD1d⁺

En 1997, les travaux de Mizoguchi sur la colite chronique avec des souris TCR α ^{-/-} suggèrent que les lymphocytes B pourraient réprimer la maladie. Ce n'est qu'en 2002 que la même équipe met évidence que les LB exprimant un fort niveau de CD1d dans un contexte d'inflammation chronique, expriment de l'IL-10 et suppriment la progression de l'inflammation intestinale. De plus, ils montrent que ces Breg CD1d^{hi} inhibent la progression de la maladie par la répression de la cascade inflammatoire associée avec l'IL-1 et l'activation de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002). Dans la rate, deux populations de LB ont été décrites avec une forte expression du CD1d.

Cellules B transitionnelles de la zone marginale

En 2007, des travaux décrivent pour la première fois dans un modèle murin d'arthrite expérimentale, des lymphocytes B T2-MZP ayant une fonction immunosuppressive. Ces cellules décrites avec un phénotype CD19⁺ CD21^{hi} CD23^{hi} CD24^{hi} IgM^{hi} IgD^{hi} CD1d^{hi} sont capables de sécréter de l'IL-10 après stimulation et semblent être en augmentation lors de phase de rémission de la maladie. De plus, le transfert adoptif de ces cellules T2-MZP protège ou contrôle la progression de l'arthrite (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007).

Les capacités immunosuppressives de ces cellules ont ensuite été mises en évidence dans plusieurs pathologies. En 2009, une équipe montre dans un modèle

de souris lupique que le transfert adoptif de LB T2-MZP stimulés *in vitro* avec un anticorps anti-CD40 améliore significativement la survie par un mécanisme dépendant de l'IL-10. Cependant, le transfert de ces cellules non stimulées issues de souris atteintes de lupus ne confère pas de protection à d'autres congénères malades. (Blair, Chavez-Rueda et al. 2009). Le rôle immunosuppresseur des cellules T2-MZP a également été mis en évidence dans un modèle murin d'inflammation induite des voies aériennes via l'intervention de lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ (Amu, Saunders et al. 2010). Dans un modèle murin de greffe de peau allogénique, ces cellules ont également été rapportées comme ayant une capacité à prolonger la survie du greffon par l'intermédiaire de la suppression de l'activation des lymphocytes T (Moreau, Blair et al. 2015).

D'autres population de Breg portant un phénotype partiel de lymphocytes B T2-MZP ont également été identifiées comme ayant une capacité régulatrice. A savoir les cellules productrices d'IL-10 CD19⁺ CD21^{hi} qui sont capables de réprimer l'immunité anti-tumorale dans un modèle de carcinome murin (Schioppa, Moore et al. 2011). La capacité régulatrice des descendants directs des cellules T2-MZP appelés lymphocytes B de la zone marginale (MZ) portant un phénotype CD19⁺ CD21⁺ a également été mise en évidence dans un modèle murin de leishmaniose. Il a été notamment montré que ces cellules sont capables de sécréter de l'IL-10 et peuvent inhiber la réponse spécifique des LT CD4 et CD8 (Bankoti, Gupta et al. 2012). Des lymphocytes B producteurs d'IL-10 via la stimulation par une protéine de fusion GM-CSF/IL-15 sont capables d'inhiber le développement d'EAE lors de transfert adoptif de ces cellules. Ces cellules portant un phénotype proche des T2-MZP (CD21⁺, CD23⁺, CD24⁺, CD1d⁺, IgD⁺, IgM⁺) sont appelés GIFT15-Breg (Rafei, Hsieh et al. 2009). Toutes ces études suggèrent que certains marqueurs de lymphocytes B T2-

MZP pourraient être régulés en fonction de l'environnement et du contexte immunologique dans lequel les cellules se trouvent.

Au niveau de la rate, d'autres cellules B de la zone marginale descendant directement des cellules T2-MZP et exprimant également le CD1d sont douées de capacités régulatrices via la production d'IL-10. Dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène, ces cellules sont notamment capables de protéger contre l'inflammation induite par des cellules apoptotiques (Gray, Miles et al. 2007).

Les cellules B10

Dans la rate, les cellules B de la zone marginale sont également capables d'exprimer le CD1d et de sécréter de l'IL-10. Cependant l'utilisation seule de ce marqueur reste insuffisante pour identifier les Breg, c'est pourquoi, la coexpression du CD1d et du CD5 a été utilisée pour identifier les lymphocytes B matures sécrétant de l'IL-10 appelés cellules B10 (Yanaba, Bouaziz et al. 2008). Ces cellules CD19⁺ CD1d^{hi} CD5⁺ sont capables de supprimer une réponse inflammatoire notamment dans un modèle murin d'EAE où le transfert adoptif de cellules B10 permet d'améliorer le pronostic quand celles-ci sont transférées dans les premiers stades d'apparition de la maladie (Matsushita, Yanaba et al. 2008). Le potentiel régulateur des cellules B10 est également mis en évidence dans d'autres modèles comme des modèles d'arthrite induite par le collagène (Yang, Deng et al. 2012), de lupus (Watanabe, Ishiura et al. 2010) mais également d'inflammation intestinale (Yanaba, Yoshizaki et al. 2011). La capacité régulatrice des cellules B10 et la sécrétion d'IL-10 passe cependant nécessairement par une stimulation des TLR via le lipopolysaccharide (LPS) qui est une endotoxine de la membrane externe de bactéries GRAM (Yanaba, Bouaziz et al. 2009). Comme pour les autres Breg, la fonction suppressive des

cellules B10 nécessite une interaction étroite avec des lymphocytes T CD4 activés et la présence de médiateurs solubles comme l'IL-21 (Yoshizaki and Tedder 2015). Chez l'homme la présence de cellules similaires avec un phénotype CD5⁺ CD1d^{hi} ayant des capacités régulatrices n'a pas été mise en évidence. Cependant elles sont comparées à d'autres lymphocytes B de type mémoire (CD24^{hi} CD27⁺) ayant des propriétés assez similaires. D'autres cellules B identifiées uniquement par le phénotype CD5⁺ appelées cellules B1 ont également été décrites avec des capacités à sécréter de l'IL-10 (O'Garra and Howard 1992). Une autre étude chez la souris montre également que les LB exprimant le CD5 et le Fas-ligand (Fas-L) sont capables d'induire l'apoptose des LT. Dans un modèle d'arthrite, la réduction du nombre de ces cellules est corrélée avec une augmentation de la sévérité de la maladie et une baisse de la mortalité des LT (Lundy and Fox 2009).

Plasmablastes CD138⁺

Plus récemment, la capacité des plasmablastes murins CD138⁺ à sécréter de l'IL-10 fait son apparition. Une étude montre que ce stade tardif de différenciation des lymphocytes B CD138⁺ présents notamment dans le système lymphatique est indispensable pour contrôler le développement d'inflammation auto-immune. Ces capacités régulatrices passent par l'inhibition de la fonction des cellules dendritiques limitant ainsi l'activation et la génération de lymphocytes T (Matsumoto, Baba et al. 2014). Cette étude démontre que des souris déficientes pour les gènes nécessaires à la différenciation en cellules B plasmablastiques (Prdm1 et IRF4) développent une EAE beaucoup plus sévère que des souris contrôles. La présence de ces cellules plasmablastiques avec une capacité de sécrétion d'anticorps fait émerger le concept

que la capacité régulatrice de certains lymphocytes B pourrait également passer par la sécrétion d'immunoglobulines, cependant cette question reste à éclaircir.

Les autres Breg murins

Chez la souris, l'apparition de nouveaux phénotypes de Breg plus marginaux continue de voir le jour (Tableau 3). Le marqueur TIM-1 a été mentionné comme étant majoritairement associé aux LB sécréteurs d'IL-10 inclus dans les populations décrites ci-dessus comme les B10 ou plasmablastes (Ding, Yeung et al. 2011, Shalpour, Font-Burgada et al. 2015). Une étude montre dans un modèle de souris TIM1^{-/-}, un développement spontané d'inflammation tissulaire avec l'âge qui serait dû à l'incapacité des LB à sécréter de l'IL-10 (Xiao, Brooks et al. 2015). La présence du marqueur « Programmed Death Ligand 1 » (PD-L1) a également été associée à une capacité régulatrice des lymphocytes B indépendamment de la sécrétion d'IL-10. En effet, le transfert adoptif de LB PD-L1^{hi} jouerait un rôle dans la régulation de la réponse humorale (Khan, Hams et al. 2015). D'autres travaux ont également montré dans un modèle murin de diabète de type 1, que le transfert adoptif de progéniteurs B immatures c-kit^{low} Sca-1^{low} B220⁺ activés via le TLR9 protège contre la maladie. Dans cette étude, il est notamment décrit que ces progéniteurs répondent à l'IFN γ par l'augmentation de l'expression de Fas-L capable d'induire l'apoptose des LT effecteurs (Montandon, Korniotis et al. 2013). Plus récemment, il a été mis en évidence que ces progéniteurs B étaient capables de réduire l'incidence de l'EAE chez la souris et notamment de diminuer localement l'inflammation à travers la production d'IL-10 (Korniotis, Gras et al. 2016).

D'autres molécules ont été associées aux lymphocytes B murins potentiellement immunosuppresseurs. Le CD39 et le CD73 sont des enzymes permettant la

dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate (AMP) qui est connu pour ses capacités immunosuppressives (Deaglio, Dwyer et al. 2007). Bien que l'expression du CD39 soit commune à beaucoup de lymphocytes B, le transfert adoptif de cellules CD73⁺ chez des souris déficientes en CD73 réduit l'inflammation du colon (Kaku, Cheng et al. 2014).

Toutes ces études décrivent divers phénotypes de Breg avec différents mécanismes d'action qui montrent la complexité de la caractérisation de ces cellules et des mécanismes impliqués dans leur fonction suppressive.

Sous type de LB murin	Phénotype	Mécanisme d'immunosuppression
T2-MZP	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{hi} CD1d ^{hi}	IL-10
MZ	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁻ CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgDI ^{ow} CD1d ^{hi}	IL-10
B10	CD5 ⁺ CD1d ^{hi}	IL-10
Plasmablaste/plasmocyte	CD138 ⁺	IL-10
LB	TIM1 ⁺	IL-10
LB	PD-L1 ^{hi}	PD-L1
Progéniteur B	c-kit ^{low} Sca-1 ^{low} B220 ⁺	Fas-L
LB	CD73 ⁺	Adénosine

Tableau 2 : Phénotype des lymphocytes B régulateurs murins.

◆ **Breg humains**

Chez l'homme, les études mettant en évidence une capacité immunosuppressive des lymphocytes B sont moins nombreuses. Parmi les différentes études menées jusqu'à maintenant, deux phénotypes de lymphocytes B régulateurs se dégagent plus particulièrement.

Lymphocytes B transitionnels dans la régulation de la réponse immune

Les lymphocytes B transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} sont les premières cellules qui réapparaissent dans le sang périphérique après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Marie-Cardine, Divay et al. 2008) et leur fréquence est augmentée dans le sang de cordon. Cette population a été décrite pour la première fois chez l'homme comme étant une source importante de cellules sécrétrices d'IL-10 (Blair, Norena et al. 2010). Dans cette étude, il a été montré que ces cellules possèdent également une capacité régulatrice après avoir été stimulées via le CD40. En effet, les lymphocytes B CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} ont la capacité *in vitro* de supprimer partiellement la différenciation des lymphocytes Th1 de façon dépendante de la sécrétion d'IL-10 et non par la sécrétion de TGF- β . Les auteurs montrent également que cette action suppressive est inhibée par le blocage du CD80 et CD86. Ces travaux révèlent également que ces mêmes lymphocytes isolés à partir de patients atteints de lupus systémique érythémateux et stimulés via CD40 secrètent moins d'IL-10 *in vitro* que des lymphocytes B contrôles de donneurs sains. De plus, en 2014, des travaux révèlent que les lymphocytes B présentant une capacité immunorégulatrice sont enrichis en lymphocytes CD19⁺ IgM⁺ CD27⁺ et CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} (Khoder, Sarvaria et al. 2014). Les auteurs mettent également en évidence que ces populations sont toutes les deux capables d'inhiber la sécrétion *in vitro* d'IFN γ par des lymphocytes T CD4 autologues. Cette étude met en évidence pour la première fois la capacité de ces Breg à inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4 autologues, celle-ci passant notamment par la sécrétion d'IL-10 et le contact cellulaire. D'un point de vue clinique, ces travaux montrent que les LB issus de patients transplantés atteints de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) chronique sont en plus faible proportion et présentent une capacité réduite à sécréter

de l'IL-10 et supportent donc le fait que ces Breg pourraient être impliqués dans la pathogénicité de la GVHD chronique. Dans le cadre de la transplantation rénale, Shabir et son équipe montrent que la fréquence des lymphocytes B transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} est en lien avec la protection contre le rejet aigu (Shabir, Girdlestone et al. 2015). Dans notre laboratoire, nous avons également étudié et comparé une cohorte de patients greffés rénaux traités avec du Belatacept (inhibiteur de costimulation LB/LT) avec une cohorte de patients traités avec de la cyclosporine (CNI). Les résultats mettent en évidence que les patients traités par un immunosuppresseur nouvelle génération (Belatacept) développent significativement moins d'anticorps anti-HLA (human leukocyte antigen) du donneur que des patients traités sous immunosuppresseur classiquement utilisé (cyclosporine) et présentent un plus fort pourcentage de LB transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} (Leibler, Matignon et al. 2014). Ces données suggèrent donc une implication de ces cellules dans le développement de la tolérance au greffon.

D'autres travaux chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde avec une maladie active, décrivent une diminution de lymphocytes B CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} présents dans le sang périphérique par rapport à des patients présentant une maladie inactive ou à des donneurs sains. Ces résultats suggèrent que chez ces patients, les cellules CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} seraient capables de prévenir le développement de réponse autoréactive et inflammatoire liée aux maladies auto-immunes. De plus, la coculture de lymphocytes B CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} issus de donneurs sains avec des LT naifs, induit une plus forte conversion des CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ (Forkhead box P3) en LT régulateurs (Treg) CD4⁺ Foxp3⁺ comparativement à une coculture de LB CD19⁺ CD24^{int} CD38^{int} (Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

D'autres patients atteints de maladies auto-immunes avec des anticorps anti-neutrophiles (ANCA) présentent également une diminution de lymphocytes B régulateurs CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} par rapport à des patients en rémission ou bien à des individus sains (Aybar, McGregor et al. 2015). De même, chez des patients atteints de CVID (common variable immunodeficiency), la diminution du nombre de cellules CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} semble être en relation avec l'incapacité de ces patients à réguler la production d'IFN γ et de TNF α par les lymphocytes T CD4⁺ (Vlkova, Ticha et al. 2015). D'autre part, chez des patients atteints de colite hémorragique qui est une maladie auto-immune caractérisée par une réponse Th2 exacerbée, il a été observé une réduction significative de la fréquence de cellules CD24^{hi} CD38^{hi} au niveau du sang périphérique et au niveau du tissu intestinal par rapport aux patients contrôles. Cette baisse semble également accompagnée d'une diminution du niveau d'IL-10 dans le sérum de ces patients (Wang, Zhu et al. 2016). De la même manière, une diminution de la proportion de cellules CD24^{hi} CD38^{hi} par rapport à des donneurs sains a été rapportée chez des patients atteints de dermatomyositis (DM), une maladie auto-immune caractérisée par l'inflammation des muscles et de la peau. Dans cette étude, les patients atteints de la maladie présentent une augmentation de LB CD19⁺ (38,42% vs 17,58%) mais avec une plus faible proportion de ces cellules exprimant l'IL-10 (Li, Tian et al. 2016).

Les cellules régulatrices CD24^{hi} CD38^{hi} semblent également jouer un rôle dans l'évolution du cancer gastrique. En effet, une équipe démontre que l'augmentation de ces cellules joue un rôle immunosuppresseur dans le cancer gastrique par l'inhibition de la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T ainsi que par la conversion des LT en Treg CD4⁺ Foxp3⁺ (Wang, Yuan et al. 2015). Aujourd'hui de plus en plus d'études mettent en évidence le rôle de ces cellules dans différentes pathologies

comme la spondylarthrite ankylosante (Chen, Zhang et al. 2015) ou dans la régénération de la moëlle lors de fractures (Yang, Ding et al. 2015). Il est également suggéré que la diminution de la fonction de ces cellules sécrétrices d'IL-10 au cours de l'âge favoriserait l'apparition de maladies auto-immunes (van der Geest, Lorencetti et al. 2015).

Les lymphocytes CD24^{hi} CD27⁺ (B10 humain)

Des lymphocytes B humains du sang périphérique avec un phénotype CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ appelés « human B10 » ont été décrits comme étant homologues aux cellules B10 murines. Bien que ces cellules portent un phénotype mémoire (CD27), elles sont capables de sécréter de l'IL-10 *in vitro* via activation des TLR et après une courte stimulation avec du phorbol 12-myristate 13-Acetate (PMA), ionomycine. De plus, ces cellules sont également capables de sécréter de l'IL-10 *in vitro* en réponse à une stimulation via le CD40 additionné de CpG (TLR9 ligand) ou LPS. En coculture avec des lymphocytes T CD4 ou des monocytes activés, ces cellules B10 sont capables de réduire la production de TNF α par ces dernières. Cette capacité régulatrice peut être inhibée après l'ajout d'un anticorps anti-IL-10 (Iwata, Matsushita et al. 2011). Sur le plan clinique, cette étude a également mis en évidence une augmentation de lymphocytes B CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, de lupus systémique érythémateux et du syndrome de Sjögren. D'autre part, il est montré que la fréquence de ces cellules CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺ est diminuée dans la maladie auto-immune de Basedow comparativement à des donneurs sains (Zha, Wang et al. 2012) et il est mis en évidence dans une expérience de coculture, une inhibition de la production d'IFN γ par les LT CD4⁺ de façon IL-10 dépendante.

Les autres Breg humains

Dans la littérature, d'autres populations de LB aux capacités régulatrices ont été évoquées (Tableau 2), comme les lymphocytes B CD19⁺ CD25^{hi} CD71^{hi} appelés « B regulatory 1 » (Br1) capables également de produire de l'IL-10 ainsi que des IgG4 (van de Veen, Stanic et al. 2013). Ces cellules auraient une importance notamment dans la tolérance aux allergènes.

En 2013, une étude met en avant une sous population de lymphocytes B infiltrés dans une tumeur solide présentant un phénotype CD19⁺ CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ et CD147⁺. Ces cellules seraient induites par l'IL-21 et capables de limiter la prolifération des LT par la sécrétion de granzyme B dégradant la chaîne zeta du TCR (Lindner, Dahlke et al. 2013).

Récemment, il a également été suggéré que des cellules B circulantes CD39⁺ et CD73⁺ sont capables d'induire un milieu anti-inflammatoire par la production d'adénosine à partir de la dégradation d'ATP en AMP par les ectonucleotidase CD39 et CD73. De plus, des expériences *in vitro* montrent que ces cellules B activées par CD40L (CD40 ligand) et IL-4 sont capables de restreindre la prolifération des LT par la production d'adénosine 5'-monophosphate (5'-AMP) (Saze, Schuler et al. 2013). Cependant ces travaux requièrent encore d'autres investigations.

Sous type de LB humain	Phénotype	Mécanismes d'immunosuppression
Transitionnel	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	IL-10
B10	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	IL-10
GrB	Granzyme B ⁺ , CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	GrB
Br1	CD19 ⁺ CD25 ^{hi} CD71 ^{hi}	IL-10, IgG4
LB	CD39 ⁺ CD73 ⁺	Adénosine

Tableau 3 : Phénotype des lymphocytes B régulateurs humains.

Les lymphocytes B régulateurs décrits au cours de ces différentes études ne semblent pas provenir d'un même sous-type de LB mais pourrait plutôt représenter des LB ayant acquis des capacités régulatrices distinctes en fonction des signaux environnementaux reçus. Par ailleurs, bien que les études basées sur le développement et la fonction de ces lymphocytes B soient difficiles, des publications caractérisant de nouvelles populations régulatrices de LB chez l'homme et la souris continuent de voir le jour régulièrement.

1.4.2 Mécanismes impliqués dans l'induction de Breg

◆ Toll-Like Receptors (TLR)

Les TLR sont des PRR (pattern recognition receptors) qui sont capables de se lier à de nombreux motifs moléculaires issus de bactéries, virus ou parasites et pouvant activer différentes cellules immunitaires ou non immunitaires (Takeuchi and Akira 2010). Bien que les TLR soient cruciaux pour la défense de l'organisme, l'activation cellulaire via les TLR conduit au développement de l'inflammation et de la réponse immune (Marshak-Rothstein 2006). L'activation de ces TLR peut à la fois initier un effet pathogénique ou un effet protecteur ce qui indique l'importance du contexte d'activation et de la balance du signal dans la nature de la réponse. Les lymphocytes B murins et humains expriment une variété de TLR (Barr, Brown et al. 2007). La stimulation individuelle de ces TLR induit une production de cytokines différentes.

En 2001, il est mis en évidence que le transfert adoptif de LB stimulés par le LPS (TLR4 ligand) dans un modèle de souris NOD (diabétique non obèse) développant un diabète auto-immun, conduit à supprimer la réponse Th1 prévenant ainsi l'apparition de la maladie (Tian, Zekzer et al. 2001). Chez la souris, la stimulation par le LPS des LB, induit la différenciation de LB producteurs d'IL-10 appelés B10. Le

transfert adoptif de ces cellules dans un modèle induit d'hypersensibilité de contact permet d'atténuer l'inflammation (Yanaba, Bouaziz et al. 2008). De la même manière, les souris chimériques déficientes en TLR2 et TLR4 présentent des Breg incapables de produire de l'IL-10 et donc de supprimer l'activation des LT (Lampropoulou, Hoehlig et al. 2008). D'autres études montrent également une induction importante de la sécrétion d'IL-10 avec une stimulation par CpG (TLR9 ligand). Le TLR9 est exprimé par les lymphocytes B mais aussi par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, néanmoins ces dernières répondent très différemment au même stimuli (Barr, Brown et al. 2007).

Chez l'homme, la stimulation *in vitro* de LB périphériques à la fois via le CD40 et via les TLR engendre une sécrétion d'IL-10. Cette sécrétion d'IL-10 semble cependant être plus conséquente avec une stimulation avec LPS ou CpG ce qui montre l'importance du rôle joué par les TLR4 et TLR9 dans la production d'IL-10 par les LB (Iwata, Matsushita et al. 2011). Il est montré que les lymphocytes B transitionnels expriment plus fortement le TLR9 que les lymphocytes B matures (Capolunghi, Cascioli et al. 2008) et que la diminution d'expression du TLR9 chez l'homme semble prédisposer au développement de lupus (Tao, Fujii et al. 2007). De même, des lymphocytes B régulateurs CD24^{hi} CD38^{hi} issus de donneurs sains secrètent une plus grande quantité d'IL-10 que ces mêmes cellules provenant de patients lupiques (Blair, Norena et al. 2010). Il est également mis en évidence que les LB humains activés via le TLR9 sont capables d'inhiber la production d'IFN γ des LT via la sécrétion d'IL-10 (Tretter, Venigalla et al. 2008).

Ces études supportent le fait de la nécessité d'une stimulation via les TLR, en particulier via le TLR9 et TLR4 pour obtenir l'induction de LB ayant une fonction immunorégulatrice. Cependant la transposition des résultats entre les modèles

murins et l'homme est difficilement réalisable du fait des différences d'expression des TLR entre les deux espèces.

◆ **CD40**

CD40 est une molécule essentielle dans la costimulation entre LB et LT.

In vivo, la stimulation du CD40 par le CD40L exprimé sur les LT, induit la maturation des LB en cellules productrices d'anticorps et peut avoir l'effet inverse avec une stimulation forte et prolongée du CD40 (Banchereau, Bazan et al. 1994). Cela montre la difficulté de discerner avec exactitude son rôle dans la fonction suppressive des LB.

L'engagement de cette molécule est associé à l'induction d'une fonction régulatrice des Breg dans la quasi totalité des modèles proposés. Par exemple, la stimulation par un agoniste du CD40 dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène (CIA) induit la génération de lymphocytes B régulateurs prévenant le développement de la maladie par l'inhibition de la réponse lymphocytaire Th1 notamment via la sécrétion d'IL-10 (Mauri, Gray et al. 2003). Egalement, la stimulation *in vitro* de LB transitionnels murins via le CD40 permet d'induire la production d'IL-10 (Blair, Chavez-Rueda et al. 2009). Dans un modèle d'EAE murin, il a été démontré que la stimulation de LB par le CD40 engendrait la production d'IL-10 alors que la stimulation de LB issus d'un modèle déficient en CD40 en était incapable, n'induisant pas de rémission de la maladies (Fillatreau, Sweenie et al. 2002).

Chez l'homme, la coculture de LB CD24^{hi} CD38^{hi} de donneurs sains avec des LT effecteurs CD4⁺ CD25⁻ inhibe la production d'IFN γ et de TNF α . Le blocage du CD40 dans ce modèle inhibe la production d'IL-10 par les LB, ce qui a pour effet de ne plus affecter la production de TNF α et d'IFN γ par les LT effecteurs (Blair, Norena et al.

2010, Lemoine, Morva et al. 2011). Collectivement, ces résultats montrent que l'activation des LB via le CD40 est un élément majeur pour la génération de Breg producteurs d'IL-10.

◆ **B-cell receptor (BCR)**

Le BCR est à la base de la spécificité antigénique des LB, c'est une molécule sous la forme d'une immunoglobuline liée à la membrane cellulaire et associée à 2 fragments transducteurs de signaux Ig α et Ig β (CD79). Des observations montrent que la perte du CD19, qui est un co-récepteur optimisant le signal via le BCR, engendre une augmentation de la sévérité de l'EAE chez la souris, ce qui suggère l'importance du BCR dans la régulation de la réponse immune. De même l'induction de cellules B10 exprimant l'IL-10 est complètement réprimée chez les souris CD19 $^{-/}$ (Yanaba, Bouaziz et al. 2009). Une reconnaissance de l'Ag par le BCR apparaît importante dans la production d'IL-10 par les LB. En effet, des souris transgéniques avec BCR, IgM et IgD spécifiques uniquement du lysozyme d'œufs de poule présentent une plus faible proportion de LB sécréteurs d'IL-10 après stimulation par rapport à des souris avec un phénotype sauvage (WT) (Yanaba, Bouaziz et al. 2009).

Cette étude montre également que la stimulation *in vitro* du BCR avec un anti-IgM induit la production d'IL-10 par les LB murins mais en plus faible quantité par rapport à une stimulation des TLR ou du CD40 ce qui évoque un effet synergique et complémentaire de ces différents signaux pour l'induction de lymphocytes B régulateurs IL-10 $^{+}$.

◆ **CD80/CD86**

CD80 et CD86 sont des molécules qui appartiennent à la famille B7. Elles sont exprimées principalement par les CPA dont peuvent faire partie certains LB et jouent un rôle important dans l'établissement de la synapse immunologique et l'activation de la réponse immune. Le transfert adoptif de LB déficients en CD80/CD86 n'est pas capable d'entraîner une rémission dans un modèle d'EAE contrairement au transfert adoptif de LB issus de souris WT, ce qui suggère que ces molécules de co-stimulation sont nécessaire dans l'établissement d'une tolérance (Mann, Maresz et al. 2007).

Chez l'homme les Breg CD24^{hi} CD38^{hi} sont capables d'inhiber la sécrétion d'IFN γ et de TNF α par les LT. Le blocage de CD80 ou CD86 donc de la costimulation, diminue partiellement l'effet immunorégulateur des Breg. Cet effet immunorégulateur est complètement aboli si l'on bloque également l'IL-10 ce qui met en évidence l'importance d'un contact cellulaire en complément de la sécrétion d'IL-10 entre les Breg et les cellules effectrices pour permettre une fonction immunorégulatrice des Breg CD24^{hi} CD38^{hi} (Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

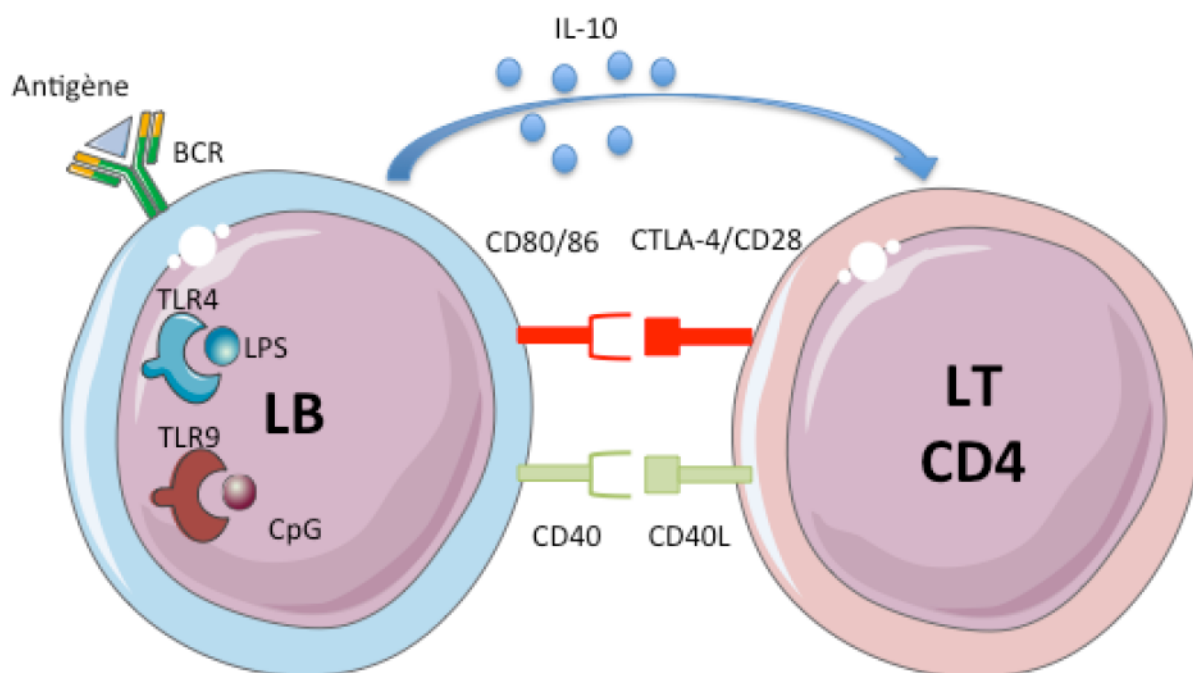


Figure 4 : Représentation schématique des voies impliquées dans l'induction de Breg.

D'autres molécules ont été également mentionnées pour leurs rôles dans la génération ou la prolifération de Breg, en particulier pour les cellules B10 murines comme l'IL-21 ou la molécule BAFF (B-cell-activating factor) (Yoshizaki and Tedder 2015). Cependant, aucun modèle d'induction de Breg ne semble se démarquer dans toutes ces études. La multiplicité des méthodes de stimulation (Figure 4) utilisées pourrait être à l'origine des importantes différences observées. L'induction de Breg semble possible par l'intermédiaire de différentes voies, cependant il semble se dégager que l'utilisation d'au moins deux voies d'activation soit nécessaire pour induire une production conséquente d'IL-10 par les lymphocytes B.

1.4.3 Voies métaboliques impliquées dans l'induction des Breg

A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux voies métaboliques impliquées lors de l'engagement des LB vers une fonction régulatrice comme la sécrétion d'IL-10.

Bien qu'un phénotype commun des LB producteurs d'IL-10 soit difficile à établir, de nombreuses molécules incluant des marqueurs de surface, cytokines et autres molécules comme celles décrites ci-dessus sont impliquées dans le rôle inhibiteur des LB en particulier via la sécrétion d'IL-10. Un consensus semble maintenant établi sur le rôle joué par les TLR, CD40 et BCR activés ou une combinaison d'entre eux dans les voies de signalisation conférant une activité immunosuppressive aux LB.

Dans les lymphocytes B aussi bien humains que murins, le CD40 semble avoir un rôle primordial dans la production d'IL-10. Il est montré que la fixation de CD40L sur CD40 entraîne l'activation de STAT3, NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et ERK, ce dernier étant impliqué dans la production d'IL-10 par les cellules dendritiques myéloïdes et macrophages (Kaiser, Cook et al. 2009).

De plus, il semble que la voie de signalisation STAT3 soit altérée après engagement du CD40 chez les LB CD24^{hi} CD38^{hi} de patients atteints de SLE (Blair, Norena et al. 2010) ce qui pourrait supposer un défaut de production d'IL-10 favorisant la maladie chez ces patients.

Le rôle joué par le BCR dans l'induction des Breg est également de plus en plus évident. En effet, la stimulation du BCR entraîne une augmentation de Ca²⁺ dans le cytoplasme dû au relargage de celui-ci par le réticulum endoplasmique (RE). La diminution du Ca²⁺ dans la lumière du RE déclenche à son tour l'activation de STIM (stromal interaction molecule) et l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire par les canaux calciques. Ce processus appelé SOCE (store operated Ca²⁺ entry) entièrement dépendant de STIM a été identifié comme un signal clé pour la production d'IL-10 chez les Breg (Matsumoto, Fujii et al. 2011). Ce processus entraîne notamment la

déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) qui va pouvoir entrer dans le noyau et induire la synthèse d'IL-10 (Figure 5).

Chez la souris, l'activation du TLR9 par son ligand entraîne une cascade de signalisation dépendante de la protéine MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) donnant lieu à la sécrétion d'IL-10 par les macrophages et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Boonstra, Rajsbaum et al. 2006). En ce qui concerne les LB, il est montré dans un modèle de souris où les LB sont spécifiquement déficients pour MyD88, une incapacité de celles-ci à se remettre d'EAE (Lampropoulou, Hoehlig et al. 2008). Il apparaît également une relation entre l'expression de MyD88 et la production d'IL-10 par les LB. En effet, les LB issus de souris déficientes en MyD88 produisent moins d'IL-10 après stimulation que les LB issus de souris contrôles (Yanaba, Bouaziz et al. 2009).

Collectivement, ces résultats montrent la complexité des voies de signalisation impliquées dans la sécrétion d'IL-10 par les LB. Il reste encore bien difficile de déterminer quelle est la méthode d'activation optimale favorisant la production d'IL-10, sachant que celle-ci semble différente selon le type cellulaire ciblé, l'espèce ou les conditions expérimentales. Bien que les travaux sur la question continuent d'affluer, il reste encore de nombreux points à éclaircir en particulier chez l'homme.

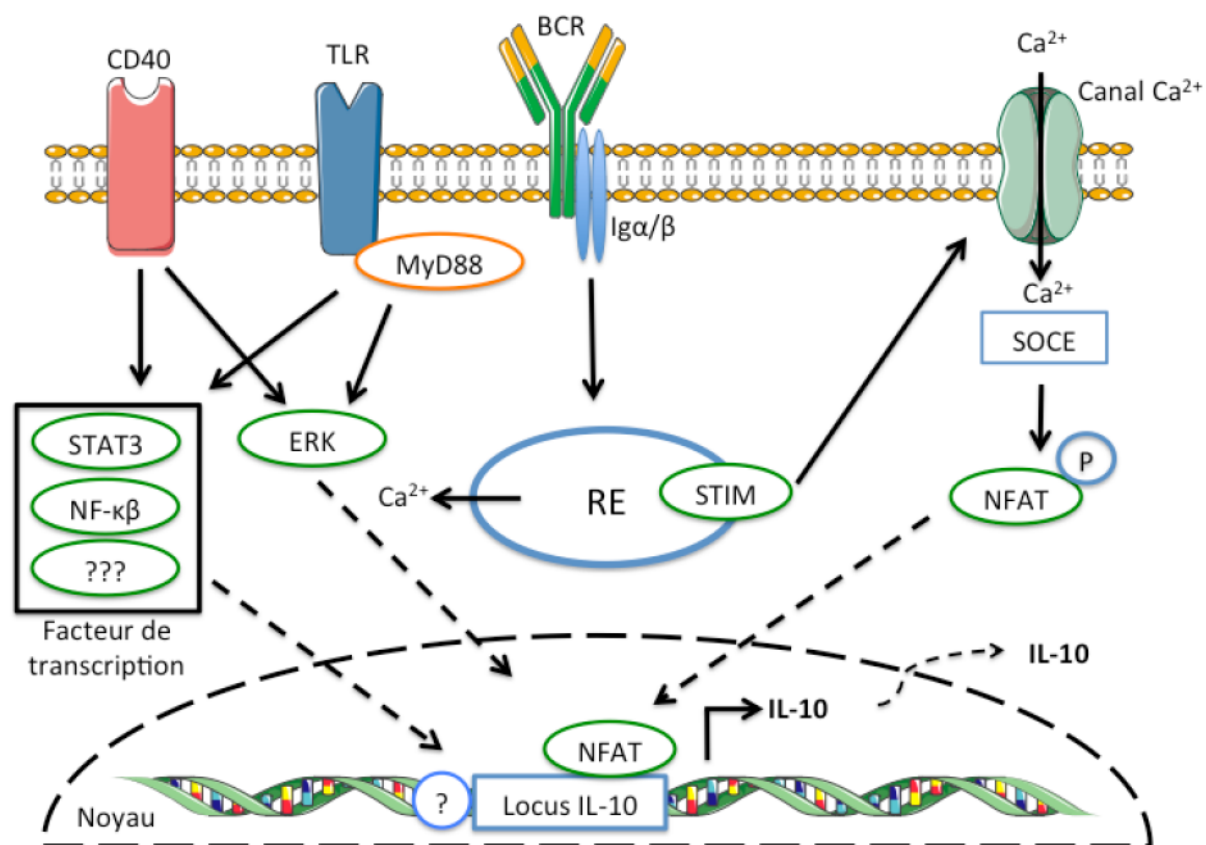


Figure 5 : Modèle des voies de signalisation (TLR, BCR et CD40) impliquées dans l'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B.

1.4.4 Mécanismes d'immunorégulation des Bregs

◆ Sécrétion d'IL-10

L'IL-10 est un homo-dimère ayant 80% de similitude entre l'homme et la souris.

Cette cytokine aux propriétés anti-inflammatoires est essentielle dans le contrôle de l'immunité et l'on retrouve son implication dans plusieurs maladies auto-immunes (Beebe, Cua et al. 2002). Cette cytokine anti-inflammatoire a pour cible de multiples cellules du système immunitaire inné ou adaptatif (Figure 5). La reconnaissance de PAMP par les TLR situés à la surface des APC active la voie de signalisation « extracellular signal-regulated kinase » (ERK) (Ng, Li et al. 2013) et par conséquent stimule la production d'IL-10 par les cellules dendritiques, les macrophages et les

lymphocytes B (Liu, Cao et al. 2014). L'IL-10 active la voie de signalisation JAK-STAT et il semble désormais admis que la fonction immunosuppressive de l'IL-10 passe par la phosphorylation de STAT3 (Williams, Bradley et al. 2004, El Kasmi, Holst et al. 2006, Liu, Liu et al. 2013).

L'IL-10 est une cytokine multifonction dont le rôle principal semble être la régulation de la réponse immune T. Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels l'IL-10 contrôle l'activation des LT ne sont pas complètement définis, il semble qu'elle intervient directement dans la présentation de l'Ag par les cellules présentatrices d'Ag (Sabat, Grütz et al. 2010) ou bien par la délivrance d'un signal inhibiteur directement au LT (Brooks, Walsh et al. 2010).

L'IL-10 est le mécanisme d'immunosuppression médié par les LB le plus étudié. Bien que l'expression d'IL-10 par les LB dans de nombreuses conditions différentes soit établie, l'importance et le rôle des LB IL-10⁺ dans la régulation de la réponse immune n'ont pas fini d'être démontrés.

Les LB sécréteurs d'IL-10 sont décrits par Mizoguchi et son équipe en 2002 dans un modèle d'inflammation chronique de l'intestin où il montre que les lymphocytes B IL-10⁺ surexpriment le marqueur phénotypique CD1d (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002). La même année c'est au tour de Fillatreau et son équipe de montrer que les LB peuvent produire de l'IL-10 après stimulation via le BCR et le CD40. Il montre également dans un modèle murin d'EAE, le rôle de ces cellules dans l'auto-immunité (Fillatreau, Sweenie et al. 2002). Dans un modèle d'EAE murin, il est également décrit qu'au niveau des ganglions drainants, ce sont principalement les plasmablastes qui expriment l'IL-10 durant la maladie et que ces cellules sont générées uniquement lors de celle-ci. Dans cette étude, l'inactivation des facteurs de

transcription IRF4 et Blimp1 dans les LB entraîne une chute de la sécrétion d'IL-10 suggérant un rôle important de ces protéines dans la sécrétion d'IL-10 par les plasmablastes (Matsumoto, Baba et al. 2014).

Il s'en suit de nombreuses études où il est montré l'implication des LB producteurs d'IL-10 dans différents modèles murins d'auto-immunité comme l'arthrite induite par le collagène (Mauri, Gray et al. 2003, Carter, Rosser et al. 2012), le lupus systémique érythémateux (Haas, Watanabe et al. 2010, Watanabe, Ishiura et al. 2010), l'inflammation intestinale (Sattler, Ling et al. 2014), le diabète de type I (Hussain and Delovitch 2007), la thrombopénie immune (Tang, Qu et al. 2015), la sclérose en plaque (Yoshizaki and Tedder 2015) et l'EAE (Matsushita, Yanaba et al. 2008). L'implication des LB IL-10⁺ est aussi mise en évidence dans des modèles infectieux comme l'infection par des parasites (Correale, Farez et al. 2008) et la malaria cérébrale où le transfert adoptif de ces cellules permet de diminuer significativement l'accumulation de cellules NK et CD8⁺ dans le tissu cérébral améliorant ainsi le pronostic des souris infectées (Liu, Chen et al. 2013). Dans le cancer, le transfert adoptif de cellules B10 inhibe la déplétion de LB tumoraux par un anticorps anti-CD20 via un mécanisme dépendant de l'IL-10 qui inhibe l'activation des monocytes (Horikawa, Minard-Colin et al. 2011). D'autre part, il est montré que les Breg CD24^{hi} CD38^{hi} producteurs d'IL-10 inhibent la prolifération des LT et convertissent les LT effecteurs en Treg ce qui pourrait participer à l'échappement immunitaire des cellules tumorales (Wang, Yuan et al. 2015). D'autres travaux décrivent que ces cellules CD24^{hi} CD38^{hi} expriment un plus haut niveau d'expression d'IL-10 que les LB matures ou mémoires. Cette étude met notamment en évidence que l'IL-10 produite par ces cellules est capable de diminuer l'expression du CD86 d'une manière autocrine ce qui à son tour entraîne l'inhibition de la prolifération des

LT et de la production de TNF α (Nova-Lamperti, Fanelli et al. 2016). Dans le cadre de la transplantation, il a également été démontré un rôle des LB sécréteurs d'IL-10 (Rowe, Banovic et al. 2006). En effet, il est montré dans un modèle murin de greffe allogénique que des LB exprimant l'IL-10 ainsi que TIM-1 étaient capables d'induire une tolérance allogénique (Ding, Yeung et al. 2011).

Bien que toutes ces études montrent un effet inhibiteur de l'IL-10 sur la réponse immunitaire, il paraît évident que cette cytokine peut également jouer un rôle dans le renforcement de la réponse immune. En effet des études montrent un effet anti-tumoral de l'IL-10 par l'activation de cellules NK (Zheng, Ojcius et al. 1996). Tous ces mécanismes suggèrent que l'effet inhibiteur de l'IL-10 serait dépendant du contexte physiopathologique. Il est encore controversé de dire que la sécrétion d'IL-10 est en lien avec une sous population de LB bien précise. Bien qu'il soit démontré que l'IL-10 est majoritairement exprimée chez l'homme par les lymphocytes B transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi}, toutes ces cellules ne sont pas capables d'exprimer cette cytokine ce qui exige d'autres investigations permettant d'améliorer la caractérisation de ces cellules régulatrices productrices d'IL-10.

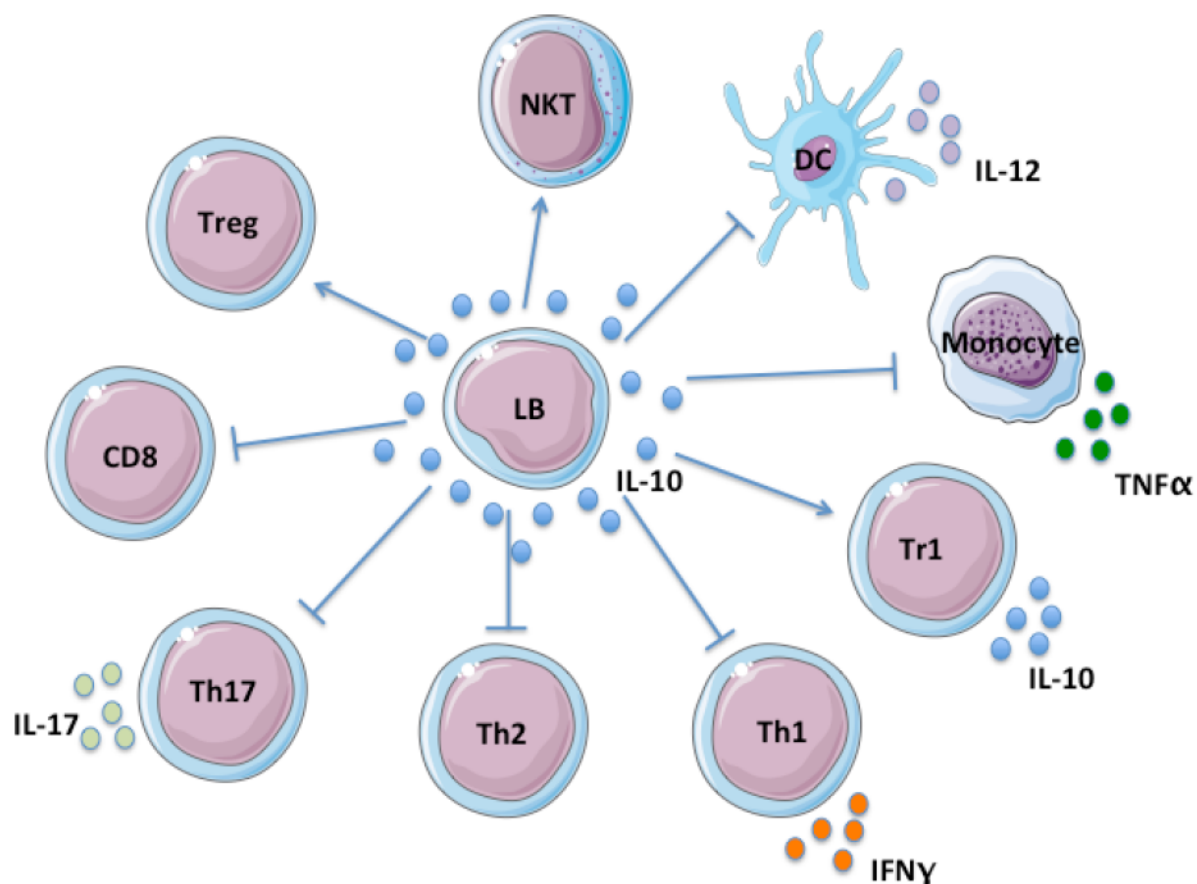


Figure 6 : Les différentes voies d'immunorégulation par l'IL-10.

◆ Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

L'IL-10 est la cytokine majoritairement étudiée dans les mécanismes de régulation par les LB mais il existe d'autres cytokines ayant une capacité d'immunorégulation secrétées par ceux-ci. Le TGF- β est une cytokine appartenant au groupe des facteurs de croissance tissulaires. Cette cytokine possède une activité biologique très diverse selon les organes ou les tissus considérés et intervient à de multiples niveaux. Elle est impliquée dans beaucoup de processus physiopathologiques comme la carcinogenèse, la cicatrisation, l'inflammation, la senescence et la dégénérescence (Bartram and Speer 2004). Dans le système immunitaire, le TGF- β est connu pour être produit majoritairement par les phagocytes mononucléés et les

Treg. Il a été montré que cette cytokine joue un rôle important dans l'inhibition de la différenciation de lymphocyte CD4 en Th1 et Th17 (Li, Wan et al. 2007). Dans un modèle de souris NOD, une étude montre que le transfert adoptif de LB sécrétant un haut niveau de TGF- β par stimulation préalable avec du LPS, inhibe le développement du diabète et augmente l'apoptose de LT effecteurs contrairement au souris ayant reçu des LB non activés (Tian, Zekzer et al. 2001). De plus, une autre étude montre dans un modèle murin d'allergie des voies respiratoires induite par l'ovalbumine (OVA), le développement spontané d'une tolérance locale après expositions répétées. Le transfert adoptif de LB issus de ganglions lymphatiques hilaires de ce modèle à un autre modèle sensible à l'OVA montre que ces cellules exercent un effet régulateur via la conversion de LT CD4⁺ CD25⁻ en Treg de façon dépendante aux LB sécréteurs de TGF- β (Singh, Carson et al. 2008). Quatre ans plus tard, la même équipe montre que la réponse régulatrice des LB issus de ce modèle de tolérance est indépendante de la sécrétion d'IL-10 et que ces cellules présentent un phénotype CD5⁺, expriment le TGF- β et colocalisent avec les Treg (Natarajan, Singh et al. 2012).

◆ Sécrétion d'IgG4

Les anticorps jouent un rôle central dans l'immunité en formant une interface avec le système immunitaire inné et l'activité pro-inflammatoire. L'IgG4 est la moins fréquente des quatre sous classes d'Ig et représente 3 à 6% des immunoglobulines dans le sérum normal. L'IgG4 est une molécule dynamique capable d'échanger des bras Fab avec une chaîne lourde jointe à une chaîne légère d'une autre molécule qui se traduit par des anticorps bi-spécifiques (IgG4 Fab arms exchange). Ces « IgG4 Fab arms exchange » sont incapables de se lier à un Ag et perdent leur capacité à

former des complexes immuns. De plus, cet anticorps peut se lier à la fraction Fc d'un autre IgG et pourrait donc contribuer à un effet anti-inflammatoire (Aalberse, Stapel et al. 2009). L'impact de ces IgG4 a été confirmé in vivo sur un modèle de singe avec une myasthénie auto-immune induite où l'injection d'IgG4 recombinant protège contre la maladie (van der Neut Kofschoten, Schuurman et al. 2007). De plus, Van De Veen et son équipe montrent que l'induction de Breg IL-10⁺ exerce une immunorégulation non seulement par l'IL-10 mais aussi via la production d'anticorps IgG4 contribuant à une tolérance périphérique (van de Veen, Stanic et al. 2013). Ces études suggèrent donc un potentiel effet additionnel des IgG4 dans l'induction de la tolérance par les LB.

◆ **Sécrétion d'IgM**

L'homme et la souris naissent avec un taux élevé d'anticorps IgM circulants générés par des LB néonataux appelés ILB (Innate-Like-B cells). Ces IgM font partie de la première ligne de défense contre les Ag mais jouent également un rôle dans le maintien de l'homéostasie immunitaire comme l'élimination des cellules apoptotiques qui est une fonction clé du système immunitaire (Shaw, Hörkkö et al. 2000) permettant d'inhiber les signaux pro-inflammatoires (Litvack, Post et al. 2011). Ces anticorps naturels possèdent un répertoire limité et sont majoritairement sécrétés par les LB de la zone marginale. Le transfert adoptif d'IgM polyclonaux auto-réactifs chez un modèle murin de lupus accroît la survie des souris et diminue le taux de CD4 Th1 et Th17 au niveau de la rate et du sang périphérique comparé à des souris non traitées (Stoehr, Schoen et al. 2011). En 2012, il a été montré chez des souris WT-B6 une protection contre les lésions rénales engendrées par l'ischémie reperfusion ainsi qu'une protection contre le rejet de greffe cardiaque quand les souris sont

prétraitées avec de l'IgM. Cette protection passerait notamment par l'inhibition de la prolifération des cellules pro-inflammatoires, de la sécrétion d'IFN γ et d'IL-17 engendrée par des alloantigènes (Lobo, Bajwa et al. 2012)

Chez l'homme, il a également été montré chez des patients SLE qui avaient un taux élevé d'IgM anti-phosphorylcholine, une diminution du risque d'apparition de maladies cardiovasculaires (Grönwall, Akhter et al. 2012). Il a également été montré que des LB ayant des capacités immunosuppressives sont enrichis en cellules mémoires IgM⁺. De plus, cette étude montre qu'après transplantation allogénique de cellules souches, les patients atteints de GVHD chronique ont une moindre fréquence de ces cellules régulatrices comparé à des patients sans GVHD chronique ou à des donneurs sains (Khoder, Sarvaria et al. 2014). Ces études montrent bien la pluralité des mécanismes pouvant être mis en jeu par les LB ayant des capacités immunosuppressives. La production d'IgM a une implication importante dans le contrôle de l'inflammation et le développement de maladies auto-immunes. Cependant on ne sait ni identifier ces cellules, ni s'il existe une sous population de LB dédiés à cette fonction.

◆ **Granzyme B :**

Le granzyme B est une sérine protéase contenue dans les granules cytotoxiques produits majoritairement par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Cette enzyme intervient dans le clivage de caspases entraînant l'apoptose de cellules infectées par un virus (Trapani and Sutton 2003).

L'expression de granzyme B par les LB est mise en évidence pour la première fois chez un patient atteint de leucémie lymphocytaire B chronique (B-CCL) traité avec de l'IL-21. Cette étude montre que les cellules B-CCL traitées avec de l'IL-21 et du CpG

sont capables d'induire l'apoptose de cellules non traitées (Jahrsdörfer, Blackwell et al. 2006). La même équipe démontre également que les Ag viraux peuvent induire la sécrétion de granzyme B actif par les lymphocytes B humains (Hagn, Schwesinger et al. 2009) chez des patients SLE. Ces cellules granzyme B⁺ expriment également le CD5 (Hagn M. EJI 2010) qui est un marqueur utilisé dans l'identification de Breg murins. Une autre étude montre pour la première fois que l'induction par l'IL-21 de lymphocytes B humains granzyme B⁺ dépend à la fois des voies de signalisation des TLR et du BCR. Cette étude montre que l'IL-21 induit un phénotype régulateur chez les LB avec l'expression de granzyme B mais aussi d'IL-10 et d'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO). La fonction régulatrice des LB granzyme B⁺ passe notamment par la suppression de la prolifération des lymphocytes T via la dégradation du TCR et de manière dépendante à la sécrétion de granzyme B. Ces travaux établissent la présence de ces cellules dans les infiltrats de tumeurs solide renforçant l'idée d'une fonction régulatrice de ces cellules qui pourrait également jouer un rôle dans la suppression de la réponse anti-tumorale (Lindner, Dahlke et al. 2013). Bien que la fonction régulatrice des LB associés à l'expression de granzyme B soit établie, l'importance de ce phénomène *in vivo* reste à éclaircir.

◆ L'indoleamine 2.3-dioxygénase (IDO)

L'IDO est une molécule décrite comme favorisant la tolérance immunitaire par l'inhibition de l'activation des lymphocytes T (Katz, Muller et al. 2008). Il a été montré que l'engagement de CTLA-4 avec le ligand B7 présent à la surface des cellules dendritiques mais aussi des lymphocytes B favorise le relargage d'IDO impliqué dans la tolérance périphérique (Fallarino, Grohmann et al. 2003) et que la présence de TGF- β confère un effet régulateur à l'IDO (Pallotta, Orabona et al. 2011). De plus,

une étude montre que les lymphocytes B stimulés par CpG et capables de sécréter de l'IDO sont en mesure d'inhiber la prolifération des LT et d'induire la génération de CD4⁺ Foxp3⁺ en particulier en présence de TGF- β . L'inhibition de la production d'IDO par ces cellules par un anticorps anti-CTLA-4 suggère que ce mécanisme est dépendant d'un contact cellulaire (Nouël, Pochard et al. 2015).

◆ Programmed cell death 1 ligand (PD-L1)

La molécule PD-L1 a été récemment proposée chez la souris comme un nouveau mécanisme d'immunosuppression médié par les LB. Cette molécule membre de la famille moléculaire B7 est exprimée à différents degrés sur de nombreuses populations cellulaires comme les cellules dendritiques, LT, LB et macrophages.

PD-L1 et son récepteur PD-1 ont un rôle important dans l'inhibition de la réponse immune. Des souris C57BL/6 μ MT (déficientes en LB) qui ont reçu un transfert adoptif de LB issus d'un modèle d'EAE induite, présentent une réduction des signes cliniques de la maladie comparativement à un transfert de LB PD-L1^{-/-} (Bodhankar, Galipeau et al. 2013). Une autre étude dans un modèle murin d'EAE montre que les lymphocytes B PD-L1^{hi} ont des capacités immunosuppressives in vivo. Le transfert de LB PD-L1^{hi} dans le modèle murin d'EAE retarde l'apparition et la gravité de la maladie et l'amélioration de l'EAE est associé à une diminution de la prolifération des LT folliculaires et à une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IFN γ (Khan, Hams et al. 2015). L'implication des LB PD-L1^{hi} dans la régulation de la réponse immune reste encore à approfondir notamment chez l'homme où le rôle de ces cellules est encore très controversé.

◆ **Ligand induisant l'apoptose**

Le ligand inducteur de mort cellulaire le mieux caractérisé chez l'homme et la souris est le Fas-L. Cette protéine fait partie de la famille des récepteurs du TNF. Cette molécule est capable d'activer un programme de mort cellulaire à travers le récepteur Fas de la cellule cible aboutissant à l'apoptose de celle-ci (Nagata and Suda 1995).

L'expression de Fas-L par les LB humains périphériques a été montrée après activation par LPS, PMA et ionomycine (Hahne, Renno et al. 1996). En 2001, une étude met en évidence que les LB exprimant Fas-L jouent un rôle dans les maladies auto-immunes et l'induction de tolérance. En effet, les LB stimulés par LPS issus de souris NOD expriment fortement TGF- β et Fas-L. Le transfert adoptif de ces cellules chez des souris immunodéficientes NOD Scid (severe combined immunodeficiency) co-injectées avec des cellules T issues de souris NOD pré-diabétiques, prévient l'apparition de la maladie contrairement au transfert de cellules non stimulées n'exprimant pas le Fas-L. (Tian, Zekzer et al. 2001). D'autre part, la fonction immunorégulatrice de Fas-L a été démontrée dans un modèle de greffe de peau mâle/femelle où le transfert de LB de souris mâle est capable d'induire une tolérance de la greffe de peau chez les femelles alors que le transfert de LB déficients en Fas-L n'induit pas de tolérance (Minagawa, Okano et al. 2004).

Plus récemment, la découverte de nouvelles cytokines aux capacités régulatrices à permis d'ouvrir de nouveaux champs d'investigation sur la fonction régulatrice des LB via la sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-12 comme l'IL-27 ou l'IL-35.

1.4.5 Mécanismes de régulation via les cytokines de la famille de l'IL-12

La famille de l'IL-12 est composée de 4 complexes hétérodimériques (Figure 7) dont chacun est composé d'une sous unité alpha (IL12p35, IL23p19, IL-27p28) et d'une chaîne beta (EBI3 ou IL-12p40) (Collison and Vignali 2008, Dixon, O'Flynn et al. 2014). Chaque sous-unité est capable de se lier à un récepteur spécifique. L'IL-12 et l'IL-23 sont deux cytokines décrites comme ayant une activité majoritairement pro-inflammatoire passant notamment par le développement des Th1 et Th17. En revanche l'IL-35 et l'IL-27 dont la composition commune comprend la sous unité EBI3 ont une activité majoritairement anti-inflammatoire. (Banchereau, Pascual et al. 2012).

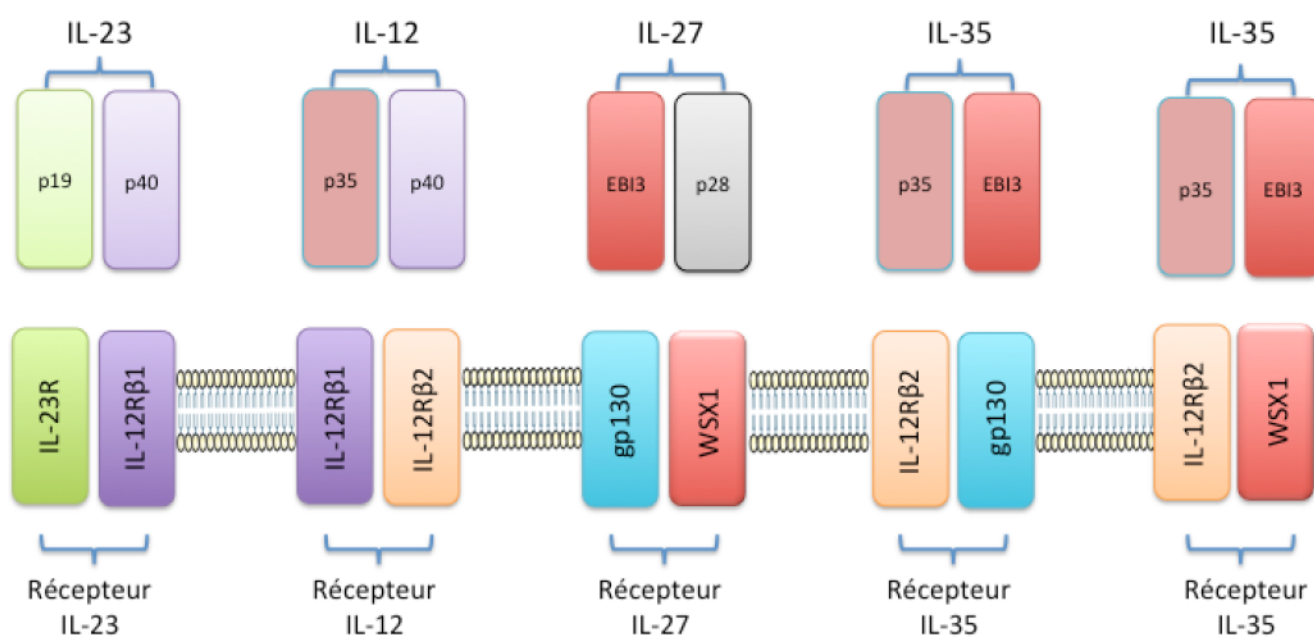


Figure 7 : Cytokines de la famille de l'IL-12 et leurs récepteurs.

◆ **Epstein Barr virus induced gene 3 (EBI3)**

La protéine EBI3 a été initialement découverte lors d'infection de LB par l'Epstein Barr Virus (Devergne, Hummel et al. 1996). Cette protéine est également induite dans les LB murins via la stimulation du TLR4 et du CD40. EBI3 peut être associée aux protéines p28 et p35 pour former les cytokines IL-27 et IL-35 respectivement mais l'activité biologique propre de la sous-unité EBI3 est encore bien difficile à définir. Néanmoins, la perte d'expression d'EBI3 chez la souris entraîne une diminution de la réponse Th1 et une augmentation de la réponse Th2 dans un modèle d'inflammation des voies aériennes (Dokmeci, Xu et al. 2011). Une autre étude dans un modèle de souris transgénique lupique sur-exprimant EBI3 montre une amélioration de la survie ainsi qu'une diminution d'anticorps anti-dsDNA et IgE (utilisé pour le diagnostic du lupus) par rapport au même modèle de souris non transgénique (ne sur-exprimant pas EBI3) ce qui suggère un rôle d'EBI3 dans la sécrétion d'anticorps. Egalement, l'analyse par PCR quantitative (qPCR) chez ce modèle sur-exprimant EBI3 révèle une augmentation des ARNm (acide ribonucleique messenger) de Foxp3 et une diminution des ARNm IFN γ dans les splénocytes par rapport au modèle contrôle (souris WT) ce qui suggère une plus forte régulation de la réponse immune (Shinsuke and Hiroshi 2013). L'analyse par cytométrie en flux confirme l'augmentation de la fréquence de Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) dans le modèle sur-exprimant EBI3 ce qui appuie la fonction immunosuppressive d'EBI3 passant notamment par l'induction de Treg. Néanmoins, il est à noter dans cette étude que la surexpression d'EBI3 n'est pas corrélée avec une augmentation d'expression d'IL-10.

L'expression d'EBI3 a également été détectée par western blot dans des lymphocytes B humains normaux après stimulation avec anti-IgM, anti-CD40 et IL-4,

et cette protéine semble être présente à différentes étapes de la différenciation B. Cependant la protéine p28 n'a pas été détectée tout comme l'IL-27 dans les surnageants de culture (Larousserie, Bardel et al. 2006).

La surexpression d'EBI3 a été également démontrée dans les cellules tumorales comme le lymphome B (Larousserie, Bardel et al. 2006), le cancer du col de l'utérus (Hou, Dong et al. 2016) ou encore le cancer du poumon (Nishino, Takano et al. 2011) dans lequel l'expression d'EBI3 corrèle avec un pronostic défavorable. Ces données suggèrent que l'expression d'EBI3 joue un rôle dans la progression tumorale et pourrait jouer un rôle dans une régulation de la réponse immune exacerbée favorisant ainsi l'échappement tumoral. Ces études montrent l'implication d'EBI3 dans la régulation de la réponse immune, cependant il n'est pas clairement établi si EBI3 est capable d'agir seule ou bien sous forme d'IL-27 ou d'IL-35. Récemment, il a également été montré par co-immunoprécipitation qu'une interaction d'EBI3 et p19 était possible (Ramnath, Tunny et al. 2015, Wang, Wei et al. 2016).

◆ IL-35

L'IL-35 est composée des sous unités protéiques p35 et EBI3, cette dernière étant aussi commune à l'IL-27. L'interaction de ces molécules a été identifiée pour la première fois en 1997 (Devergne, Birkenbach et al. 1997), mais leur fonction a été en partie décrite seulement 10 ans plus tard (Collison, Workman et al. 2007). L'IL-35 a des propriétés à la fois immunosuppressives et anti-inflammatoires. Ces capacités ont été testées dans plusieurs modèles. Il a été montré que l'injection d'IL-35 recombinante réduisait la sévérité de l'arthrite induite par le collagène (Niedbala, Wei et al. 2007).

Cette cytokine est capable d'inhiber la prolifération de LT effecteurs par l'arrêt du cycle cellulaire et stimule l'induction de Treg producteurs d'IL-35 (Vignali and Kuchroo 2012). L'IL-35 n'est pas produite exclusivement par les Treg, les lymphocytes B sont également capables de produire l'IL-35 et il a été montré que ces cellules sont essentielles dans la rémission d'EAE chez la souris (Shen, Roch et al. 2014). Il a également été montré que l'utilisation d'IL-35 recombinante inhibait l'activation des LB par le LPS tout en induisant la sécrétion d'IL-10. De plus, l'induction de Breg par l'IL-35 supprime l'uvéite auto-immune chez un modèle murin (Wang, Yu et al. 2014). Toutes ces données mettent en avant que l'IL-35 pourrait avoir un rôle majeur dans la capacité régulatrice des LB que ce soit de manière indirecte par le contrôle de la sécrétion d'IL-10 ou directement par l'expression de cette cytokine aux capacités immunorégulatrices.

◆ IL-27

L'IL-27 est une cytokine hétérodimérique composée des sous unités p28 et EB13, bien que celle ci puisse être exprimée indépendamment (Pflanz, Timans et al. 2002). Cette cytokine est majoritairement exprimée par les macrophages et les cellules dendritiques. Le récepteur de l'IL-27 est composé de 2 chaînes, WSX-1, et gp130 qui compose également plusieurs récepteurs cytokiniques de la famille de l'IL-6. Bien que l'IL-27 soit décrite comme inducteur précoce de la réponse Th1, la perte de WSX-1 chez la souris induit une hyperactivité de la réponse T à une infection parasitaire (Villarino, Hibbert et al. 2003) suggérant également une activité anti-inflammatoire. En effet, il a été montré que l'IL-27 peut prévenir le développement de Th17 et augmenter la production d'IL-10 par les LT (Diveu, McGeachy et al. 2009). De plus, le niveau d'IL-27 chez des patients atteint d'arthrite rhumatoïde est corrélé

avec la réduction du niveau d'IL-17 et d'IL-6 qui sont des cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère des propriétés immunosuppressives de l'IL-27 (Tanida, Yoshitomi et al. 2011). L'IL-27 est également capable d'induire la différenciation des LT CD4 en lymphocytes T régulateur de type 1 (Tr1) producteurs d'IL-10. La production d'IL-10 médiée par l'IL-27 est associée à une diminution de la sécrétion d'IL-17 (Fitzgerald, Zhang et al. 2007). D'autre part il semblerait que l'IL-27 pourrait également jouer sur la différenciation des LB en plasmablastes et la production d'IgG1 (Boumendjel, Tawk et al. 2006). L'IL-27 semble avoir un effet direct sur les LB humains qui se traduit par l'activation de STAT1 ainsi que par l'induction de l'expression de T-bet dans les LB naïfs et mémoires stimulés avec un anti-CD40 et anti-Ig (Larousserie, Charlot et al. 2006). Chez la souris, l'IL-27 a un effet sur l'induction de commutation de classe IgG2a (Yoshimoto, Okada et al. 2004).

Toutes ces études montrent une fois de plus l'implication des LB dans les mécanismes d'immunorégulation à travers divers mécanismes. Cependant il est encore difficile d'apprécier le phénotype spécifique de ces sous-populations ainsi que la relevance de ces mécanismes *in vivo*.

2 Transplantation

La transplantation d'organe représente bien souvent la seule thérapeutique possible pour les patients présentant une perte fonctionnelle irréversible d'organes.

En France, on estime que la greffe rénale représente près de 60% de la totalité des organes transplantés et qu'environ 35 000 personnes étaient porteuses d'un greffon rénal fonctionnel en 2014. Selon l'agence de biomédecine, le nombre de greffes rénales réalisées cette même année est d'environ 3200 et le nombre de patients greffés est en constante augmentation chaque année. Bien que les greffes rénales offrent bien souvent de meilleures issues thérapeutiques que les greffes de foie ou de poumon, le rejet du greffon reste une importante cause de mortalité chez les patients greffés.

2.1 Le rejet de greffe

En transplantation, le principal problème est la reconnaissance de l'organe ou du tissu greffé par le système immunitaire du receveur. La transplantation est normalement effectuée entre individus de même espèce mais génétiquement différents. Ces différences antigéniques sont appelées différences allogéniques et engendrent une réponse immunitaire allospécifique. Dans la plupart des transplantations, les organes sont prélevés chez des donneurs décédés bien que l'utilisation de donneurs vivants d'ailleurs souvent apparentés au receveur soit de plus en plus fréquente notamment dans la greffe rénale.

La réponse immunitaire du receveur contre l'allogreffe cible principalement les antigènes du CMH du donneur. Les différentes expériences montrent que la réponse allospécifique est dirigée contre toutes les molécules du CMH de classe I ou II qui

ont pour rôle de présenter les antigènes sous la forme de peptides aux LT CD8 pour le CMH I ou aux LT CD4 pour le CMH II. Ces molécules sont hautement polymorphes et ce sont ces différences génétiques que les lymphocytes T alloréactifs reconnaissent. Il existe également des antigènes mineurs d'histocompatibilité qui peuvent également servir de cible même si le donneur et le receveur ont le même CMH.

L'alloréactivité présente plusieurs caractéristiques par rapport à une réponse induite par des antigènes conventionnels comme les protéines virales. Cette réponse est de très forte intensité en raison de la grande proportion de LT reconnaissant le greffon comme un élément étranger. En effet, 0,1 à 10% du répertoire des LT est capable de reconnaître les alloantigènes d'un greffon (Wang, Sviland et al. 1998) alors que la fréquence de lymphocytes T spécifiques d'un Ag conventionnel est estimé à moins de 1 pour 100 000 (Karulin, Hesse et al. 2000). De plus, aucune pré-sensibilisation n'est nécessaire à cette réponse et elle peut se faire sans restriction au CMH du soi. On distingue actuellement 3 voies principales de présentation des alloantigènes au système immunitaire du receveur (Figure 8).

2.1.1 La présentation directe

Dans cette voie, les CPA du donneur migrent aux niveaux des organes lymphoïdes secondaires du receveur (Larsen, Steinman et al. 1990) et présentent les antigènes du donneur aux LT du receveur via les molécules du CMH.

2.1.2 Présentation indirecte

Dans la voie indirecte, les CPA activées du receveur migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires pour présenter les alloantigènes du donneur aux lymphocytes T du receveur déclenchant ainsi la réaction contre le greffon.

2.1.3 Présentation semi-directe

Il a également été proposé une voie semi directe (Lechler and Batchelor 1982). Ce modèle propose un mécanisme de passage entre les membranes des CPA du donneur et du receveur, c'est à dire que les CPA du receveur sont capables de capturer à partir de l'endothélium du greffon, les molécules du CMH du donneur (Herrera, Golshayan et al. 2004). Les cellules dendritiques du donneur exprimeraient alors à la fois le CMH du donneur et celui du receveur pouvant ainsi activer simultanément les voies directes et indirectes.

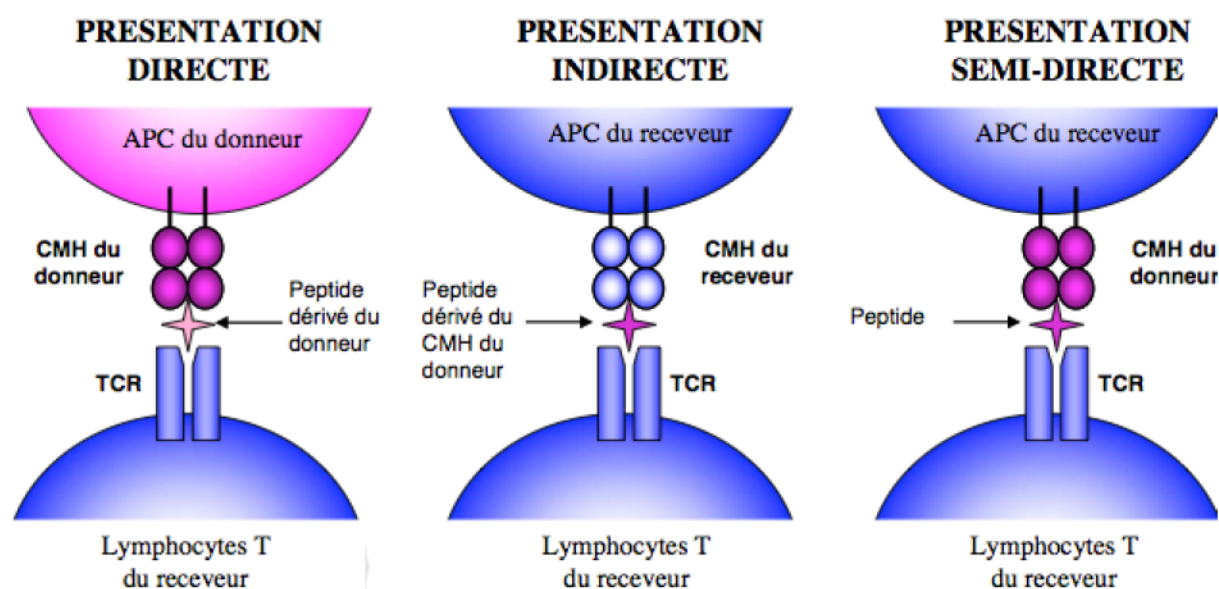


Figure 8 : Voies de présentation des antigènes allogéniques.

2.2 Physiopathologie du rejet de greffe solide

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'initiation des mécanismes de rejet d'allogreffe. La réponse contre le greffon peut être divisée en 3 phases successives. La première est la reconnaissance des alloantigènes du donneur par les lymphocytes T du receveur, il s'en suit une activation et une expansion des lymphocytes T alloréactifs ce qui aboutit à une phase effectrice donnant lieu à la destruction du greffon et donc au rejet. Le processus de rejet commence donc par l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8 via l'interaction avec les CPA du donneur et du receveur présentant les alloantigènes (Figure 9). Après activation, les LT cytotoxiques CD8 et dans une moindre mesure les CD4 vont directement détruire les vaisseaux sanguins et les tissus du greffon. Les CD4 du donneur vont également sécréter une multitude de cytokines pro-inflammatoires ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-17, IL-21, IL-23...) permettant le recrutement et l'activation des cellules mononucléées et polynucléées de l'immunité au site de l'inflammation. Ces cellules vont à leur tour sécréter des cytokines renforçant les signaux pro-inflammatoires et attaquer les cellules du greffon. L'association des lymphocytes et des cellules de l'immunité innée conduit à l'altération de la fonction du greffon voire à sa destruction complète. Dans le rejet chronique, les LT CD4 jouent un rôle important dans l'activation, le changement de classe, la maturation d'affinité et la production d'anticorps de haute affinité par les LB du donneur. La fixation de ces anticorps dirigés contre les alloantigènes du greffon favorise la destruction du tissu greffé par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) faisant intervenir les neutrophiles, les macrophages et les cellules NK. Ce mécanisme entraîne la lyse de la cellule cible via la synthèse de granzyme et de perforine et induit la production de médiateurs pro-inflammatoires (monoxyde d'azote (NO), espèces réactives de

l'oxygène (ROS), TNF). La reconnaissance du greffon par ces anticorps mène également au dépôt de facteur du complément sur les cellules cibles. L'activation de la cascade du complément aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) entraînant la lyse directe des cellules du greffon.

Ce système du complément est un élément important dans le rejet humoral puisqu'il a été montré que la présence d'anticorps dirigés contre le CMH du greffon est suffisante pour entraîner un rejet dans un modèle animal de greffe de cornée (Hegde, Mellon et al. 2002).

Bien que ces phénomènes évoluent au cours des mois ou années, ils conduisent inéluctablement à la perte fonctionnelle du greffon voir au rejet total de celui-ci.

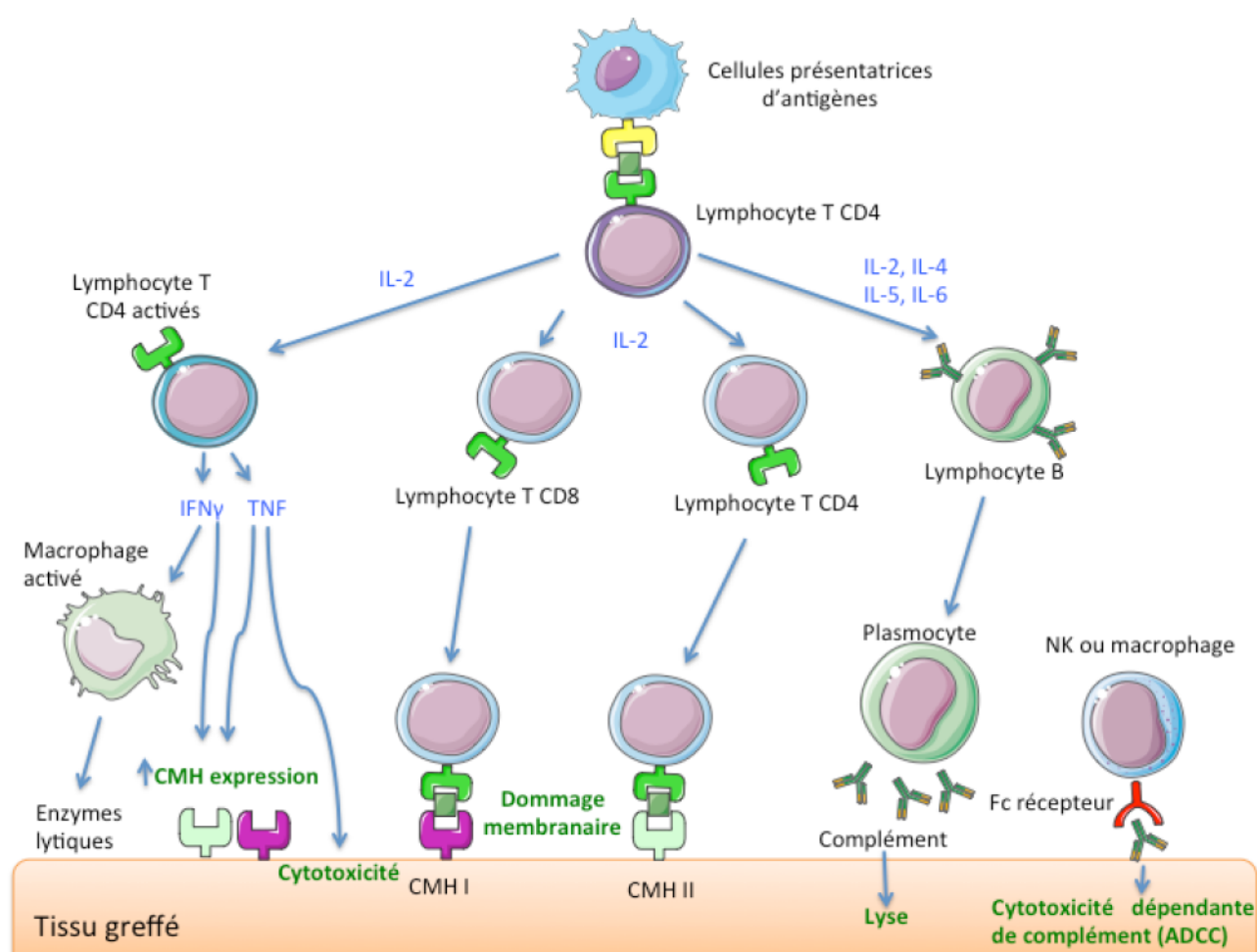


Figure 9 : Mécanismes mis en jeu dans le rejet de greffe.

Les LB sont également capables de jouer un rôle important dans le rejet d'allogreffe indépendamment de la sécrétion d'anticorps. Il a été observé chez la souris des rejets en absence d'allo-anticorps mais qui requièrent cependant la présence de LB. De plus, il a été montré que ce rejet en absence d'anticorps est supporté par une réponse lymphocytaire T induite par la capacité des LB à présenter l'antigène et à entretenir la réponse immune (Zeng, Ng et al. 2014). En effet, dans un contexte allogénique, les LB peuvent présenter les Ag aux LT et il a été mis en évidence qu'une forte infiltration de LB dans le greffon en transplantation rénale était associée à une diminution de la survie du greffon (Hippen, DeMattos et al. 2005).

2.3 La réponse humorale en transplantation

La réponse humorale est reconnue comme la première cause de perte du greffon en transplantation rénale (Einecke, Sis et al. 2009) et la génération d'anticorps spécifiques du donneur appelés DSA est en grande partie responsable de ce type de rejet. Les DSA qui sont des IgG de haute affinité peuvent être dirigés contre les antigènes du système HLA de classe I ou II ou contre des molécules mineures d'histocompatibilité comme MICA et MICB (major histocompatibility class I-related Chain A/B) ou encore contre des antigènes non HLA à la surface des cellules endothéliales, épithéliales ou de l'organe cible (Zhang, Cecka et al. 2011). La production de ces DSA peut être issue d'une immunisation préalable à la greffe par une grossesse, une transfusion sanguine ou une transplantation antérieure. En plus de la capacité des LB à sécréter des DSA, la formation d'agrégats constitués de LB et de CPA au sein du greffon appelés tissu lymphoïde tertiaire (TLT) est également documentée dans un modèle de greffe aortique chez le rat. Une étude montre que la formation de TLT est associée à un rejet chronique un mois après la greffe. Dans ce modèle, il semble que la réponse humorale soit plus intense et associée à une

augmentation de l'activation des lymphocytes T CD4 ainsi qu'à une diminution de la proportion de lymphocytes T régulateurs (Thaumat, Graff-Dubois et al. 2010).

La présence de ces anticorps est un problème majeur qui réduit considérablement la probabilité de succès d'une greffe chez des patients non préalablement désensibilisés. Aujourd'hui, on estime en France qu'environ 25% des patients en attente de greffe rénale sont sensibilisés contre les antigènes HLA et ce nombre atteint jusqu'à 32% pour les Etats Unis. La présence de ces DSA est directement corrélée avec le risque de rejet humoral et la perte du greffon (Lefaucheur, Loupy et al. 2010). De même, l'apparition post greffe de DSA *de novo* (dnDSA) est également associée à un risque de rejet humoral et à un échec de la greffe (Willicombe, Brookes et al. 2012). L'apparition de ces dnDSA peut survenir à n'importe quel moment après la transplantation, de quelques mois à plusieurs années après. Une étude sur 2231 patients montre que 21.4% d'entre eux ont développé des anticorps anti-HLA deux ans après la greffe (Terasaki and Ozawa 2005).

Durant ces dix dernières années, les techniques de recherche des DSA se sont considérablement améliorées notamment avec l'arrivée de la technologie Luminex® qui permet d'augmenter le seuil de détection de ces anticorps.

Aujourd'hui, la prévention de l'apparition de ces DSA et leur détection reste un enjeu capital pour optimiser la survie du greffon à long terme.

2.3.1 Les différents types de rejets humoraux

2.3.2 Rejet humoral aigu

Le rejet humoral aigu est dépendant des lymphocytes B générant des anticorps dirigés contre le greffon (DSA) (Alegre, Florquin et al. 2007). Ce rejet humoral doit être considéré comme une maladie progressive et non comme un épisode sporadique au cours de la période post greffe. Ce type de rejet peut intervenir à plus

ou moins long terme après la greffe et il est associé à une insuffisance rénale aigüe présentant des signes histologiques avec la présence de DSA. Néanmoins, il peut survenir un épisode de rejet humoral aigu dans les tous premiers instants après la transplantation, appelé rejet hyper aigu (Kissmeyer-Nielsen, Olsen et al. 1966).

Ce rejet hyper aigu concerne uniquement les greffons vascularisés et se caractérise par une thrombose des vaisseaux provoquant l'arrêt de l'irrigation du greffon et donc sa nécrose. Il est principalement dû à la présence d'anticorps naturels présents dans le sérum de l'hôte (Cai and Terasaki 2005), en particulier des IgM qui vont reconnaître des antigènes de cellules endothéliales. Les anticorps vont entraîner l'activation du complément et une stimulation des cellules endothéliales qui vont se mettre à sécréter des facteurs de coagulation provoquant l'agrégation des plaquettes. Il s'en suit alors une thrombose intravasculaire pouvant aboutir à de graves lésions du greffon, voir à sa destruction complète. Ces anticorps sont naturellement présents dans le sérum ou acquis suite à une situation immunogène telle que la transfusion, la grossesse ou une greffe antérieure. La prévention du rejet aigu s'effectue par la vérification de la compatibilité (cross-match) entre l'hôte et le donneur.

2.3.3 Rejet humoral chronique

Le rejet médié par les anticorps est une importante cause de rejet d'allogreffe chronique et aigu. Bien que ce dernier soit connu depuis les années 1960, le rôle des anticorps n'était pas encore très clair jusqu'à l'apparition de nouvelles méthodes de diagnostic. L'incidence du rejet humoral hyper aigu causé par la présence d'anticorps naturels anti-HLA a été presque totalement éliminée par les tests de cross-match (Morris, Williams et al. 1968). De même l'incidence de rejet chronique à médiation

cellulaire a également été considérablement réduite avec le développement des agents immunosuppresseurs. Cependant le rejet chronique à médiation humorale dû à la persistance de ces DSA, prend une part de plus en plus importante dans la perte de greffon et est considéré comme le facteur majeur de perte du greffon à long terme (Wiebe, Gibson et al. 2012). Bien que les nouvelles stratégies permettent de prévenir en partie le rejet humoral aigu, il est actuellement impossible de dépléter complètement les cellules plasmatiques productrices d'anticorps anti-HLA chez les patients (Loupy, Suberbielle-Boissel et al. 2010). Les DSA résiduels sont responsables de la lente dégradation du greffon qui se caractérise par une persistance de glomérulonéphrite, d'inflammation et de dépôt de C4d (fragment d'activation du complément) sur les capillaires péri-tubulaires. En effet ces cellules plasmatiques engendrent la production de DSA qui se lient aux molécules HLA ou non HLA de l'endothélium. Ce phénomène conduit à l'activation du complément et à une réponse cellulaire cytotoxique engendrée par le recrutement de cellules NK, de polynucléaires neutrophiles et de macrophages contribuant à la dégradation des capillaires et des tissus du greffon (Hidalgo, Sis et al. 2010). Ces lésions aboutissent peu à peu à une nécrose des tissus et à une diminution de la fonction rénale au cours du temps aboutissant inéluctablement à une perte totale de la fonction du greffon.

Aujourd'hui, malgré les progrès effectués pour contrôler la réponse humorale, la durée de vie d'un greffon reste limitée à quelques années en raison de la dégradation lente causée par la sécrétion de DSA. Il en résulte une perte du greffon encore bien présente et de ce fait une augmentation du nombre de patients en attente de retransplantation. De plus, ces patients ayant besoin d'une deuxième greffe sont susceptibles d'être déjà sensibilisés aux antigènes HLA entravant

considérablement le maintien d'un second greffon. Bien que l'implication des LB soit démontrée dans l'induction d'une tolérance, le rejet chronique médié par les lymphocytes B sécréteurs d'anticorps reste la cause majeure de la perte du greffon à long terme. C'est pourquoi il est nécessaire de continuer à mieux appréhender le rôle et les mécanismes des LB dans la tolérance immune.

2.4 Stratégies immunosuppressives

Après une greffe d'organe, l'utilisation de traitement immunosuppresseur est indispensable pour éviter les risques de rejet du greffon. Cependant, les immunosuppresseurs utilisés actuellement en clinique appliquent une immunosuppression globale qui est non spécifique aux allo-antigènes présents dans le greffon. Cette immunosuppression non spécifique affecte également l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale conduisant à exposer les patients greffés à de forts risques d'infections opportunistes et favorisent le développement et la progression tumorale qui ne sont plus contrôlés efficacement par le système immunitaire. Nous présentons ici un bref rappel sur les principales molécules utilisées en transplantation et en particulier leurs rôles dans le contrôle de la réponse humorale.

2.4.1 Inhibiteurs de la calcineurine

Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI) comme le tacrolimus ou la cyclosporine A (CsA) sont d'autres agents immunosuppresseurs utilisés depuis plus de 20 ans en transplantation rénale pour réduire les risques de rejet. L'utilisation de ces molécules en transplantation rénale est associée à une diminution de l'incidence du rejet aigu avec une amélioration de la survie du greffon à un an. Cependant il a été montré une toxicité rénale importante de ces molécules (Vincenti, Ramos et al. 2001). Aux Etats

Unis, le tacrolimus est beaucoup plus utilisé que la CsA car il est associé à une diminution de la fréquence de rejet et de toxicité rénale (Ekberg, Tedesco-Silva et al. 2007). Cependant, il est rapporté une neurotoxicité et des effets secondaires gastro-intestinaux plus importants avec le tacrolimus qu'avec la CsA.

Les CNI agissent par la formation d'un complexe se liant à la calcineurine bloquant ainsi son activité phosphatase et entraînant l'inhibition du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells) et donc la synthèse d'IL-2. Ce mécanisme va engendrer une réduction de la prolifération et de l'activation des LT alloréactifs.

Il est montré que les CNI affectent également la réponse humorale des patients transplantés en interférant avec les LT helper mais ils ne semblent pas cibler directement les LB, ce qui supporte également le fait que les LT interviennent dans la réponse humorale (Heidt, Roelen et al. 2010).

Le recours au CNI requiert une grande prudence pour assurer une dose efficace suffisante pour l'efficacité thérapeutique tout en minimisant les problèmes de toxicité, en particulier rénale. Actuellement des surveillances de routine contraignantes pour les patients ont été mises en place pour vérifier l'efficacité du traitement tout en limitant les effets secondaires et pour réajuster au mieux le dosage vers un niveau thérapeutique le plus bas possible. Bien que l'efficacité immunosuppressive des CNI ne soit plus à démontrer, l'utilisation de cette molécule entraîne d'autres effets secondaires qui peuvent être délétères pour la survie des patients. C'est pourquoi il est toujours nécessaire de développer de nouveaux agents immunosuppresseurs afin de trouver une alternative au CNI comme le belatacept, molécule dépourvue de toxicité rénale.

2.4.2 Inhibiteurs de la voie mTOR

Les inhibiteurs de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) comme le sirolimus (rapamycine) et l'everolimus sont des molécules développées pour réduire ou éviter les effets toxiques des CNI. Ces molécules sont notamment capables de se lier à la protéine intracellulaire FKBP (FK binding protein) formant un complexe qui inhibe l'activité du complexe mTOR 1 (mTORC1). L'inhibition de cette voie va entraîner l'inhibition de la prolifération cellulaire et la production de cytokines et par conséquent empêcher la prolifération clonale des LT activés (Zhang, Readinger et al. 2011). Aussi, des études montrent que l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine favorise l'expansion des Treg humains fonctionnels (Battaglia, Stabilini et al. 2006). Néanmoins, l'inhibition de cette voie a également un effet sur les LB et notamment sur la production d'anticorps. En effet, la délétion inductible de mTOR chez un modèle murin nuit à la formation de centres germinaux et entraîne une diminution de la réponse humorale (Zhang, Pruitt et al. 2013) et donc une possible réduction de la formation de DSA chez les patients transplantés. Bien que les études sur l'effet des inhibiteurs de la mTOR sur la production de DSA soient encore peu nombreuses et controversées, il est montré chez des patients transplantés rénaux que le remplacement post-greffe du traitement par cyclosporine avec du sirolimus ou everolimus n'entraîne aucune incidence sur la production et la persistance de dnDSA (Lebranchu, Thierry et al. 2011, Kamar, Del Bello et al. 2013).

2.4.3 Belatacept

Le Belatacept commercialisé sous le nom de Nulojix est un anticorps monoclonal humanisé issu de la fusion d'un fragment d'anticorps IgG1 avec la partie extracellulaire de la protéine CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4)

qui a été mutée pour améliorer la fixation au CD80 et CD86. Le Belatacept est administré par voie intraveineuse mensuellement. C'est un inhibiteur de la costimulation entre cellules présentatrices d'Ag et lymphocytes T empêchant ainsi l'activation des LT et donc l'attaque du greffon par ceux-ci. En effet, le Belatacept va interagir avec les molécules CD80/86 (B7) présentes sur les CPA dont les LB, empêchant la mise en place du signal de costimulation via le CD28 ou le CTLA-4 du lymphocyte T (Figure 10).

Des études cliniques de phase II et III ont montré l'efficacité du Belatacept face aux traitements anti-calceurine classiquement utilisés. Une étude ne montre aucune différence de rejet aigu entre ces deux traitements, en revanche, la fonction rénale des patients traités sous Belatacept était significativement plus élevée après 5 ans (Vincenti, Larsen et al. 2005). D'autres essais cliniques de phase III chez des patients transplantés rénaux montrent un taux de survie de la greffe à 3 ans supérieur avec une fonction rénale maintenue par rapport à des patients traités sous cyclosporine. Cette étude rapporte également un effet paradoxal du Belatacept puisqu'elle souligne un plus faible taux de formation de dnDSA (5 à 6%) avec en revanche un taux de rejet médié par les LT augmenté par rapport aux patients traités avec CNI (Vincenti, Larsen et al. 2012).

Bien que ces travaux mettent en évidence une meilleure efficacité du Belatacept à court et moyen terme, une étude rétrospective sur des patients greffés depuis 10 ans rapporte un taux de survie identique entre les patients traités par Belatacept (71,4%) ou par CNI (71,3%). Néanmoins, la fonction rénale des patients reste supérieure chez les patients traités avec Belatacept avec une induction de dnDSA nulle comparée aux patients traités par CNI (0% vs 38,5%) (Schwarz, Mayerhoffer et al. 2015). De plus, le Belatacept réduit également les facteurs de risque

cardiovasculaire liés à la transplantation. Cela met en évidence que le Belatacept est aussi efficace que les anti-calcineurines tout en améliorant la fonction rénale sans induire plus de complications.

La dernière étude incluant 666 patients transplantés rénaux montre que l'utilisation du Belatacept permet de réduire le risque de décès et de perte de greffon de 43% à 7 ans comparativement à une cohorte de patients traités par cyclosporine (Vincenti, Rostaing et al. 2016).

En plus du rôle inhibiteur de LT, le blocage du signal de costimulation CD28-CD80/CD86 pourrait entraîner l'induction de lymphocytes B régulateurs CD24^{hi} CD38^{hi}. En effet, il est montré chez les patients transplantés rénaux traités avec Belatacept, une augmentation significative de ces cellules au potentiel immunorégulateur comparé aux patients traités par CNI (Leibler, Matignon et al. 2014). La présence des molécules CD80/CD86 à la surface des LB laisse à penser un effet direct du Belatacept sur les LB.

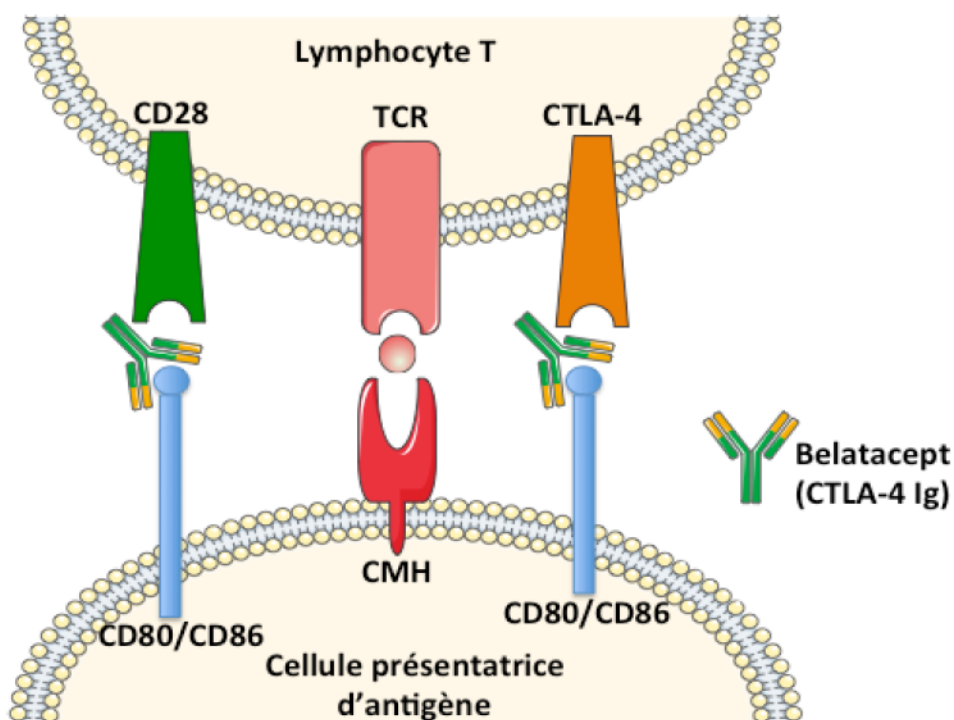


Figure 10 : Inhibition de la costimulation des LT par le belatacept.

2.4.4 Déplétion des lymphocytes B

En transplantation, la plupart des stratégies immunosuppressives utilisées historiquement étaient orientées vers la réponse lymphocytaire T mais depuis quelques années les thérapies immunosuppressives ayant pour cible les LB et visant à diminuer l'incidence des DSA se développent de plus en plus. Différentes stratégies ont été développées afin de réduire la présence d'anticorps spécifiques du donneur. Une approche consiste à déléter les lymphocytes B par l'utilisation d'un anticorps déléétant dirigé contre la protéine membranaire CD20 (rituximab). Le rituximab est une immunoglobuline chimérique glycosylée qui cible directement le CD20 présent sur la plupart des LB entraînant un effet toxique sur ceux-ci. Cependant, les lymphocytes pro-B et les plasmablastes produisant la majeure partie des IgG circulantes, n'expriment pas tous le CD20. C'est pourquoi le rituximab n'est pas capable de prévenir complètement la production de DSA (Mei, Frölich et al.

2010). Cependant, ce traitement conjugué à d'autres traitements comme l'administration d'immunoglobulines intraveineuse (IVIG) semble apporter un effet bénéfique sur la production d'anticorps dans le rejet humoral (Fehr, Rüsi et al. 2009).

2.4.5 Les immunoglobulines intraveineuses

D'autres stratégies immunosuppressives permettent une élimination rapide des anticorps circulants comme l'injection intraveineuse d'anticorps polyclonaux. Le traitement par IVIG consiste en l'injection d'une forte dose d'IgG purifiées humaines issues de plusieurs individus sains. Bien que le mécanisme d'action de ce traitement soit mal connu, il est suggéré que l'action immunosuppressive des IVIG est liée à la fixation de celles-ci aux anticorps spécifiques du donneur entravant ainsi leur activité. Elles exercent aussi leur fonction par l'induction de mécanismes immunorégulateurs à travers la fixation des fragment Fc sur les récepteurs Fcγ présents à la surface des cellules impliquées dans la réponse immune telles que les LB, les cellules dendritiques et les macrophages (Anthony, Wermeling et al. 2008).

2.5 Lymphocytes B et tolérance en transplantation

Depuis de nombreuses années, le rôle joué par les LB en transplantation était réduit à une réponse pro-inflammatoire avec d'une part, un aspect cellulaire à travers leur capacité à stimuler les LT CD4 entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , IL-4 et IL-6 (Ron and Sprent 1987) et d'autre part, un aspect humoral avec la production de DSA dirigés contre le greffon. Néanmoins, il est de plus en plus évident que les LB n'agissent plus seulement comme des cellules effectrices de la réponse immune mais aussi comme régulateurs impliqués dans la tolérance en transplantation (Hoffman, Lakkis et al. 2016).

2.5.1 Lymphocytes B et tolérance chez l'animal

Historiquement, il était considéré que les LB n'avaient qu'un rôle délétère dans la réponse immunitaire allogénique. Aujourd'hui, plusieurs études permettent de réévaluer cette idée. Les premières expériences montrant le rôle des LB dans l'allogreffe ont été menées dans un modèle de greffe d'îlot pancréatique où l'injection de LB additionnés d'anticorps anti-CD40 afin de bloquer la costimulation LB/LT permettait la survie du greffon (Parker, Greiner et al. 1995).

Le rôle de la molécule CD40 sur les LB a également été mis en évidence dans un modèle d'allogreffe cardiaque où le transfert de LB allogéniques chez une souris receveuse CD40^{-/-} permettait de prolonger la survie de l'allogreffe (Niimi, Pearson et al. 1998).

Une autre étude récente dans un modèle murin de transplantation cardiaque tolérant montre que la déplétion des lymphocytes B par un anti-CD20 inhibe la tolérance. Dans ce modèle, le blocage de la costimulation avec un anti-CD40L entraîne l'augmentation de la production d'IL-10 par les LB précurseurs de la zone marginale mais pas dans les autres sous-populations. De plus, la déficience en IL-10 de ces cellules entraîne également une perte de la tolérance et un rejet rapide du greffon (Lal, Nakayama et al. 2015).

En 2011, il a été montré chez le rat, dans un modèle de tolérance à long terme de greffe cardiaque, une accumulation de LB au niveau du greffon avec une étroite régulation de la production de DSA, ce qui appuie l'importance des LB dans l'induction de la tolérance de greffe d'organes solides (Le Texier, Thebault et al. 2011). Dans un autre modèle de transplantation rénale allogénique chez le rat, l'injection de lymphocytes B du donneur au moment de la transplantation entraîne une tolérance à long terme du greffon avec une apparition plus rapide d'IL-10 par rapport aux rats contrôles non traités (Yan, van der Putten et al. 2002).

D'autres travaux chez la souris mettent en avant le rôle du CD45 dans l'allogreffe qui est une protéine transmembranaire impliquée dans l'activation des cellules immunitaires. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque, l'administration d'anticorps anti-CD45RB entraîne une diminution de la production d'allo-anticorps et prévient le rejet de l'allogreffe. Ces travaux montrent également que la présence de LB est indispensable dans l'induction de la tolérance induite par l'administration d'anti-CD45 et que celle-ci passe notamment par les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 ce qui suggère une coopération avec les LT (Deng, Moore et al. 2007).

Cette équipe a étendu ses recherches à un modèle de greffe d'îlot pancréatique où il est montré que le traitement combiné avec anti-CD45RB et un anti-TIM-1 a un effet synergique sur la tolérance de la greffe. Il semble également que cette tolérance soit dépendante de la présence de LB et de la sécrétion d'IL-10 (Lee, Kim et al. 2012).

D'autres travaux récents effectués dans un modèle murin de greffe d'îlot déficient en LB démontrent que le transfert adoptif de LB préalablement traités avec un anti-CD45 combiné à un anti-TIM-1 requiert la présence de Treg pour induire une tolérance. De même, il est suggéré que ces lymphocytes B induisent l'augmentation du nombre de Treg via la production de TGF- β et d'IL-10 (Lee, Stott et al. 2014).

2.5.2 Lymphocytes B et tolérance chez l'homme

◆ Signature B en transplantation

La déplétion des LB ne semble pas seulement impliquée dans l'inhibition de l'activation de LT. Il a également été observé que la déplétion de LB par Rituximab (anti-CD20) induisait une expansion des LB transitionnels lors de la reconstitution lymphocytaire (Kopchaliiska, Zachary et al. 2009). De même, des études montrent dans une cohorte de 24 patients greffés rénaux tolérants (fonction rénale stable

malgré l'absence de traitements immunosuppresseurs), une expansion de LB périphériques, de cellules NK et une absence de DSA. Une analyse par microarray chez ces patients révèle une surexpression de nombreux gènes impliqués dans les voies de signalisation de LB par rapport aux patients contrôles (Sagoo, Perucha et al. 2010). De plus, des investigations menées sur des patients tolérants opérationnels en l'absence de traitement immunosuppresseur montrent également une augmentation du nombre de lymphocytes B périphériques et de LB mémoires présentant un profil inhibiteur (expression du CD1d et CD5) comparé aux LB des patients stables sous immunosuppresseur (Pallier, Hillion et al. 2010).

Une analyse d'expression des gènes sur des lymphocytes B totaux de patients tolérants opérationnels comparée à des patients sous immunosuppresseur montre également que cette tolérance allogénique est associée à une signature lymphocytaire B avec une augmentation du nombre de LB transitionnels (Newell, Asare et al. 2010, Newell, Asare et al. 2015). Chez ces patients tolérants, il est montré qu'ils présentent un compartiment B totalement préservé avec un nombre normal de LB circulants, naïfs, mémoires et de Breg. Ces LB semblent également présenter un répertoire de BCR conservé avec la capacité d'activer le CD40 (Silva, Takenaka et al. 2012). De plus en plus d'études semblent converger vers le fait que la tolérance allogénique est étroitement supportée par la présence de lymphocytes B et plus particulièrement par les LB transitionnels décrits comme ayant des capacités régulatrices dans de nombreuses pathologies rendant ainsi obsolètes les stratégies de déplétion des LB comme traitement immunosuppresseur.

◆ **Lymphocytes B transitionnels dans la tolérance**

Des études récentes sur la GVHD chronique suggèrent que les LB transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} jouent un rôle important dans la tolérance notamment par l'inhibition de la prolifération des LT CD4 autologues et de la sécrétion d'IFN γ . En effet, il semble que la capacité des LB CD24^{hi} CD38^{hi} à sécréter de l'IL-10 soit diminuée chez les patients présentant une GVHD chronique par rapport à celle des donneurs sains (Khoder, Sarvaria et al. 2014). Récemment, il est mis en évidence chez des patients greffés rénaux tolérants opérationnels que les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} expriment un fort taux d'IL-10 et que celui-ci est corrélé à une faible expression du CD86 (Nova-Lamperti, Fanelli et al. 2016). Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de l'expression du CD86 possiblement liée au fort taux d'IL10, contribuerait à la fonction régulatrice de ces LB transitionnels.

Bien que la sécrétion d'IL-10 par les cellules transitionnelles CD24^{hi} CD38^{hi} soit identique chez les patients transplantés rénaux stables ou en rejet, le ratio IL-10/TNF α est moins important chez les patients présentant un rejet de greffe (Cherukuri, Rothstein et al. 2014). Une récente étude sur 73 patients ayant reçu une transplantation rénale montre également que l'augmentation du nombre de LB CD24^{hi} CD38^{hi} est associée à une protection contre le rejet aigu. Cependant dans cette même étude, le rôle de ces cellules dans la production de DSA ne semble pas évident (Shabir, Girdlestone et al. 2015). Egalement, une autre étude effectuée sur 98 patients transplantés rénaux montre une augmentation du nombre de CD19⁺ dans la première semaine post opération. Cependant le nombre de LB CD24^{hi} CD38^{hi} diminue jusqu'au 3^{ème} mois après transplantation avec une repopulation partielle dans la première année. Les données cliniques de ces patients montrent que le faible nombre de LB CD24^{hi} CD38^{hi} est associé à un risque plus important de rejet

(Svachova, Sekerkova et al. 2016). De plus, il a été montré sur une cohorte de 46 patients transplantés rénaux ayant reçu des inhibiteurs de calcineurine comme traitement immunosuppresseur de base, une diminution de la proportion de LB CD24^{hi} CD38^{hi}. Les résultats de cette étude montrent également que le traitement de ces patients par inhibiteurs de calcineurine inhibe la production d'IL-10 par ces cellules indépendamment des traitements additionnels (stéroïdes ou mycophénolate) et que la perte de ces cellules semble être associée avec des signes de rejet (diminution du taux de filtration glomérulaire) (Tebbe, Wilde et al. 2016).

Ces nouvelles données ne font que renforcer l'importance des Breg CD24^{hi} CD38^{hi} en transplantation d'organe solide et plus particulièrement en transplantation rénale. Il semble désormais admis que ces cellules pourraient jouer un rôle majeur dans le maintien de la fonction d'allogreffe à long terme mais également en favorisant la tolérance de l'organe greffé.

Objectif du travail de thèse

Depuis quelques décennies, de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension de la biologie des cellules régulatrices. Les plus connus sont les Treg CD4⁺ Foxp3⁺ dont le rôle dans les maladies auto-immune, le cancer ou en transplantation a été clairement établi.

Le concept de lymphocytes B régulateurs est apparu dans la littérature au milieu des années 70 mais ce n'est qu'en 2002 que ces cellules reviennent sur le devant de la scène avec les travaux de Mizoguchi. Cette étude a donné suite à de nombreux travaux démontrant l'implication de ces cellules dans diverses pathologies. Malgré toutes ces études, la caractérisation de ces cellules semble très controversée et complexe, en effet à ce jour, il n'a été mis en évidence aucun marqueur spécifique permettant d'identifier clairement cette population régulatrice chez l'homme. Aujourd'hui encore, la caractérisation commune de ces Breg est principalement liée à leur capacité à sécréter de l'IL-10.

La réponse humorale en transplantation est clairement aujourd'hui un déterminant majeur du devenir des allogreffes en particulier du fait de la présence d'anticorps anti HLA spécifique du donneur. Des données récentes suggèrent que certaines populations de LB semblent également jouer un rôle tolérogène en transplantation. Il a notamment été identifié une signature lymphocytaire B accompagnée d'une augmentation de la fréquence de cellules CD24^{hi} CD38^{hi} spécifiquement chez des patients transplantés présentant une fonction du greffon stable en absence complète de traitement immunosuppresseur. De plus, il a été rapporté une corrélation entre la diminution de la fréquence de ces cellules et un risque accru de perte du greffon. D'autre part, de précédents travaux au laboratoire ont récemment montré chez des

patients transplantés traités par un nouvel agent immunosuppresseur : le Belatacept, d'une part, une diminution significative du nombre de patients développant des DSA et d'autre part, une augmentation de la proportion des cellules CD24^{hi} CD38^{hi} par rapport à des patients traités avec un immunosuppresseur classique (cyclosporine). De façon intéressante, ces cellules ont été décrites comme ayant une activité immunosuppressive à travers la sécrétion d'IL-10. Prises ensemble, ces données convergent vers l'hypothèse d'un possible rôle tolérogène de ces cellules en transplantation d'organe et ouvrent la voie vers une utilisation potentielle de celles-ci pour une meilleure appréhension et un meilleur contrôle de la réponse immune en transplantation.

Dans cette optique, l'objectif de ce projet est avant tout d'améliorer la caractérisation phénotypique de ces lymphocytes B régulateurs et de comprendre leurs mécanismes d'action. En effet comme mentionné dans l'introduction, les preuves de la capacité à contrôler la réponse immune de ces cellules notamment dans les maladies auto-immunes et en transplantation ne sont plus contestables. Cependant, la méconnaissance des mécanismes impliqués et l'absence de marqueurs spécifiques comme le facteur de transcription Foxp3 pour les Treg restent un frein pour leur utilisation en thérapie cellulaire. La compréhension des mécanismes mis en jeu et l'utilisation de ces biomarqueurs seraient également d'une grande aide pour le monitoring immunologique de la réponse humorale en transplantation d'organe et l'adaptation de l'immunosuppression à la nature de cette réponse.

RESULTATS

1 Article : Signature transcriptomique des cellules transitionnelles CD24^{hi} CD38^{hi} associée à un phénotype régulateur chez des patients greffés rénaux

Auteurs : Bigot J^{*}, Pilon C^{*}, Matignon M, Grondin C, Leibler C, Aissat A, Pirenne F
Cohen JL, Grimbert P

Publié dans American Journal of Transplantation.

Résumé de l'article

Chez l'homme, le rôle des lymphocytes B régulateurs producteurs d'IL-10 a été mis en évidence dans plusieurs pathologies notamment chez les patients atteints de maladies auto-immunes. En transplantation rénale, le rôle de ces lymphocytes B dans la tolérance du greffon semble avoir une implication majeure. En effet, il a été récemment observé une proportion plus importante de cellules CD24^{hi} CD38^{hi} chez les patients stables sans aucun traitement immunosuppresseur et chez les patients traités par belatacept présentant une incidence des DSA significativement plus faible par rapport à des patients traités sous cyclosporine. Cependant, la caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules reste exhaustive et très controversée. C'est pourquoi nous avons réalisé une analyse transcriptomique et phénotypique comparative de la population lymphocytaire B CD24^{hi} CD38^{hi}, les cellules CD24^{int} CD38^{int}, CD24⁺CD38⁻ servant de contrôle.

Cette analyse révèle une signature spécifique de la population CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant préférentiellement les marqueurs CD9, CD10, CD5, ICOS-L (inducible T cell co-stimulator ligand), GARP (glycoprotein-A repetitions predominant protein) et CD1b. Dans cette étude, nous mettons en évidence un enrichissement en LB IL-10⁺ parmi les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant ICOS-L et CD1b. Nous montrons

également que les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant CD1b présentent des capacités suppressives. Or, ces dernières sont également surreprésentées chez les patients traités par belatacept présentant un meilleur pronostic du greffon. Bien qu'une association directe de ces marqueurs avec une fonction régulatrice en clinique reste à établir, ceux-ci pourraient permettre d'une part une meilleure compréhension des mécanismes immunorégulateurs mis en jeu et d'autre part d'améliorer l'immunomonitoring des patients en transplantation.

Transcriptomic Signature of the CD24^{hi}CD38^{hi} Transitional B Cells Associated With an Immunoregulatory Phenotype in Renal Transplant Recipients

J. Bigot^{1,2,†}, C. Pilon^{1,2,3,†}, M. Matignon^{1,2,4},
C. Grondin^{1,2}, C. Leibler^{1,2,4}, A. Aissat^{1,5,6},
F. Pirenne^{1,7,8}, J. L. Cohen^{1,2,3} and
P. Grimbert^{1,2,3,4,*}

¹Université Paris-Est Créteil, Faculté de Médecine, Créteil, France

²Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), INSERM U955, Equipe 21, Créteil, France

³AP-HP, Groupe Hospitalier Henri-Mondor Albert-Chenevier, CIC-BT-504, Créteil, France

⁴AP-HP, Groupe Hospitalier Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service de Néphrologie, Créteil, France

⁵Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), INSERM U955, Equipe 5, Créteil, France

⁶AP-HP, Groupe Hospitalier Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service Hospitalier, Créteil, France

⁷Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), INSERM U955, Equipe 2, Créteil, France

⁸Etablissement Français du Sang, Ile-de-France Mondor, Créteil, France

*Corresponding author: Philippe Grimbert,

philippe.grimbert@aphp.fr

[†]Co-first authors.

The role of B cells after transplant regarding allograft rejection or tolerance has become a topic of major interest. Recently, in renal transplant recipients, a B cell signature characterized by the overexpression of CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} transitional B cells has been observed in operationally tolerant patients and in belatacept-treated patients with significantly lower incidence of donor-specific antibodies. The phenotypic and functional characterization of these transitional B cells is far from exhaustive. We present the first transcriptomic and phenotypic analysis associated with this cell phenotype. Three populations were studied and compared: (i) transitional CD24^{hi}CD38^{hi}, (ii) CD24⁺CD38⁻, and (iii) CD24^{int}CD38^{int} B cells. Transcriptome bioinformatic analysis revealed a particular signature for the CD24^{hi}CD38^{hi} population. Phenotypic analysis showed that CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells also expressed CD9, CD10, CD1b and inducible T cell costimulator ligand (ICOS-L) markers. In addition, we found enrichment of IL-10⁺ cells among CD24^{hi}CD38^{hi} cells expressing ICOS-L and CD1b, the latter showing regulatory properties. Renal transplant recipients

treated with belatacept exhibited significant expression of CD1b. Our results show that transitional CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit a distinct and specific profile, and this could be helpful for understanding of immune-regulatory mechanisms and immune monitoring in the field of organ transplant and autoimmune disease.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; APC, allophycocyanin; BLIMP-1, B lymphocyte-induced maturation protein 1; Breg, regulatory B cell; cDNA, complementary DNA; CNI, calcineurin inhibitor; DSA, donor-specific antibody; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GARP, glutamic acid/alanine-rich protein; ICOS-L, inducible T cell costimulator ligand; IFN- γ , interferon γ ; mRNA, messenger RNA; NCBI, National Center for Biotechnology Information; NKT, NK T cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; Treg, regulatory T cell

Received 24 December 2015, revised 25 May 2016 and accepted for publication 27 May 2016

Introduction

All cells involved in acquired alloimmune response are likely to contribute to the destruction of a solid engrafted organ; however, it is well established that a subset of this population, regulatory cells, may also contribute to improvement of allograft outcome by controlling inflammation and promoting immunological tolerance (1). The role of the B cell-mediated alloimmune response has been highlighted recently in the field of solid organ transplant (2). The production of donor-specific antibodies (DSAs) after transplantation is involved in both acute and chronic allograft injury and in allograft loss (3,4). In contrast, recent data have suggested that B cells could play a role in operational tolerance (5). A B cell signature has been identified in two distinct cohorts of tolerant kidney transplant recipients (without any immunosuppressive maintenance therapy) (6,7) and includes an increase in naive and transitional B cells and a deficiency in

Bigot et al

CD19⁺CD38⁺CD138⁺ plasma cells compared with kidney transplant recipients with stable graft function (with immunosuppressive maintenance therapy) or with biopsy-proven chronic rejection. Moreover, B cells from operationally tolerant patients proliferate normally but secrete increased levels of IL-10 compared with patients with stable allograft function (8).

Interestingly, we and others recently showed that the frequency and the absolute numbers of transitional CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells were significantly higher in kidney transplant recipients treated with belatacept (inhibitor of CD80/CD86 and CD28 interaction) than in patients treated with calcineurin inhibitor (CNI)-based immunosuppression (9,10). These results are important because long-term extension trials reported that belatacept-treated kidney transplant recipients presented significantly lower incidence of *de novo* DSAs than that observed in CNI-treated recipients (11). These data suggest that the emergence of this transitional B cell subset could be associated with a rather tolerogenic clinical phenotype.

In humans, a B cell population defined by the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} phenotype is a main B cell subset with regulatory properties, commonly called regulatory B cells (Bregs) (11,12). Those cells secrete substantial amounts of IL-10 and are functionally impaired in patients with autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus (13). Other Breg subsets have been identified including the memory-related marker CD27 (14) and CD5^{hi} (15). Phenotypic characterization of these cells faces several problems including (i) a lack of consistency in the expression of surface markers on these cells, (ii) the absence of a specific marker, and (iii) limited access to human lymphoid tissues; mouse studies suggest that the majority of these cells exist within the nonmigratory splenic population (12). Finally, the common feature associated with many human Breg populations is their ability to produce IL-10, but it remains a limiting factor because only 15% of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells secrete IL-10 after stimulation (13). The first transcriptomic analysis performed in human IL-10⁺ and IL-10⁻ B cells revealed only 0.7% of genes differentially expressed between populations (16). Consequently, both phenotypic and functional characterization of these B cell subsets is far from complete. This limits both immunomonitoring and our understanding of the immune mechanisms involved in the regulatory process.

To improve phenotypic characterization and to better define the signaling pathway involved in human Bregs from healthy volunteers, we present the results of the microarray analysis performed in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. Controls consisted of both CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} and CD19⁺CD24⁺CD38⁻ B cells. Using microarray and flow cytometry, we showed a distinct signature of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, and we presented new

associated markers to improve characterization of these cells. Moreover, for the first time in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, we highlighted the association between CD1b and inducible T cell costimulator ligand (ICOS-L) expression and the better expression of IL-10. We also showed that CD24^{hi}CD38^{hi} CD1b⁺ cells had a better capacity for repressing interferon γ (IFN- γ) secretion by effector cells.

Materials and Methods

Human cell isolation and cell culture

Peripheral blood was obtained from the Etablissement Français du Sang (Créteil, France) from healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with lymphocyte separation medium (Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France) and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with 3% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific). Total B cells from freshly isolated PBMCs were purified by positive selection using human CD20 microbeads for magnetic cell separation (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Flow cytometry analysis of isolated B cells showed purity >95%. Sorted B cell subpopulations were cultured in 96-well plates at 5×10^5 cells per milliliter in complete medium (RPMI 1640+ Glutamax with 10% FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin, 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid [HEPES, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific] and 50 mM β -mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO]). Sorted B cells were stimulated for 24 h with or without 10 μ g/mL CpG ODN 2006 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) and 100 ng/mL soluble human MCD40L (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). For IL-10 cytoplasmic detection, GolgiPlug (BD Biosciences, San Jose, CA) was added for the last 4 h of incubation with 1 μ g/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 0.5 μ g/mL ionomycin (Sigma-Aldrich). For B cell subset cytokine secretion, PMA and ionomycin were added for the last 4 h. Supernatant was collected, and cytokine assays were performed using ProcartaPlex human multiplex immunoassays (Affymetrix, eBioscience; Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions.

Kidney transplant recipients

Twelve first-kidney recipients with stable renal function took part in the study and gave written informed consent. Participants included (i) patients treated with belatacept, mycophenolate mofetil and steroids (n = 6; belatacept group) and (ii) patients treated with CNIs and/or mycophenolate mofetil and/or steroids (n = 6; CNI group). Induction therapy consisted of either thymoglobulin or basiliximab. All patients had stable renal function (creatinine <200 μ M/L), nonsignificant proteinuria (<0.5 g/24 h) and no acute rejection within the year before inclusion. The last annual DSA screening was negative for all patients. Mean time between transplantation and sample analysis was 52 mo.

Flow cytometry and cell sorting

PBMCs, enriched B cells or postsorting B cell subsets were stained with various mAb combinations for 20 min at 4°C in staining buffer (PBS with 3% FBS). The directly conjugated mAbs used were anti-CD19-V500, anti-CD24-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD25-allophycocyanin (APC), anti-CD58-phycoerythrin (PE), anti-ICOS-L-FITC, anti-CD38-PE-Cy7, anti-CD9-PE and anti-HLA-PerCP-5,5 (BD Biosciences); anti-CD1b-V450, anti-CD5-V450, anti-CD10-FITC and anti-CD163-APC (Miltenyi Biotec); anti-glutamic acid/alanine-rich protein (GARP)-PE (BioLegend, San Diego, CA); and anti-CD27-eFluor450, anti-IgD-PerCP-eFluor710 and anti-IgM-APC (eBioscience; Thermo Fisher Scientific). For intracellular staining, cells were washed, fixed and permeabilized with the Cytofix/Cytoperm Plus kit

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

(BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Cells were stained for 30 min at 4°C with anti-IL-10-PE (Miltenyi Biotec) and anti-IFN-γ-PE (BD Biosciences). Samples were analyzed with a Canto II cytometer (BD Biosciences), and data were processed using FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR). B cell subpopulations were sorted using the MoFlo cell cytometry sorter (Beckman Coulter, Brea, CA) with CD19, CD24 and CD38 markers.

Coculture assays

Sorted B cells were stimulated for 24 h with 10 μg/mL CpG ODN 2006 and 100 ng/mL soluble human MCD40L. Next, sorted B cells were cocultured with autologous B cell-depleted PBMCs at 1:2 in plate-bound CD3 mAbs (0.5 μg/mL) for 72 h. IFN-γ secretion in supernatant was measured using human enzyme-linked immunosorbent assay DuoSet kits (R&D Systems, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's instructions.

Transcriptomic analysis: Sorted B cells were obtained as described. Three different B cell populations were obtained from five participants (15 samples). One of the cell types has a regulatory phenotype CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (test), and the other two represent closely related B cell populations without regulatory properties: CD19⁺CD24⁺CD38⁻ (control 1) and CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} (control 2). Amplification of total RNAs extracted from these cell subsets was required, given the low numbers of cells per sample (1 × 10⁴ cells), using μMACS SuperAmp (Miltenyi Biotec). Fifteen microarray data sets were obtained from hybridization of the amplified RNAs on Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8×60K v2 (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. The bioinformatics analyses were performed as described below. The raw data are under submission in Gene Expression Omnibus.

Discriminatory gene analysis: After background correction, raw intensities were quantile normalized. Analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was applied on the normalized log² intensity data to distinguish expression differences between the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} and CD19⁺CD24⁺CD38⁻ or CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} sample groups for each reporter. Tukey *post hoc* tests were applied to obtain p-values for the comparison between two sample groups. Statistically significant expression differences were selected by a Tukey p-value ≤0.05 and an expression difference of at least twofold (this corresponds to the log² ratio ≤-1 or ≥1). All calculations were performed using Genespring GX software (version 12.1; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) or R/Bioconductor (R version 3.0.1 [May 16, 2013]; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Results of discriminatory gene analysis are available in the supplementary data (Data S1).

Gene ontologies and pathways: All gene ontologies were added using both the DAVID bioinformatics resources 6.7 (17) and Genespring GX software version 12.1. Relevant biological and functional pathways were also highlighted with both tools. Hierarchical clustering, with euclidean distance and centroid linkage, and heat maps were drawn using R/Bioconductor and Genespring GX software version 12.1.

RNA isolation, preamplification, and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Expression levels of 14 genes were analyzed using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Messenger RNA (mRNA) was extracted from 2 × 10⁵ sorted B cells from healthy donors using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The mRNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied

Biosystems, Foster City, CA). A pool TaqMan assay mix was prepared for running the preamplification reaction. The preamplification PCR was realized with 20 ng of cDNA and 10 preamplification cycles (TaqMan Pre-amp Master Mix Kit, Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Finally, real-time PCR was performed with 2 ng of diluted preamplified cDNA per gene. All primers and probe sets were provided by Applied Biosystems: *HPRT1*: Hs99999909_m1; *ADAM23*: Hs00187022_m1; *CMTM8*: Hs00418243_m1; *HRK*: Hs02621354_s1; *MME*: Hs00153510_m1; *PKD2*: Hs00165517_m1; *TNFRSF21*: Hs01560899_m1; *IL2RA*: Hs00907779_m1; *CD58*: Hs00156385_m1; *CD79A*: Hs00998119_m1; *LRRRC32*: Hs00194136_m1; *CD9*: Hs00233521_m1; *ICOSLG*: Hs00323621_m1; *TCL1A*: Hs00951350_m1. We used the 2^{-ΔΔct} method to determine relative expression of RNAs between a sample and a reference. All samples were tested in duplicate in 96-well plates with the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). *HPRT1* was used as an endogenous control to normalize RNA amounts.

Statistical analysis

Data are shown as mean values with standard deviation or medians with interquartile range, depending on data distribution. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical analyses were adapted to data distribution (one-way ANOVA, Mann-Whitney test, and unpaired or paired t-test). Multiple correspondence analysis was performed for patient groups (belatacept vs. CNI) using R software. A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Transitional CD24^{hi}CD38^{hi} subset displayed a distinct gene expression profile

To better distinguish B cell subsets using transcriptomic and phenotypic analysis, we confirmed that after *in vitro* activation, B cells producing IL-10 appeared mainly in the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transitional population compared with naive CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} and memory CD19⁺CD24⁺CD38⁻ B cells (Figure S1B), in accordance with data in the literature. Moreover, these three B cell subsets were also able to produce cytokines such as IFN-γ and IL-6; however, consistent with their potential regulatory function, proinflammatory cytokines such as IL-1α, IL-1β and tumor necrosis factor β were significantly reduced in the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} subset (Figure S1C).

To improve characterization of the CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, we compared microarray analysis between CD24^{hi}CD38^{hi} B cells and two other control subsets: CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻. We used sorted unstimulated B cells (purity of cell sorting is shown in Figure S2) from five healthy donors to ensure that their phenotypes and functions were not modified by *in vitro* stimulation. Heat maps showed a proper signature of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells (Figure 1A) with 1127 genes differentially expressed (fold change ≥2); among those, 338 were upregulated and 789 were downregulated compared with both control B cell subsets (Figure 1B). The top 10 upregulated and downregulated genes are shown in Tables 1 and 2. Forty genes were totally repressed in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, and 12 genes were exclusively expressed in the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cell

Bigot et al

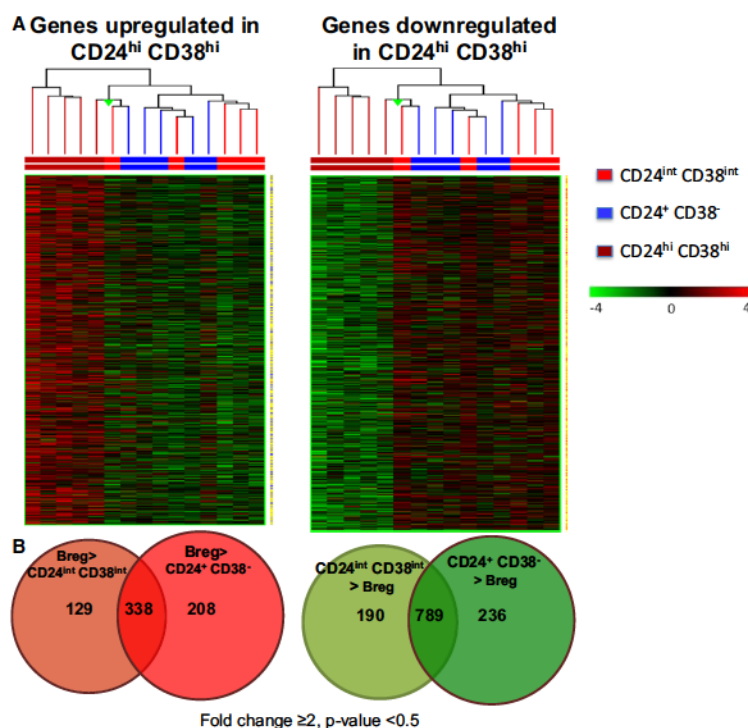


Figure 1: Microarray analyses of gene expression of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells show a distinct signature in comparison to other B cell subsets. (A) Bioinformatics analysis of 15 microarray data sets obtained from hybridization of human RNAs from sorted CD24^{hi}CD38^{hi}, CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ B cell subset populations from five participants, performed on Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8×60K v2. (A) A heat map represents upregulated and downregulated genes between CD24^{hi}CD38^{hi}, CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ B cells. Fold change ≥2, p-values <0.05. (B) Venn diagrams show the number of genes significantly different from the other populations. Breg, regulatory B cell.

subset compared with both control populations (Figure S3). Gene ontology analysis showed that modification of DNA and regulation of cell cycle seemed to be the overexpressed pathways, and apoptosis and positive regulation of the lymphocyte population were the repressed pathways (Table S1).

To validate the microarray transcriptional analysis, we performed reverse transcription-qPCR in five other healthy donors. Genes were selected (11 upregulated and two downregulated) based on two main criteria: First, they were all upregulated or downregulated in CD24^{hi}CD38^{hi} versus both control populations (CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ cells) or were exclusively expressed in CD24^{hi}CD38^{hi} (*ADAM23*, *CMTM8*, *PKD2*, *TNFRSF21*, *HRK*), and second, their functional property (transcription factor, cell surface marker) may allow us to better understand the mechanisms of action of these regulatory cells and facilitates their immunomonitoring (*IL2RA*, *CD58*, *ICOSL*, *MME [CD10]*, *CD79a*, *CD9*, *GARP*). Another gene detected in other transcriptomic analysis (*TCL1A*) (18) has been added (Table 3). We

confirmed higher expression of genes involved in B cell activation and differentiation genes (e.g. *CD79a*, *MME [CD10]*, *ICOS-L*, *TNFRSF21*, *CD1b*) as well as genes involved in B cell function and migration (e.g. *ADAM23*, *CD9*, *GARP*) in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells (Figure 2). We also observed downregulation of *IL2RA* (CD25) and *CD58* in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells.

Novel surface markers for better characterization of human transitional B cells

Because transitional B cells are probably responsible in part for recipient tolerance after kidney transplant, we investigated how to improve the clinical monitoring of these cells using surface markers by flow cytometry (gating strategy is demonstrated in Figure S4). Markers were chosen according to microarray analysis and qPCR validation and based on common Breg-associated molecules described earlier. We confirmed a significantly higher proportion of metalloprotease CD9 and CD10 in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells compared with the CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ populations (CD9: 82.16 ± 5.13% vs. 19.17 ± 6.79% vs. 11.09 ± 5.04%,

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

Table 1: Top 10 genes found to be significantly upregulated and downregulated in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} cells compared with CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} cells (control 1)

Gene symbol	NCBI/Ensembl accession number	Fold change	Description
Upregulated genes			
<i>HRK</i>	ENST00000257572	109.32	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
<i>CLEC4C</i>	NM_130441	85.01	C-type lectin domain family 4, member C, transcript variant 1
<i>ADAM23</i>	NM_003812	81.99	ADAM metallopeptidase domain 23
<i>GNG3</i>	NM_012202	44.79	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
<i>AEBP1</i>	NM_001129	24.23	AE binding protein 1
<i>TNFRSF21</i>	NM_014452	23.73	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
<i>E2F2</i>	NM_004091	20.32	E2F transcription factor 2
<i>SOX4</i>	NM_003107	19.59	SRY (sex determining region Y)-box 4
<i>BMP3</i>	NM_001201	18.17	Bone morphogenetic protein 3
<i>MME</i>	NM_007289	14.66	Membrane metallo-endopeptidase, transcript variant 2b, mRNA
Downregulated genes			
<i>IL2RA</i>	NM_000417	-34.22	Interleukin 2 receptor, alpha
<i>SOBP</i>	NM_018013	-31.62	Sine oculis binding protein homolog (Drosophila)
<i>PLAG1</i>	NM_002655	-21.06	Pleiomorphic adenoma gene 1 (PLAG1), transcript variant 1
<i>ANK3</i>	NM_001204404	-19.87	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G), transcript variant 4
<i>DHRS13</i>	NM_144683	-19.31	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13
<i>ESR2</i>	NM_001437	-18.70	Estrogen receptor 2 (ER beta), transcript variant a
<i>POU6F1</i>	NM_002702	-16.98	POU class 6 homeobox 1, transcript variant 1
<i>MDS2</i>	NR_027042	-16.74	Myelodysplastic syndrome 2 translocation associated, long non-coding RNA
<i>PCGF2</i>	NM_007144	-15.62	Polycomb group ring finger 2
<i>SYN3</i>	NM_133633	-14.21	Synapsin III, transcript variant IIIc, mRNA

mRNA, messenger RNA; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

Table 2: Top 10 genes found to be significantly upregulated and downregulated in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} cells compared with CD19⁺CD24⁺CD38⁻ cells (control 2)

Gene symbol	NCBI/Ensembl accession number	Fold change	Description
Upregulated genes			
<i>ADAM23</i>	NM_003812	279.79	ADAM metallopeptidase domain 23, mRNA
<i>TCL6</i>	NR_028288	39.71	T cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding), long noncoding RNA
<i>SOX4</i>	NM_003107	39.59	SRY (sex determining region Y)-box 4, mRNA
<i>CD38</i>	NM_001775	38.67	CD38 molecule, mRNA
<i>TCL6</i>	NR_028288	34.68	T cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding), long noncoding RNA
<i>CD9</i>	NM_001769	29.17	CD9 molecule, mRNA
<i>CLEC4C</i>	NM_130441	28.13	C-type lectin domain family 4, member C, transcript variant 1, mRNA
<i>CORO2B</i>	NM_006091	27.62	Coronin, actin binding protein, 2B, transcript variant 1, mRNA
<i>CDK6</i>	NM_001259	24.25	Cyclin-dependent kinase 6, transcript variant 1, mRNA
<i>TNFRSF21</i>	NM_014452	21.57	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21, mRNA
Downregulated genes			
<i>IL2RA</i>	NM_000417	-49.33	Interleukin 2 receptor, alpha, mRNA
<i>ANK3</i>	NM_001204404	-43.69	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G), transcript variant 4, mRNA
<i>PPFIBP2</i>	NM_003621	-36.52	PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2), transcript variant 1, mRNA
<i>ESR2</i>	NM_001437	-35.17	Estrogen receptor 2 (ER beta), transcript variant a, mRNA
<i>ANO9</i>	NM_001012302	-29.38	Anoctamin 9, mRNA
<i>BHLHE41</i>	NM_030762	-26.04	Basic helix-loop-helix family, member e41, mRNA
<i>POU6F1</i>	NM_002702	-21.87	POU class 6 homeobox 1, transcript variant 1, mRNA
<i>ESR2</i>	NM_001271877	-21.64	Estrogen receptor 2 (ER beta), transcript variant g, mRNA
<i>MIAT</i>	NR_033319	-19.13	Myocardial infarction associated transcript (non-protein coding), transcript variant 2, long noncoding RNA
<i>PVT1</i>	NR_003367	-18.76	Pvt1 oncogene (non-protein coding), long noncoding RNA

mRNA, messenger RNA; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

Bigot et al

Table 3: Selected genes for quantitative polymerase chain reaction confirmation of transcriptomic analysis

Gene	Other names	Description	Fold change versus control 1	Fold change versus control 2
ADAM23	MDC-3	ADAM metallopeptidase domain 23	82.00	279.79
TNFRSF21	DR6, CD358	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	23.73	21.57
CD9	MIC3, p24	CD9 molecule	14.51	29.17
MME	CD10	Membrane metallo-endopeptidase	14.66	14.07
HRK	DP5	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	16.82	11.79
TCL1A		T cell leukemia/lymphoma 1A	3.53	16.21
LRRC32	GARP	Leucine-rich repeat containing 32	6.11	8.02
PKD2		Polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	5.71	6.64
CMTM8		CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	3.13	5.32
ICOSLG	B7-H2	Inducible T cell costimulator ligand	2.17	2.57
IL2RA	CD25	Interleukin 2 receptor, alpha	-34.22	-49.33
CD79A	MB-1	B cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain	-	-
CD58	LFA-3	CD58 molecule	-2.32	-8.19

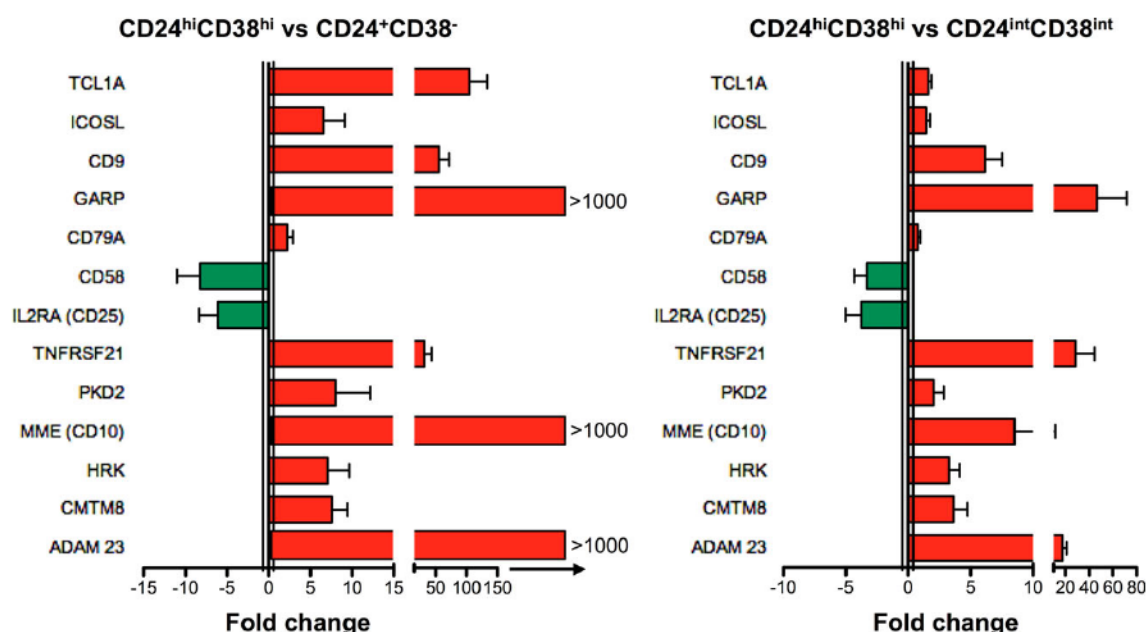


Figure 2: Distinct CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cell profile validation by qRT-PCR. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors are enriched in CD20⁺ B cells (>95%), and three populations were sorted on CD19, CD24, and CD38 clusters. RNA was prepared from a cell-sorted population, and gene expression was quantified by qPCR (2^{-ΔΔCt} method) in five healthy participants. qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

respectively; CD10: 53.61 ± 16.92% vs. 5.77 ± 5.19% vs. 6.01 ± 5.77%, respectively) (Figure 3A). CD1b and IgD, two molecules with roles in cellular activation, were also significantly overexpressed in transitional CD24^{hi}CD38^{hi} B cells (CD1b: 7.43 ± 2.73% vs. 1.93 ± 0.72% vs. 3.15 ± 1.1%, respectively; IgD: 96.4 ± 1.36% in CD24^{hi}CD38^{hi} vs. 59.1 ± 7.9% in CD24⁺CD38⁻). Furthermore, CD24^{hi}CD38^{hi} B cells showed a significantly higher proportion of GARP compared with

CD24^{int}CD38^{int} (11.7 ± 3.97 vs. 2.46 ± 1.26); GARP is known to bind TGF-β, leading to positive regulation of regulatory T cells (Tregs) (19). CD24^{hi}CD38^{hi} B cells also showed upregulation of ICOS-L compared with control groups CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ (7.72 ± 6.44% vs. 1.90 ± 0.72% vs. 2.20 ± 1.67% respectively); ICOS-L promotes cytokine secretion in accordance with the better potential of these cells to produce IL-10. Additional Breg-associated molecule analysis

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

showed that Bregs had significant upregulation of CD5, described as a major marker of mouse Bregs (20). Although molecules involved in antigen recognition and presentation such as IgM, HLA-DR and CD79a were present on most of these B cell subsets, we observed significantly higher expression of IgM and CD79a markers for CD24^{hi}CD38^{hi} B cells (Figure 3B). We also observed an absence of CD27 memory marker expression as well as CD25 in transitional immature populations (Figure 3A). Significantly different surface marker expression in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} from the two other populations is presented in Figure S5. The phenotypic flow cytometry analysis underscores that some markers are differently expressed in the CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. Those markers could be helpful in immunomonitoring of kidney transplant recipients.

CD1b and ICOS-L improved human IL-10⁺ Breg monitoring

To define which membrane markers could be associated with IL-10 expression, we studied the expression of the previously identified molecules on IL-10⁺ B cells after stimulation for 48 h of total B cells with CpG and MCD40L (gating strategy is demonstrated in Figure S6). CD1b, GARP, CD9, CD10, ICOS-L and CD5 were significantly overexpressed on IL-10⁺ B cells compared with IL-10⁻ B cells (Figure 4). Next we preselected cells with one of these markers, as shown in Figure S6. We observed a significant increase of IL-10 mean fluorescence intensity in CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ (fold increase 1.48 ± 0.14) and CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁺ (fold increase 1.42 ± 0.18) compared with the whole CD24^{hi}CD38^{hi} population (Figure 5A). We also showed a trend in

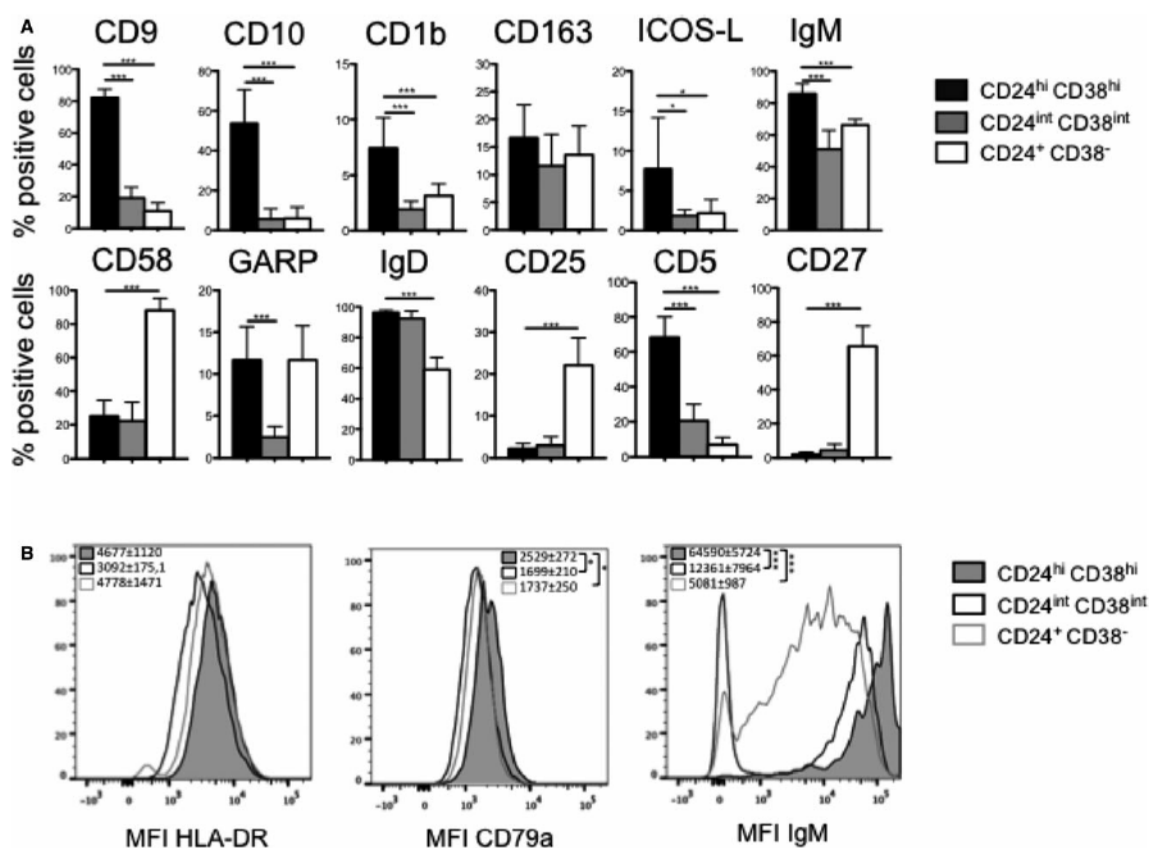


Figure 3: Surface markers expressed by regulatory B cells. B cells from healthy donors were isolated and gated on CD24^{hi}CD38^{hi}, CD24^{int}CD38^{int}, and CD24⁺CD38⁻ phenotypes. (A) Surface expression marker flow cytometry analysis of CD24^{hi}CD38^{hi} B cell population (black) compared with CD24^{int}CD38^{int} (gray) and CD24⁺CD38⁻ (white) populations. (B) Overlay histogram of the expression of HLA-DR, CD79a, and IgM by CD24^{hi}CD38^{hi} (dark gray) and CD24^{int}CD38^{int} (light gray) and CD24⁺CD38⁻ (black). Results are expressed as mean with standard deviation and were compared with one-way analysis of variance; p-values are indicated when differences between two groups are statistically significant (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). Data are representative of at least five healthy donors. GARP, glutamic acid/alanine-rich protein; ICOS-L, inducible T cell costimulator ligand.

Bigot et al

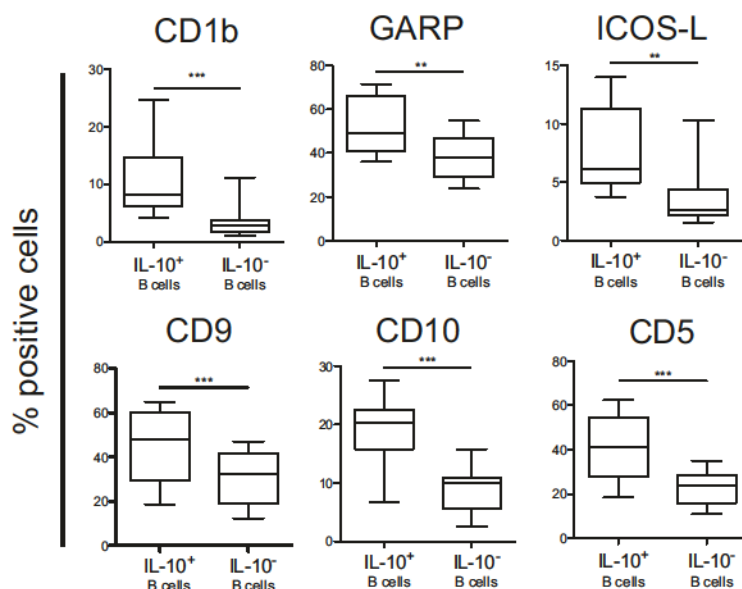


Figure 4: Characterization of human IL-10⁺ and IL-10⁻ B cells. B cells from healthy donors were harvested 48 h with CpG and MCD40L. (A) Box plot showing percentage of positive cells for surface markers CD9, CD10, CD5, CD1b, ICOS-L, and GARP between IL-10⁺ and IL-10⁻ B cells. Results were compared with paired t-test analysis (**p < 0.01; ***p < 0.001). Data are representative of at least six healthy donors. GARP, glutamic acid/alanine-rich protein; ICOS-L, inducible T cell costimulator ligand.

increased IL-10 production for CD24^{hi}CD38^{hi}CD5⁺, but we did not observe significant differences in CD9, CD10 and GARP markers. Finally, we found significant enrichment in IL-10⁺ B cell percentages not only in the CD24^{hi}CD38^{hi}CD5⁺ Bregs already described in mice but also in CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ and CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁺ B cells (Figure 5B), confirming the reliability of CD1b and ICOS-L as markers to improve human IL-10⁺ Breg characterization.

CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ B cells exhibited better regulatory function

To evaluate the suppressive function of these cells, we cocultured CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺, CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁻, CD24^{int}CD38^{int}, and CD24⁺CD38⁻ B cells sorted from healthy donors with stimulated autologous B cell-depleted PBMCs for 72 h. The results showed that CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ B cells had a better capacity to inhibit IFN-γ secretion by effector cells compared with CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁻ B cells and other B cell subsets (Figure 5C). In contrast, we could not efficiently distinguish CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁺ from CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁻ B cells, limiting any further coculture experiment (Figure S4); therefore, the functional data regarding the CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁺ subset are limited to only IL-10 expression.

Allgraft kidney recipients treated with belatacept exhibited a higher proportion of CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ B cells

The last step of our work was a comparison between kidney allograft recipients with maintenance immunosuppression

based on belatacept (belatacept group; n = 6) and CNIs (CNI group; n = 6). Both groups were similar in terms of demographic, clinical and renal transplant characteristics. Multivariate analysis did not show a statistical difference between the groups regarding other immunosuppressive treatments (p = 0.72) (Table S2). The belatacept group exhibited a significantly higher proportion of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells and CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ cells compared with the CNI group (p = 0.008 and p = 0.002, respectively) (Figures 6A and B); however, the proportions of ICOS-L⁺ B cells were similar in both groups (p = 0.69) (Figure 6B). In addition, we characterized the capacity of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells in the belatacept and CNI groups to express IL-10 after 24 h of simulation with CpG and MCD40L. We observed that belatacept-treated patients had a higher proportion of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ B cells in peripheral blood (p = 0.03) (Figure 6C).

Discussion

We provided the first transcriptomic analysis of peripheral human CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. Compared with both CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ B cells, our results showed that CD24^{hi}CD38^{hi} B cells presented a specific transcriptomic signature and expressed a high level of genes involved in modification of DNA and regulation of cell cycle as well as repression of genes involved in apoptosis and positive regulation of lymphocyte

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

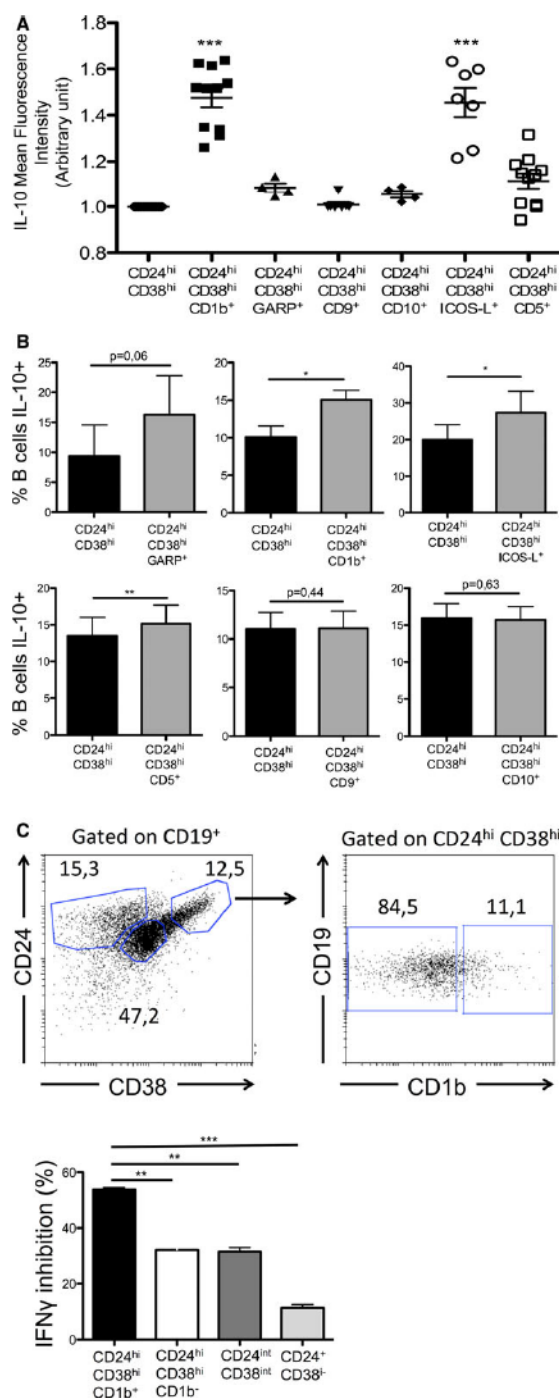


Figure 5: CD1b and ICOS-L improve phenotypic monitoring of human IL-10⁺ Bregs. Purified B cells from healthy donors were activated for 48 h with CpG and MCD40L. (A) IL-10 mean fluorescence intensity was determined on CD24^{hi}CD38^{hi} B cells with a different gating strategy including CD1b, GARP, CD9, CD10, ICOS-L, and CD5 markers. Each value was standardized on CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs. Results were compared with one-way ANOVA, and p-values are indicated when differences with CD24^{hi}CD38^{hi} were statistically significant (***p < 0.001) (B) Percentage of IL-10⁺-secreting B cells with a different gating strategy. Results were compared with paired t-test analysis (*p < 0.05; **p < 0.01). (C) Bar graph shows inhibition of IFN- γ secretion by B cell-depleted peripheral blood mononuclear cells after 3 days of coculture with different B cell subsets from two healthy donors. Results were compared with one-way ANOVA, and p-values are indicated when differences between the two groups were statistically significant (**p < 0.01; ***p < 0.001). ANOVA, analysis of variance; Breg, regulatory B cell; GARP, glutamic acid/alanine-rich protein; ICOS-L, inducible T cell costimulator ligand; IFN- γ , interferon γ .

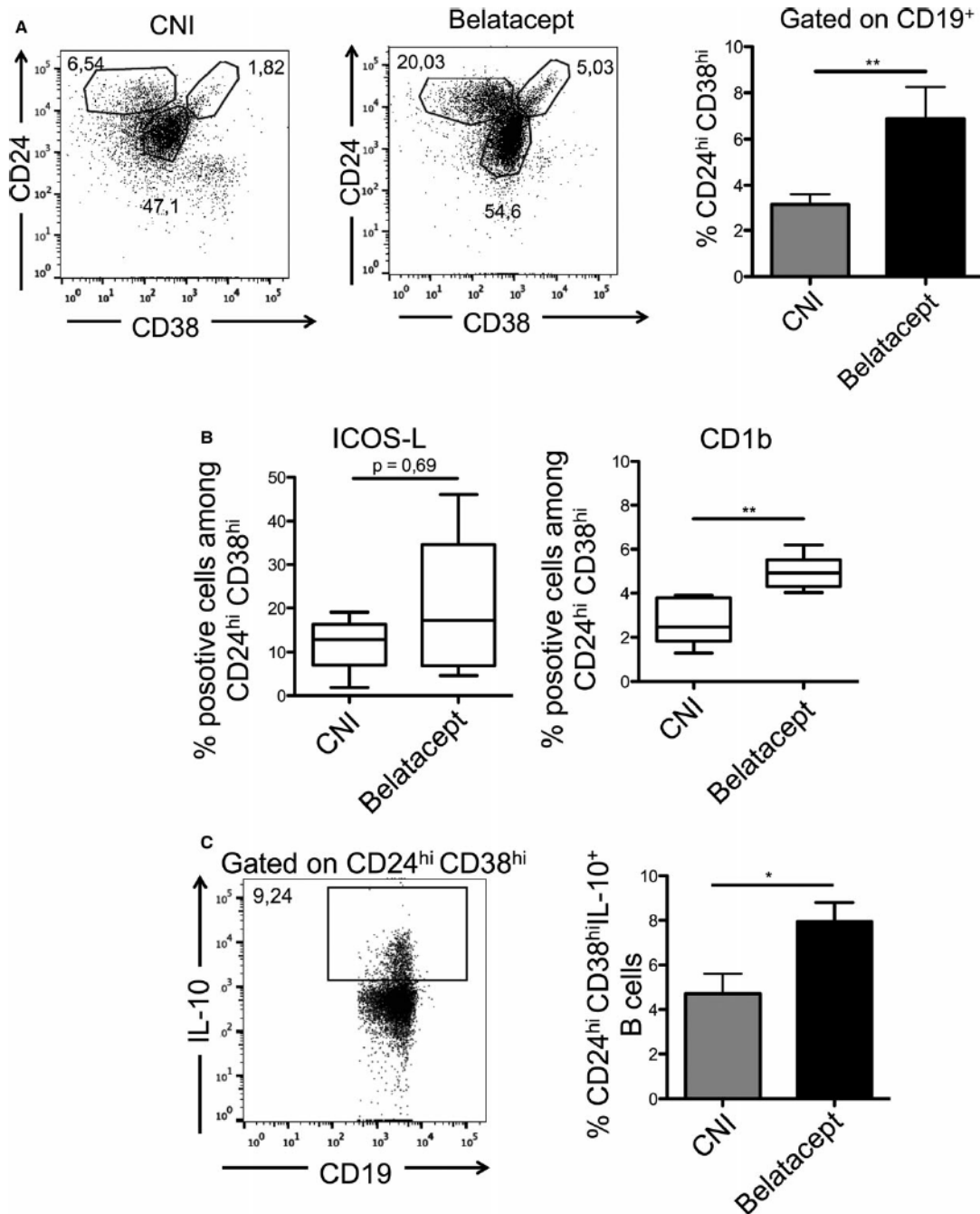
operational tolerance or a limited ability to produce DSAs when exposed to costimulatory blockade using belatacept. Although no association between CD24^{hi}CD38^{hi} B cell proportion and DSA formation was evident, a proportion of this subset was associated with reduced rejection rates in patients developing DSAs (21). Furthermore, our results showed that CD24^{hi}CD38^{hi} B cells associated with the CD1b marker have better regulatory properties.

The qPCR and flow cytometry analysis led us to identify a new set of B cell biomarkers associated with IL-10 expression that could aid both understanding and monitoring of B cells for implications in transplant tolerance.

CD9 and CD10 exhibited overexpression in CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. Only CD10 was previously shown to be expressed in human transitional B cells (22). CD9 is a 21- to 24-kDa tetraspanin (23). The tissue and cellular distribution of CD9 is wide and includes many epithelial cells as well as endothelium, hematopoietic cells, smooth muscle cells, pre-B cells and platelets. In bone marrow, it has been shown that CD9 interacts with the CD10 metalloprotease and presumably contributes to the maturation of pre-B cells and the migration of B cells to the blood circulation. More recently, CD9 has been identified in humans as a novel marker for a human germinal center B cell subset that is committed to plasma cell lineage. Indeed, CD9 expression is induced in CD9⁻ germinal center B cells under plasma cell-generating conditions and gradually increased in the course of plasma cell differentiation (24). These findings are of interest because it was recently established that in humans, a distinct set of IgM⁺CD19⁺CD138^{hi} plasma cells composed the major B cell subset producing the regulatory cytokines IL-10 and IL-35 *in vivo* during autoimmune and infectious diseases. It must be noted

population. Such results are important because these cells were identified in renal transplant recipients in two different clinical contexts associated with either

Bigot et al



that the differentiation of activated B cells into plasma cells is controlled by the plasma cell transcription factor B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1)

(25) and that CD9⁺ cells express higher levels of Blimp-1 and lower levels of B cell transcription factors Bcl-6 and Pax-5 compared with CD9⁻ cells (24). Whether

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

Figure 6: Allograft kidney recipients treated with belatacept exhibited a higher proportion of CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ B cells. (A) Representative dot plot of B cells in belatacept- and CNI-treated patients with stable graft function, according to expression levels of CD24 and CD38. The histogram represents the percentage on CD24^{hi} CD38^{hi} B cells from six belatacept- or CNI-treated patients. (B) Percentage of ICOS-L- or CD1b-positive cells among CD24^{hi} CD38^{hi} B cells between belatacept- and CNI-treated patients (n = 6). (C) Representative IL-10 gating strategy and percentage of CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ B cells in belatacept- and CNI-treated patients (n = 5). Results were compared with the Mann–Whitney test (*p < 0.05; **p < 0.01). CNI, calcineurin inhibitor; ICOS-L, inducible T cell costimulator ligand.

CD19⁺CD9⁺CD10⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells contribute to the development of regulatory plasma cells remain to be confirmed, but overexpression of CD9 and CD10 in CD24^{hi}CD38^{hi} B cells suggests potential crosstalk between the two Breg subsets.

We found overexpression of GARP in our population of transitional B cells. GARP, also called LRRC32, is a leucine-rich repeat-containing molecule that is highly expressed at the mRNA level in activated naturally occurring Tregs. GARP identifies a subset of activated Foxp3⁺ T cells with high suppressive capacity and discriminates Foxp3⁺ nonsuppressor TGF-β-treated T cells from *bona fide* Tregs (26). Recent findings also suggest that GARP could be a marker of Bregs. In fact, IL-10-overexpressing human B cells acquired a prominent immunoregulatory profile comprising upregulation of suppressor of cytokine signaling 3, GARP, IL-2Rα, and programmed death ligand 1 (27). Interestingly, we also found that GP96, a GARP chaperone that controls Treg functions (28), was also overexpressed in our transitional B cell subsets (data not shown). Our results suggest, for the first time, that GARP could be specifically expressed in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs. Specific roles remain to be determined.

Cytometric analysis also revealed that CD1b was significantly expressed in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. CD1 proteins (CD1a–d), were shown to mediate T cell autoreactivity and to present lipid antigens to T cells. In humans, expression of CD1 proteins on B cells is restricted to CD1c and CD1d, but little is known regarding their function (29). Interestingly, CD1d has been shown to be expressed in human Breg subsets. They present glycolipids to NK T cells (NKTs) (30). B cells that express CD1d can activate invariant NKTs (31), and experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking NKTs as a result of CD1d deficiency. Similarly, patients with systemic lupus erythematosus have defective NKTs as a result of faulty CD1d recycling (32). In this study, we provided the first evidence that CD1b is expressed on CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs. Furthermore, our results showed that CD24^{hi}CD38^{hi} B cells associated with the CD1b marker are able to suppress IFN-γ secretion by B cell-depleted PBMCs more than CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁻ or other B cell subsets. Our experimental conditions, however, do not allow us to determine precisely which cells types are in charge of the observed effect. Despite the use of

anti-CD3 T cell activator, we assume only that CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ B cells are able to inhibit IFN-γ secretion by effector cells; therefore, the effect observed on IFN-γ production could be indirect and thus might not result from T cell inhibition only. Moreover, this result must be interpreted with caution because CD1b was not exclusively expressed on CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. These results support the notion that CD1b was associated with the regulatory potency of these cells.

We next found a significant increase in ICOS-L expression in CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs. ICOS and its exclusive partner ICOS-L belong to a costimulatory molecule family that allows cognate lymphocytes to generate effective immune responses by acting in synchrony with the B cell receptor and TCR on B and T cells (33). Whereas ICOS is expressed on activated T cells, its ligand ICOS-L is constitutively expressed on naive B cells and dendritic cells and on stimulation in nonimmune cells (34). ICOS and ICOS-L gene-targeting studies have revealed a key role of ICOS–ICOS-L interactions in the acquisition of effector functions by T helper cell subsets, such as T follicular helper cells (35). ICOS-L expression on plasmacytoid dendritic cells has also been implicated in both induction of IL-10 production in T cells and Treg-mediated peripheral tolerance (36). Our results, showing significant enrichment in IL-10⁺ in the CD24^{hi}CD38^{hi}ICOS-L⁺ B cells, suggest that ICOS-L expression in transitional B cells could also play an active role in their IL-10-dependent regulatory properties.

Finally, we aimed to determine whether these newly identified markers of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells were also overexpressed in renal transplant recipients treated with belatacept compared with patients treated with CNI and found a significant difference in CD1b and IL-10 expression. Although we support the notion that these molecules could be associated with a regulatory effect, their functionality remains to be established in a clinical study. Our results indicate a link between this B cell subset and immunosuppressive regimens containing belatacept, which is associated with a significant low incidence of *de novo* DSAs (37). It is now well documented that developing DSAs is a major determinant of renal graft survival in renal transplant patients (38). B cell monitoring before DSA occurrence and at the different steps of B cell-mediated alloimmune response could be of great interest for both our understanding and better prevention

Bigot et al

of humoral injury. This could also assist future studies of these cells and facilitate the preclinical testing of novel Breg-targeted immunotherapies in transplantation. The clinical relevance of the immunomonitoring of these new markers remains to be determined.

Acknowledgments

We would like to thank Flora Zavala for helpful discussion. We thank A. Guguin and A. Henry from IMRB cells sorting facility.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 417–430.
2. Yan Y, van der Putten K, Bowen DG, et al. Postoperative administration of donor B cells induces rat kidney allograft acceptance: Lack of association with Th2 cytokine expression in long-term accepted grafts. *Transplantation* 2002; 73: 1123–1130.
3. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 348–357.
4. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363: 1451–1462.
5. Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, et al. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med* 2012; 18: 733–743.
6. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836–1847.
7. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848–1861.
8. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2014; 14: 144–155.
9. Leibler C, Matignon M, Pilon C, et al. Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naive and transitional B cells. *Am J Transplant* 2014; 14: 1173–1182.
10. Hirai T, Furusawa M, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Analysis of predictive and preventive factors for *de novo* DSA in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2014; 98: 443–450.
11. Schwarz C, Mayerhoffer S, Berlakovich GA, et al. Long-term outcome of belatacept therapy in *de novo* kidney transplant recipients - a case-match analysis. *Transpl Int* 2015; 28: 820–827.
12. Stolp J, Turka LA, Wood KJ. B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 389–397.
13. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32: 129–140.

14. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117: 530–541.
15. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 2011; 36: 228–238.
16. Lin W, Cerny D, Chua E, et al. Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. *J Immunol* 2014; 193: 2258–2266.
17. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4: 44–57.
18. Heidt S, Vergunst M, Anholts JD, et al. B cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function. *Transplantation* 2014; 99: 1058–1064.
19. Zhou AX, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. GARP-TGF- β complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells *in vivo*. *J Immunol* 2013; 190: 5057–5064.
20. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(Suppl 1): S1.
21. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: A prospective study. *Am J Transplant* 2015; 15: 1384–1391.
22. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; 105: 4390–4398.
23. Mazurov D, Barbashova L, Filatov A. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS J* 2013; 280: 1200–1213.
24. Yoon SO, Zhang X, Lee IY, Spencer N, Vo P, Choi YS. CD9 is a novel marker for plasma cell precursors in human germinal centers. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431: 41–46.
25. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 160–171.
26. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13439–13444.
27. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: e8.
28. Zhang Y, Wu BX, Metelli A, et al. GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *J Clin Invest* 2015; 125: 859–869.
29. Allan LL, Stax AM, Zheng DJ, et al. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *J Immunol* 2011; 186: 5261–5272.
30. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278: 1626–1629.
31. Bialecki E, Paget C, Fontaine J, Capron M, Trottein F, Faveeuw C. Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol* 2009; 182: 6105–6113.
32. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 2012; 36: 477–490.
33. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263–266.

Regulatory B Cells Biomarkers of Renal Transplant Tolerance

34. Liang L, Porter EM, Sha WC. Constitutive expression of the B7 h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J Exp Med* 2002; 196: 97–108.
35. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001; 409: 105–109.
36. Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, et al. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2680–2686.
37. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, et al. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2016; 374: 333–343.
38. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Incidence and impact of *de novo* donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* 2013; 95: 410–417.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells are enriched in IL-10⁺-secreting B cells. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were enriched in CD20⁺ B cells (>95%) and sorted on CD19, CD24 and CD38 clusters. (A) Representative flow cytometry plot depicts the cell-sorting strategy of the three B cell subpopulations. (B) Histograms represent percentage of cytoplasmic IL-10 expression among CD24^{hi}CD38^{hi}, CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ B cell subsets after 24-h culture with or without CpG and MCD40L, cumulative data (mean plus of minus standard deviation) from four healthy donors. (C) Representative cytokines in supernatant of sorted B cell subset after 24-h culture with CpG and MCD40L (n = 8). Results were compared with one-way analysis of variance, and p-values are indicated when

differences between two groups were statistically significant (**p < 0.01, ***p < 0.001).

Figure S2: Representative flow cytometry plot of sorted B cell subsets used in the microarrays. Purity percentage is indicated for each B cell population.

Figure S3: Diagram and table of genes exclusively upregulated or downregulated in regulatory B cells compared with the two other populations, according transcriptomic analysis.

Figure S4: Representative flow cytometry plot of B cell subsets used for surface marker phenotype.

Figure S5: Recapitulative table of gene profiles on CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells. The (+) symbol indicates a significant increase in gene expression between CD24^{hi}CD38^{hi} and the two other populations. The (-) symbol indicates a significant decrease in gene expression between CD24^{hi}CD38^{hi} and the two other populations. ND, not determined.

Figure S6: Flow cytometry plot of IL-10 staining and gating strategies.

Figure S7: Flow cytometry plot of IL-10 staining and gating strategies. n, total number of B cells used for IL-10 gating strategies.

Table S1: Principal gene ontology–discovered categories for the downregulated and upregulated genes.

Table S2: Clinical characteristics of renal transplant recipients treated with belatacept or with a calcineurin inhibitor.

Data S1: Discriminatory gene analysis summary.

Résultats supplémentaires :

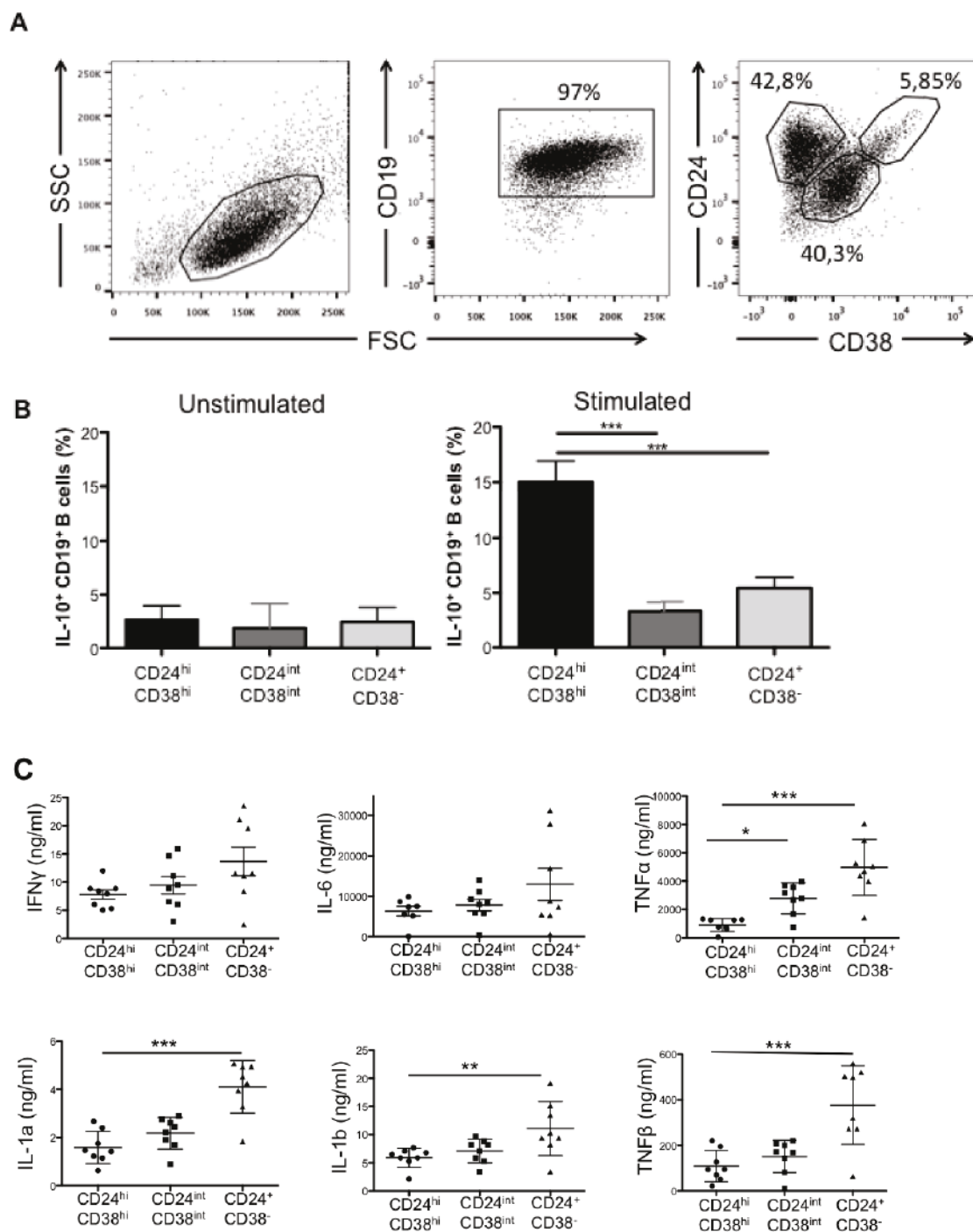


Figure S1: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells are enriched in IL-10⁺ secreting B cells. PBMC from healthy donors were enriched in CD20⁺ B cells (>95%) and sorted on CD19, CD24, CD38 clusters. (A) Representative flow cytometry plot depicts the cell-sorting strategy of the three B cells subpopulations. (B) Histograms represent percentage of cytoplasmic IL-10 expression among CD24^{hi}CD38^{hi}, CD24^{int}CD38^{int} and CD24⁺CD38⁻ B cells subsets after 24h culture with or without CpG and MCD40L, cumulative data (mean ± SD) from 4 healthy donors. (C) Represent cytokines in supernatant of sorted B cells subset after 24h culture with CpG and MCD40L (n=8). Results were compared with one-way ANOVA test analysis and p-values are indicated when differences between two groups are statistically significant (**p<0,01, ***p<0.001).

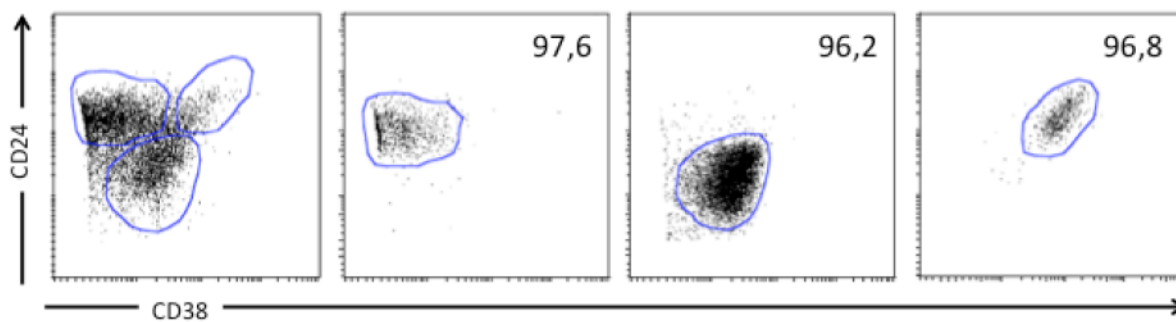


Fig.S2 Representative flow cytometry plot of sorted B cell subsets used in the microarrays. Purity percentage is indicated for each B cells population.

Only expressed gene



Only repressed genes



Only expressed genes		Only repressed genes	
Gene symbol	Description	Gene symbol	Description
ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23 [NM_033812]	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP) [NM_085840]
CHIT1B	CH1-like MARVEL transmembrane domain containing 8 [NM_178866]	ADAM29	ADAM metalloproteinase domain 29 [NM_014380]
AP3DC4	Arrestin domain containing 4 [NM_183176]	ASG1	Asialoglycosylase 1 [NM_036938]
CDHR3	Cadherin-related family member 3 [NM_152750]	AMOT	Angiostatin [NM_001134900]
DAZ1	Deleted in azoospermia-like [NM_001351]	AP1M2	Adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit [NM_005486]
SLK2	Slowed axonal growth 2 [NM_021448]	ANCE2	Anti-site APP-cleaving enzyme 2 [NM_011160]
HRK	Harikin, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain) [NM_003806]	BCT1L	Blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)-like [NM_014530]
MME	Membrane metallo-endoropeptidase [NM_007289]	BCE1B	Basal core 2 [NM_000618]
MPP8D2	Metallophosphoesterase domain containing 2 [NM_005584]	WTD	Wortmannin [NM_000660]
PR22	Polycystic kidney disease 2 [NM_000297]	CDC14B	Cell division cycle 34 homolog B (S. cerevisiae) [NM_009571]
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha [NM_002067]	CDL3A3	Colorectal cancer associated 3 [NM_001106006]
TMR6F21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 [NM_010615]	CNR1	Cannabinoid receptor 1 (brain) [NM_001081]
		DHR523	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13 [NM_144680]
		GALM12	UDP-N-acetylglucosamine-6-phosphate 4-epimerase [NM_001081]
		FAM123B	Family with sequence similarity 123 [NM_001075529]
		FCM2	FCM domain only 2 (FCM2) [NM_118791]
		FRTN	Falutin [NM_001079802]
		FSR2	human full-length cDNA clone C300405Y22 of Neuroblastoma [BC047357]
		GLB2	GLB family zinc finger 2 [NM_002413]
		IL2RA	Interleukin 2 receptor [NM_000417]
		PCOL1	PCOL1 homeobox 1 [NM_005187]
		PCP2	Polycystic group ring finger 2 [NM_007344]
		PCYT2	Phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine [NM_001861]
		PGP	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class P [NM_153588]
		POU5F1	POU class 5 homeobox 1 (POU5F1) [NM_002702]
		PPP1R2	PPP1R interacting protein, binding protein 2 (p19) beta 2 [NM_008821]
		PTGS2	cDNA FL463737 fs, clone TEST4452132, (AK126238)
		PTEN3	Pyren and HIV domain family, member 3 [NM_188980]
		SAMM1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signal 1 [NM_022134]
		SCN11	Scramin 1 [NM_014760]
		SNORD113-1	Small nuclear RNA, C/D box 113-1 [NR_004201]
		SRP46-MS1	SRP46 ribosome RNA1 (head to head) [NM_000000]
		SREB1	Serpinin (serpin-interacting) [NM_001095744]
		TFT12P1	Transmembrane phospholipase B-phosphatase and trexin homolog 2 paralogues 5 [NM_008296]
		VDR1	Vitamin D epoxide reductase complex, subunit 1 [NM_139014]
		WARSBP2	WRCA2 lectin-like domain (GLC_2_20488), lectin [LOC1000000014]
		ZNF531	Zinc finger protein 531 [NM_033181]
		ZNF558	Zinc finger protein 558 [NM_033180]
		ZNF65	Zinc, nuclear-binding [NM_001070]
		ZNF52	Myelodysplastic syndrome 2 translocation associated [NR_027842]

Figure S3: Diagram and table of genes exclusively upregulated or down-regulated in Breg compared the two other population according transcriptomic analysis.

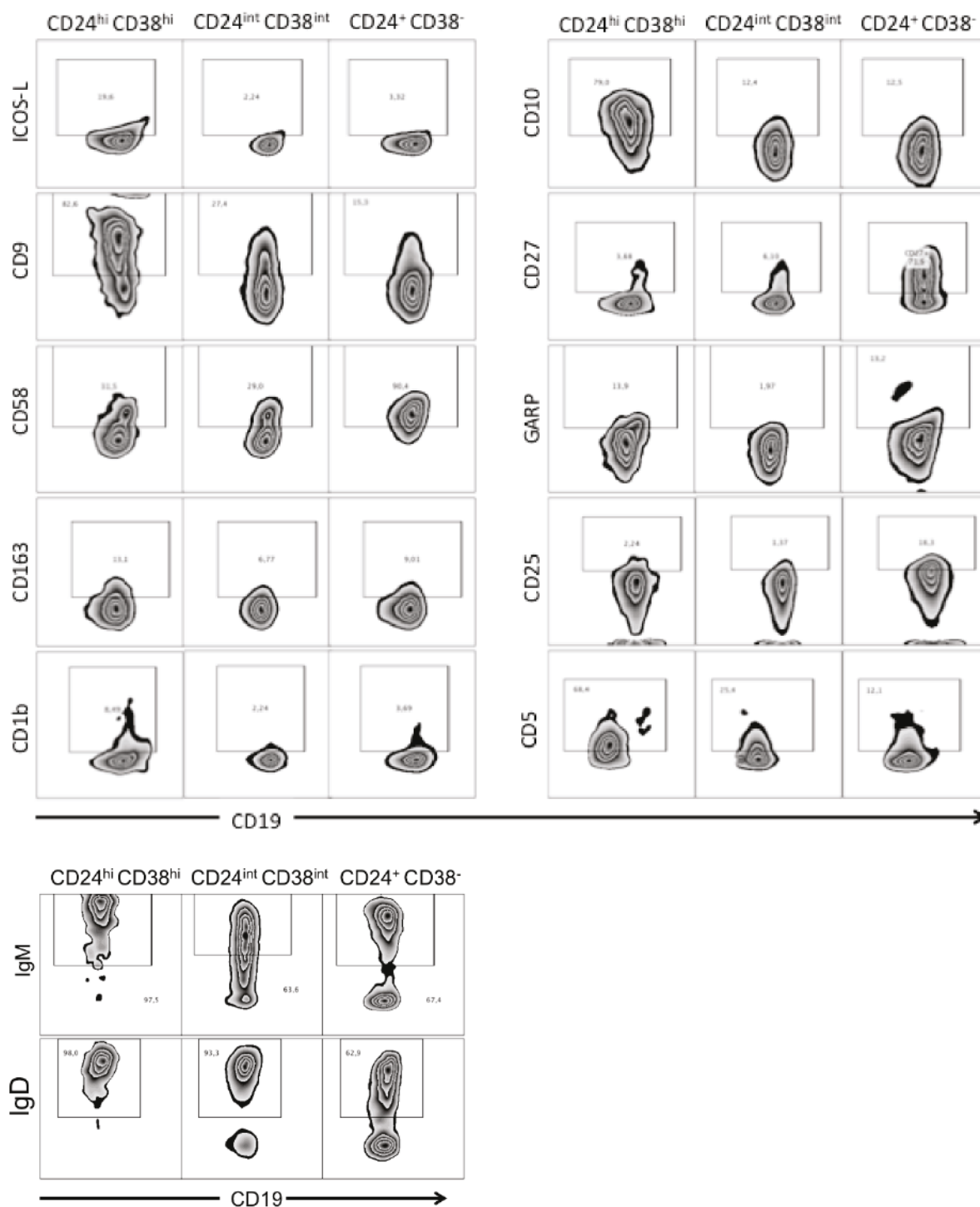


Figure S4: Representative flow cytometry plot of B cell subsets used for surface markers phenotype.

Gene symbol	other name	Fonction	Microarray	qRT-PCR	Facs
ADAM23	MDC-3	ADAM metallopeptidase domain 23	+	+	ND
CMTM8	CKLFSF8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	+	+	ND
MME	CD10	Metalloendopeptidases	+	+	+
PKD2	TRPP2	Polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	+	+	ND
TNFRSF21	DR6, CD358	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	+	+	ND
CD79a	MB-1	Signalisation du BCR, présentation antigénique	+	+	NS
LRRC32	GARP	Leucine rich repeat containing 32	+	+	+ to int
CD9	MIC3, p24	CD9 molecule	+	+	+
ICOSLG	B7-H2	Inducible T-cell co-stimulator ligand	+	+	+
TCL1A		T-cell leukemia/lymphoma 1A	+	+	ND
HRK	DP5	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	+	+	ND
CD1b		Antigen-presenting protein T-cell receptors on natural killer T-cells	+	ND	+
			Down-regulation		
IL2RA	CD25	Interleukin 2 receptor, alpha	-	-	-
CD39	ENTPD1	Hydrolyze ATP and other nucleotides	-	ND	-
CD58	LFA-3	CD58 molecule	-	-	- to 38 ⁻

Figure S5: Recapitulative table of genes profile on CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells.
 (+) Represents significant increase of genes expression between CD24^{hi} CD38^{hi} and two other populations. (-) Represents significant decrease of genes expression between CD24^{hi} CD38^{hi} and two other populations. (ND) not determined.

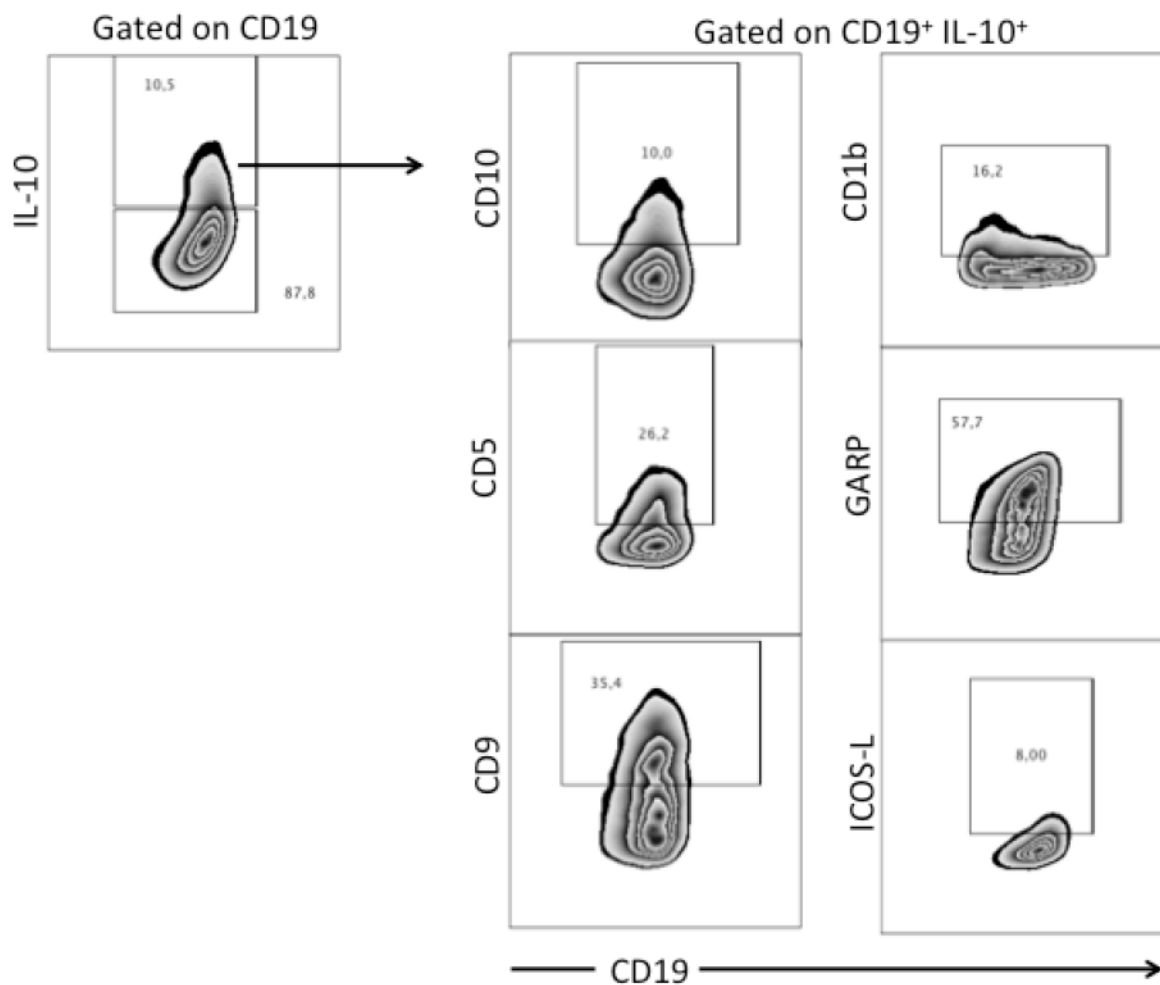


Figure S6: Flow cytometry plot of IL-10 staining and gating strategies.

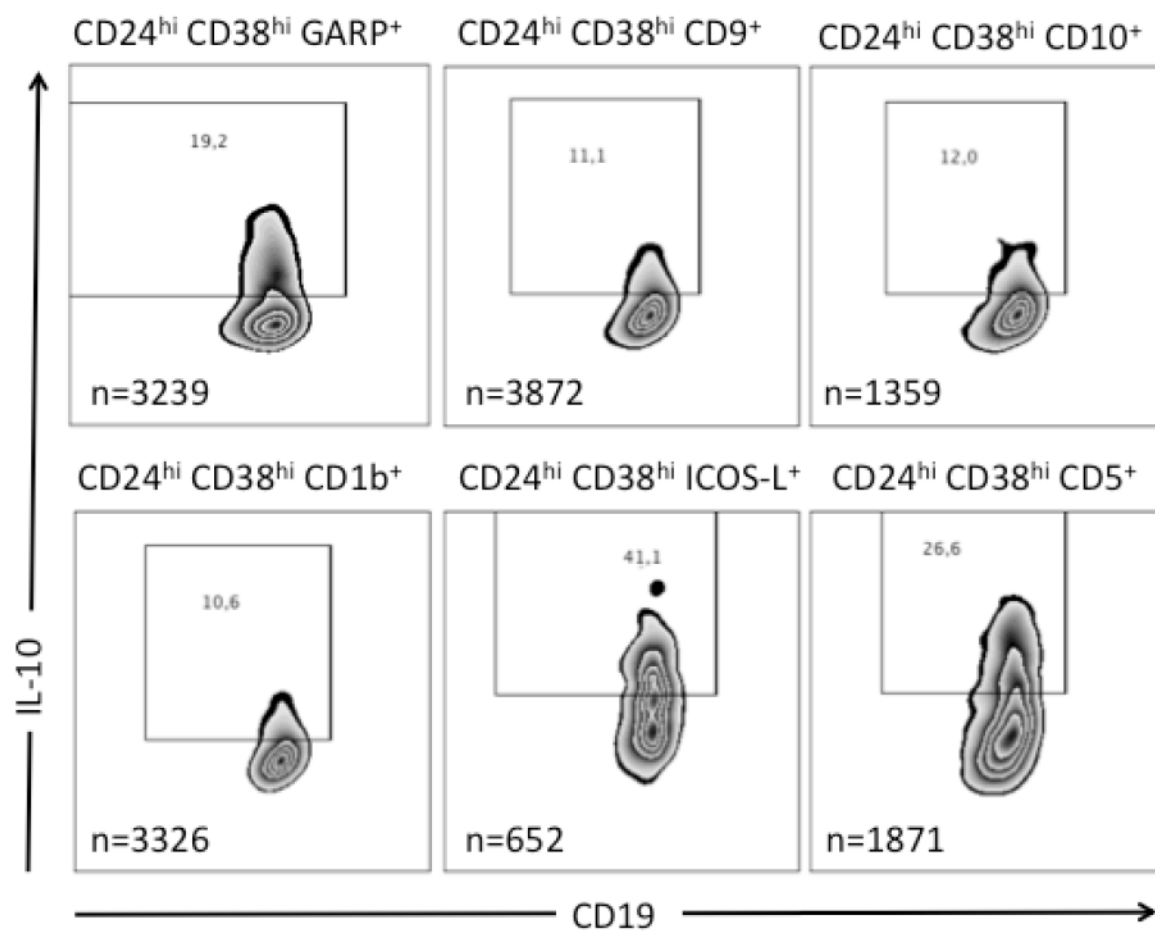


Fig.S7: Flow cytometry plot of IL-10 staining and gating strategies.
 (n) Represent total number of B cells used for IL-10 gating strategies.

GO ID	GO name	No of known genes	P-value	Gene Symbols
Upregulated genes				
GO:0006323	DNA packaging	17	1,8E-06	HIST1H2AC, HIST2H2AA4, HIST1H1D, HIST1H2AD, HIST1H2AE, HIST1H2BH, NUSAP1, TTN, HIST2H4B, HIST1H2BO, HIST2H2AB, HILS1, HIST1H2BN, HIST1H2BL, HIST2H2BE, H2AFY2, HIST1H3B, HIST1H4F, HIST1H4I, TOP2A, HIST1H3I, HIST1H4H
O:0065003	Macromolecular complex assembly	40	5,1E-04	E2F2, HIST1H2AC, HIST2H2AA4, TSPAN4, HIST1H2AD, WASF1, HIST1H2AE, TTN, NDUFAF1, PDSS2, TUBB4Q, HIST2H4B, C1QTNF7, HIST1H2BO, HIST2H2AB, HIST1H2BN, DGKD, HIST1H2BL, CLP1, RTF1, TUBB6, HIST1H4F, GNMT, DDX20, HIST1H4I, HIP1, SYK, HIST1H4H, HIST1H1D, HIST1H2BH, DPAGT1, C20ORF7, DGKH, GAS7, STOM, TARBP2, CTH, CNTF, HILS1, PSMG2, HIST2H2BE, H2AFY2, HIST1H3B, HIST1H3I, PPP5C
GO:0016310	Phosphorylation	40	1,2E-02	BCKDK, NDUFB6, ATP6AP1, PIP5K1B, CAD, ULK4, FES, TTN, ATP5G3, MST4, NDUFAF1, LATS2, INSR, PRKACG, GNG3, NDUFS3, SIK1, SYK, FGD4, LOC646214, PIK3C2B, HCK, MAP2K3, PIM1, PRKCH, ATP6V1H, CDK6, NADK, DGUOK, PI4KB, PRKCE, CDKL3, PDE6H, MAP4K3, NME1, CDC42BPA, GRK4, FUK, GADD45B, MYLK
GO:0009119	Ribonucleoside metabolic process	6	1,9E-02	NME1, QTRTD1, ACLY, DGUOK, GNMT, PPCDC
GO:0045637	Regulation of myeloid cell differentiation	7	3,0E-02	NME1, KLF10, LOC729595, LOC441795, HIST1H4F, CDK6, CCL5, HIST1H4I, HIST1H4H, HIST2H4B
GO:0006325	Chromatin organization	21	3,1E-02	HIST1H2AC, HIST2H2AA4, HIST1H2AD, HIST1H2AE, CBX4, HIST2H4B, RCBTB1, HIST1H2BO, HIST2H2AB, HIST1H2BN, HIST1H2BL, RTF1, HIST1H4F, SOX15, HIST1H4I, HIST1H4H, AEBP2, HIST1H1D, HIST1H2BH, HDAC4, HILS1, HIST2H2BE, H2AFY2, HIST1H3B, LOC648822, HIST1H3I
GO:0006935	Chemotaxis	11	4,4E-02	CCR9, CXCL17, CCL3L3, CX3CR1, CMTM8, CMTM7, RALA, CCL5, CCL4, CCL26, SYK
GO:0040029	Regulation of gene expression, epigenetic	7	4,5E-02	TARBP2, FOS, HILS1, CLP1, H2AFY2, DNMT3L, EIF2C4
GO:0051338	Regulation of transferase activity	20	4,7E-02	CCDC88A, C13ORF15, MAP2K3, PIM1, DGKH, ZEB2, SFN, TTN, PDE6H, LATS2, PRKACG, SERINC2, TARBP2, SPRY2, DGKD, GNG3, GADD45B, CLN8, FGD4, SYK
GO:0051726	Regulation of cell cycle	18	5,6E-02	E2F2, MAD1L1, AURKAIP1, C13ORF15, PIM1, NUSAP1, CDK6, INTS3, SFN, LATS2, CDT1, OBFC2B, PSMG2, BTG3, DAZL, GADD45B, APBB2, SIK1
Downregulated genes				
GO:0009119	Ribonucleoside metabolic process	10	9,7E-04	PANK4, NME4, COASY, UMPS, MAT2B, TPMT, NT5E, ADA, DCAKD, NME6
GO:0050714	Positive regulation of protein secretion	9	1,9E-03	KCNN4, P2RX7, IL6, SAA1, IFNG, NLRP12, TGFB3, TNFRSF4, TGFB2
GO:0050671	Positive regulation of lymphocyte proliferation	10	3,6E-03	IL6, IL2RA, IL18, NCK1, IFNG, IL12A, IL15, IL13RA1, TNFRSF4, ADA
GO:0001776	Leukocyte homeostasis	8	3,7E-03	P2RX7, IL6, IL2RA, BCL2, TNFRSF13B, IFNG, FAS, FANCC
GO:0042531	Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	6	8,4E-03	IL6, IL29, HCLS1, IFNG, IL12A, JAK2
GO:0046651	Lymphocyte proliferation	8	8,8E-03	P2RX7, CCND3, CD40LG, BCL2, MALT1, IL15, TNFRSF4, IMPDH1
GO:0006270	DNA replication initiation	5	1,1E-02	POLA1, MCM3, ORC1L, MCM5, MCM6
GO:0032732	Positive regulation of interleukin-1 production	5	1,4E-02	P2RX7, SAA1, IFNG, NLRP12, JAK2
GO:0046427	Positive regulation of JAK-STAT cascade	6	1,4E-02	IL6, IL29, HCLS1, IFNG, IL12A, JAK2
GO:0042981	Regulation of apoptosis	61	1,8E-02	NUAK2, TGFB3, PRDX5, PAWR, TGFB2, PECR, PCGF2, DYNLL1, TIAM2, BAG3, IFNG, PSENEN, FAS, DAP, ALX3, SOCS3, BARHL1, BCL2A1, FADD, ESR2, NME6, SERPINB9, AMIGO2, TNFRSF10B, BNIP2, CD40LG, TXNDC5, IL12A, CSTB, CTSB, ACVR1, IFIH1, APL1B, TIMP3, TNFRSF4, ADA, SRC, PLAGL1, PEA15, BCL2, PPP2CB, LHX4, HSPA5, PHLDA3, BMF, COL4A3, IL6, IL2RA, CEBPB, BRCA2, MALT1, SLAMF7, NFKBIL1, PPIF, BFAR, NOTCH1, P2RX7, NUP62, NLRP12, JAK2, APBB1

Table S1: Principal GO-discovered categories for the downregulated and upregulated genes.

Variables	Stable graft function		P-value ^a
	Belatacept	CNI	
Patients, N	6	6	
At the time of transplantation			
Sex (Female), N (%)	3 (50)	3 (50)	1.00
Recipient age, years, mean (SD)	41 ± 17	41 ± 14	0.94
Donor age, years, mean (SD)	49 ± 20	43 ± 18	0.56
Living/deceased donor, N	0/6	1/5	1.00
Donor specific alloantibodies, N	0 (0)	0 (0)	-
HLA mismatches, mean (SD)	4 ± 2	5 ± 1	0.45
Cold ischemia time, min, median (IQR)	757 (715-912)	1025 (845-2370)	0.04
Cause of end-stage kidney disease, N			
Glomerulonephritis	3	3	0.72
Chronic interstitial nephropathy	1	0	
Unknown nephropathy	1	1	
Other	1	2	
Viral infectious disease, N (%)			
CMV viremia	1 (17)	0 (0)	1.00
BK viremia	0 (0)	0 (0)	1.00
Immunosuppression, N (%)			
Induction	6 (100)	6 (100)	1.00
Thymoglobulin	1 (17)	2 (34)	1.00
Basiliximab	5 (83)	4 (66)	-
Belatacept	6 (100)	0 (0)	-
Calcineurin inhibitors	0 (0)	6 (100)	1.00
Mycophenolate mofetil	6 (100)	5 (83)	0.45
Steroids	6 (100)	4 (66)	-
Acute rejection, N (%)	0 (0)	0 (0)	-
End of follow-up (sample date)			
Time from transplant, months, median (IQR)	67 (32-107)	94 (24-157)	0.87
Delay from belatacept treatment transplant, months, mean (SD)	65 (29-105)	94 (24-155)	0.75
eGFR ml/min/1.73m ² , mean (SD)	63 ± 17	83 ± 32	0.22
Proteinuria, g/day, median (min-max)	0.05 (0.03-0.09)	0.16 (0.06-0.26)	0.06
Donor specific alloantibodies, N (%)	0 (0)	0 (0)	-

a : a P-value < 0.05 was considered significant.

Table.S2 : Clinical characteristics of renal transplant recipients treated with Belatacept or with Calcineurin Inhibitor (CNI)

2 Résultats complémentaires

La caractérisation des LB régulateurs passe essentiellement par leur capacité à produire de l'IL-10. Aujourd'hui, l'identification de l'IL-35 comme une cytokine régulatrice clé dans la fonction régulatrice des LB commence à faire son apparition en particulier dans les modèles murins. En effet, dans un modèle où les LB sont déficients en p35 ou EBI3, les souris présentent une EAE exacerbée et une résistance à l'infection par *salmonella typhimurium*. Dans ce modèle, la protection contre l'infection engendrée par la déficience en IL-35 des LB est associée à une augmentation de l'activation des macrophages et des LT inflammatoires (Shen, Roch et al. 2014). Une autre étude indépendante montre que les LB stimulés avec de l'IL-35 sont capables d'induire une production d'IL-35. Le transfert adoptif de ces cellules est capable de protéger la souris contre l'uvéite auto-immune induite (Wang, Yu et al. 2014). Dans le modèle d'EAE il est mis en évidence que les plasmablastes/plasmocytes CD138⁺ sont la source principale d'IL-35.

Le fait que seule, une partie des cellules CD24^{hi} CD38^{hi} identifiées pour leur capacité immunosuppressive soit capable d'exprimer l'IL-10, suggère l'existence d'autres voies d'immunorégulation.

Ces nouvelles données nous ont conduit à explorer dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} humains, d'autres voies comme l'expression d'IL-35 et d'IL-27 qui sont des cytokines aux capacités immunorégulatrices toutes deux composées de la sous-unité EBI3.

Dans cet objectif, nous avons tout d'abord analysé par cytométrie en flux la capacité des LB totaux à exprimer EBI3 après stimulation avec du CpG, MCD40L et un anti-IgM. Dans cette expérience, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la sous-unité EBI3 correspondant à la chaîne β des cytokines IL-27 et IL-35.

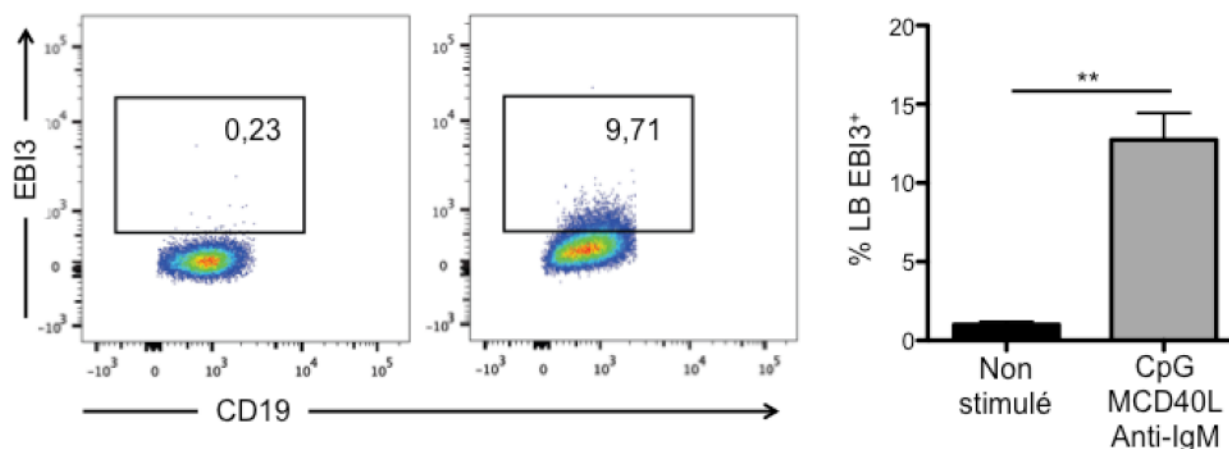


Figure 11 : Expression d'EBI3 après stimulation de LB totaux.

Les PBMC issus de sang périphérique de donneurs sains ont été enrichis en LB CD20⁺ (>95%) puis stimulés (gris) ou non (noir) pendant 24h avec CpG MCD40L et anti-IgM puis PMA, ionomycine et Golgi Plug (PIG) pendant les 4 dernières heures de culture (n≥3). Les nuages de points et l'histogramme montrent le pourcentage de LB exprimant EBI3 avant et après stimulation. Les résultats ont été comparés avec un test t non apparié (**p<0,01).

Ces résultats montrent dans un premier temps que les LB humains activés sont capables d'exprimer la protéine EBI3 (Figure 11). Après stimulation, nous observons une proportion plus importante de cellules exprimant EBI3 (12,74 ± 5,09%) par rapport à des LB non stimulés (1,01 ± 0,31%).

Afin de vérifier si les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} étaient capables d'exprimer EBI3, nous avons trié par cytométrie en flux 3 populations de LB comme décrit précédemment (CD24^{hi} CD38^{hi}, CD24^{int} CD38^{int} et CD24⁺ CD38⁻). Ces cellules ont ensuite été stimulées *in vitro* pendant 24h avec du CpG, MCD40L, anti-IgM et PIG durant les 4 dernières heures de culture puis l'expression d'EBI3 intracellulaire a été analysée par cytométrie en flux.

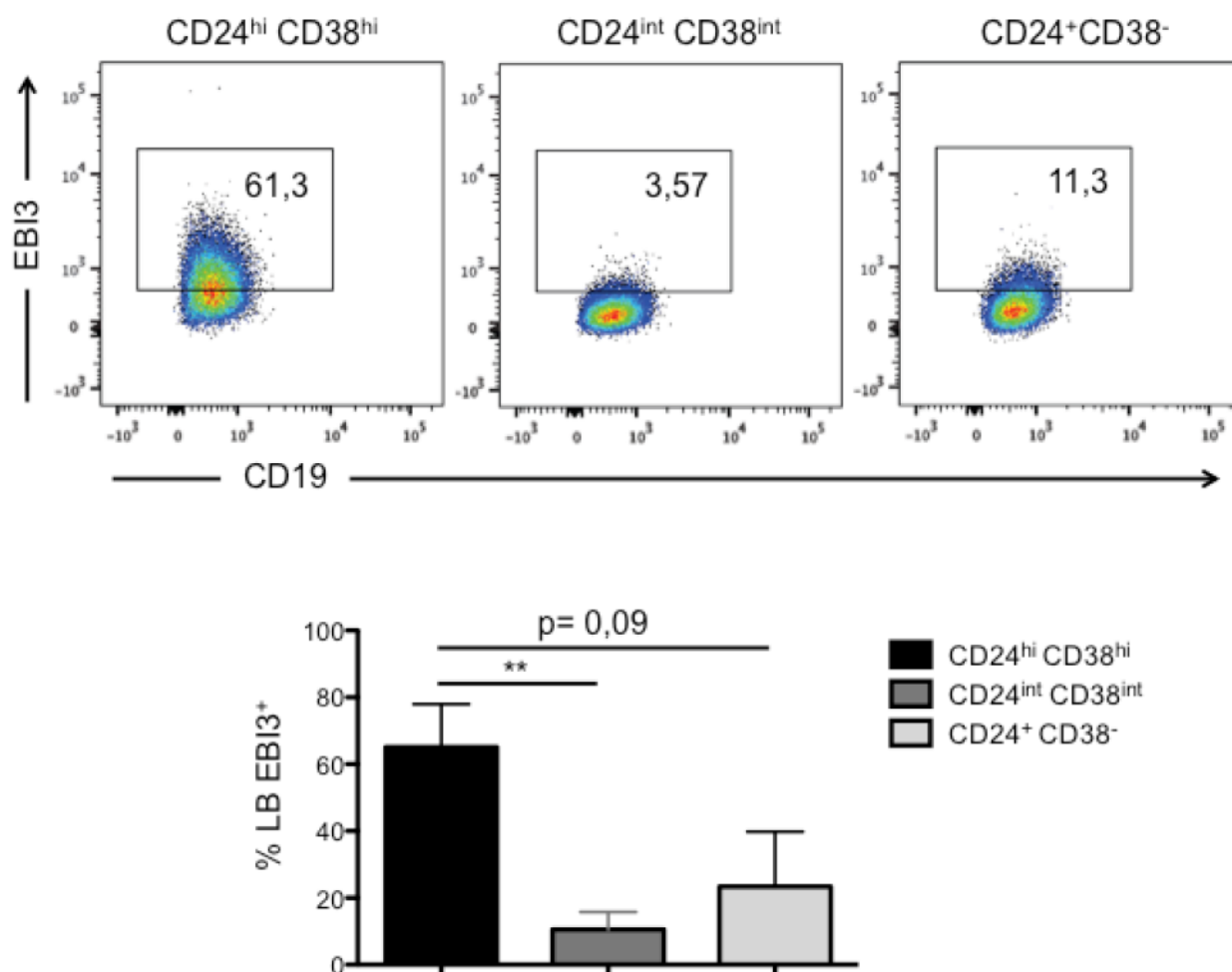


Figure 12 : Les LB CD24^{hi} CD38^{hi} sont enrichis en LB EB13⁺.

Les LB CD20⁺ issus de sang périphérique de donneurs sains ont été triés par cytométrie en flux sur les marqueurs CD19 CD24 CD38. Les nuages de points et l'histogramme représentent le pourcentage de cellules exprimant EB13 parmi les populations CD24^{hi} CD38^{hi}, CD24^{int} CD38^{int}, CD24⁺ CD38⁻ après 24h de stimulation avec CpG, MCD40L et anti-IgM puis PIG pendant les 4 dernières heures de culture (n=4). Les résultats ont été comparés avec un test t non apparié (**p<0,01).

L'analyse en cytométrie en flux de l'expression d'EB13 dans ces 3 populations de LB triés et stimulés montre pour la première fois un enrichissement en cellules EB13⁺ dans la population CD24^{hi} CD38^{hi} comparativement aux populations CD24^{int} CD38^{int} et CD24⁺ CD38⁻ (65,13 ± 25,62% ; 10,53 ± 10,57% et 23,39 ± 32,83 % respectivement) (Figure 12).

Bien que cette analyse montre une proportion plus importante de LB EBI3⁺ dans la population CD24^{hi} CD38^{hi}, ces données ne permettent pas de déterminer si cette expression d'EBI3 représente une expression d'IL-35, d'IL-27 ou bien si cette protéine est exprimée seule. En effet, malgré l'utilisation d'anticorps dirigés contre les sous-unités p35 et p28 en cytométrie, nous n'avons pas pu mettre en évidence s'il existait une corrélation entre l'expression d'EBI3, p35 ou p28 en raison de la non fiabilité de ces outils moléculaires. Pour contourner ce problème nous avons donc réalisé après activation de ces 3 populations de LB, une analyse de l'expression des gènes EBI3, p35 et p28 par RTqPCR.

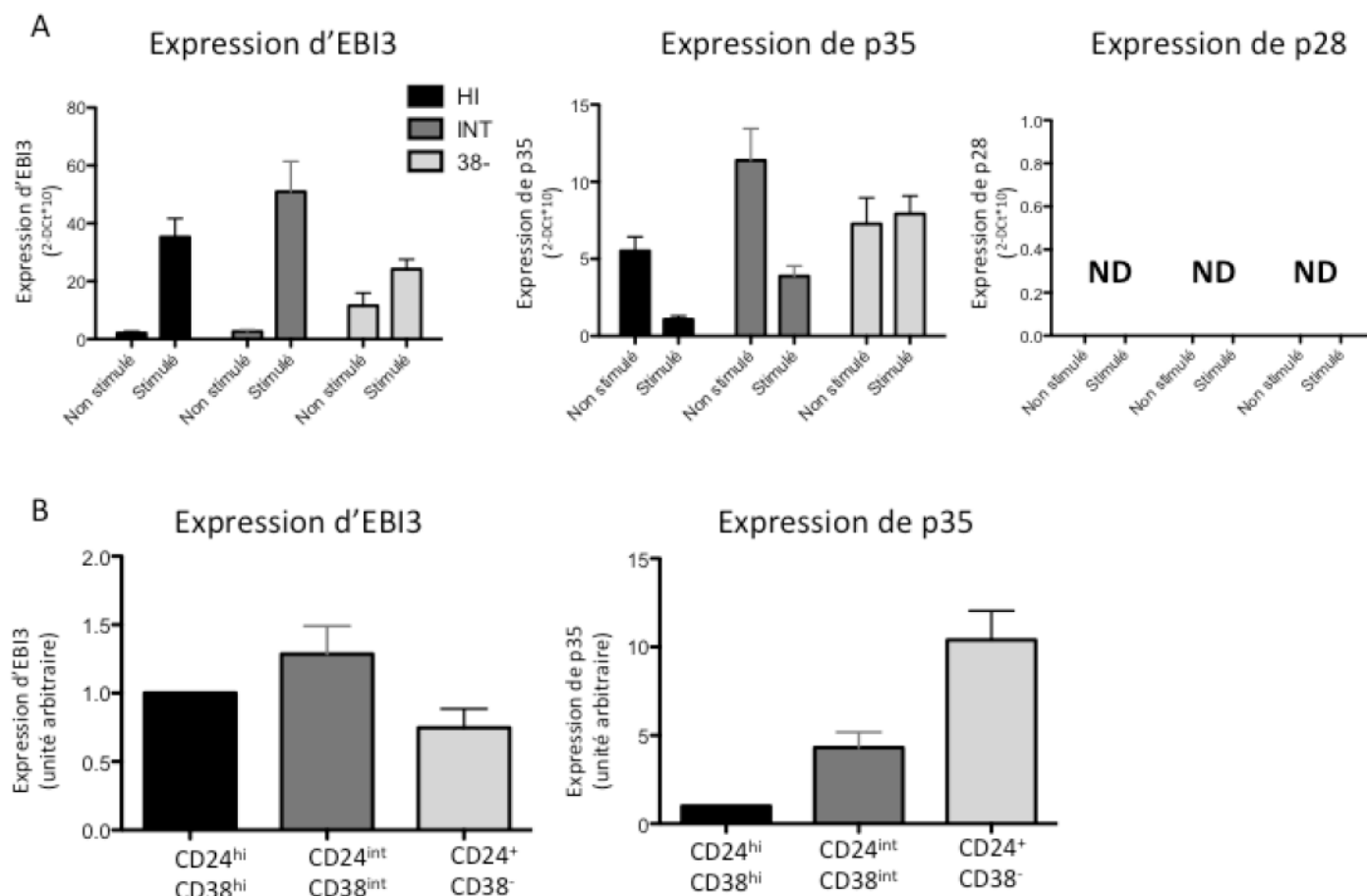


Figure 13 : Profil d'expression d'EBI3, p35 et p28 sur LB triés.

Les LB CD20⁺ issus de sang périphérique de donneurs sains ont été triés sur les marqueurs CD19 CD24 CD38 et stimulés ou non avec CpG MCD40L et anti-IgM pendant 24h. Les ARN ont été préparés à partir des 3 populations triées et l'expression des gènes EBI3, p35 et p28 a été quantifiée par qPCR par la méthode ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pour (A) et ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) pour (B) sur 6 donneurs sains. Pour chaque donneur, l'expression a été normalisée par rapport au gène de référence HPRT. (A) représente le niveau d'expression d'EBI3, p35 et p28 sur les 3 populations de LB triés avec et sans stimulation (ND= non déterminé). (B) représente la différence de niveau d'expression d'EBI3 et p35 entre les différentes populations après activation. Pour chaque donneur l'expression des gènes a été normalisée par rapport à l'expression des LB CD24^{hi} CD38^{hi}.

Dans un premier temps, les résultats mettent en évidence que la stimulation par CpG, MCD40L et anti-IgM est capable d'induire l'expression d'ARNm d'EBI3 dans les populations CD24^{hi} CD38^{hi} mais également dans les LB CD24^{int} CD38^{int} et CD24⁺ CD38⁻. Malgré une expression plus importante d'EBI3 à l'état non activé dans les LB

CD24⁺ CD38⁻ par rapport aux 2 autres populations, la différence du niveau d'expression d'EBI3 entre la condition sans et avec activation est toutefois beaucoup plus importante dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} et CD24^{int} CD38^{int} (Figure 13A). En ce qui concerne l'induction d'expression de p35, nous observons un plus faible niveau d'expression de p35 après activation pour les populations CD24^{hi} CD38^{hi} et CD24^{int} CD38^{int} contrairement aux cellules CD24⁺ CD38⁻, qui elles, présentent un niveau similaire de l'expression du gène p35 entre les 2 conditions. Néanmoins, ces 3 populations de LB expriment toutes l'ARNm p35 que ce soit à l'état non activé ou activé, cependant, l'expression de p35 est légèrement plus faible dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} comparativement aux 2 autres populations. Il est à noter dans cette expérience que l'analyse des résultats de l'expression du gène p28 n'a pu être réalisée en raison d'une trop faible quantité d'ARNm détectée, ce qui confirme l'absence ou la très faible expression d'IL-27 par les LB humains. Afin de déterminer si la sous-population CD24^{hi} CD38^{hi} était la source majeure de ces molécules, nous avons dans un second temps, comparé le niveau d'expression des gènes EBI3 et p35 après activation entre les 3 populations de LB triés. Ces résultats ne montrent pas de différence évidente du niveau d'expression d'EBI3 entre les 3 populations, néanmoins, le niveau d'expression de p35 après activation chez les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} semble plus faible par rapport à celui des populations CD24^{int} CD38^{int} et CD24⁺ CD38⁻ (Figure 13B).

Ces résultats montrent pour la première fois que les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} sont capables de co-exprimer à la fois les ARNm d'EBI3 et de p35. Cependant l'expression de p35 contrairement à celle d'EBI3 semble très peu inductible par l'activation des LB et présente déjà un niveau important à l'état non activé chez les 3 populations de LB. Cette analyse ne permet pas de préciser si la co-expression des

ARNm d'EBI3 et de p35 reflète l'expression de la cytokine IL-35. Cependant, l'incapacité de détection d'ARNm p28 chez ces 3 populations cellulaires ainsi que la littérature récente sur le rôle de l'IL-35 dans l'immunorégulation par les LB favoriseraient plutôt l'hypothèse d'une capacité à exprimer l'IL-35.

Bien que ces résultats soient très préliminaires, ils permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives sur les fonctions des cellules transitionnelles CD24^{hi} CD38^{hi} et sur leur rôle dans la tolérance immune.

DISCUSSION

Aujourd'hui de nombreuses études montrent l'implication des LB dans la régulation de la réponse immune. Chez l'homme, les preuves de la capacité immunorégulatrice des cellules transitionnelles CD24^{hi} CD38^{hi} sont multiples notamment dans le cas de maladies auto-immunes. Récemment, plusieurs études suggèrent l'implication de ces cellules dans la tolérance de greffons rénaux chez les patients transplantés, en particulier chez les patients tolérants opérationnels stables sans immunosuppresseur ou chez les patients traités par belatacept présentant une meilleure fonction rénale avec un plus faible taux de DSA. Dans l'objectif d'améliorer la caractérisation phénotypique de ces cellules et de préciser leur fonction dans la tolérance en transplantation rénale, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative de ces cellules afin d'identifier de nouveaux marqueurs associés à celles-ci. Cette analyse nous a permis d'identifier une expression plus importante des marqueurs CD9, CD10, GARP, ICOS-L et CD1b chez la population régulatrice CD24^{hi} CD38^{hi} et de montrer que ceux ci étaient corrélés à l'expression d'IL-10 chez les LB totaux. De plus nous avons mis en évidence dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant ICOS-L et CD1b une augmentation de la proportion de cellules exprimant l'IL-10. Cette population CD24^{hi} CD38^{hi} dont nous avons montré les capacités régulatrices a également été retrouvée en proportion plus importante chez les patients traités par belatacept et identifiés comme présentant un meilleur pronostic clinique.

1 Caractérisation phénotypique des Breg

Dans cette étude nous mettons en évidence pour la première fois, une signature transcriptomique distincte de ces cellules par rapport aux LB CD24^{int} CD38^{int} et CD24⁺ CD38⁻. Dans la population CD24^{hi} CD38^{hi}, l'analyse ontologique des gènes

montre que les voies de signalisation impliquées dans la modification de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire sont les plus exprimées alors que les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et la régulation de l'activation des lymphocytes B sont réprimées par rapport aux deux populations contrôles. Bien que l'implication de ces cellules dans le contrôle de la production de DSA ne soit pas clarifiée, cette analyse montre que les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la production d'immunoglobulines sont également sous exprimées dans la population CD24^{hi} CD38^{hi} (Figure 14). Or, il a été montré d'une part chez des patients greffés rénaux traités par belatacept, une augmentation de la fréquence de LB CD24^{hi} CD38^{hi} (Leibler, Matignon et al. 2014) et d'autre part une diminution de la production de DSA post greffe chez ces patients traités par belatacept (Schwarz, Mayerhoffer et al. 2015). Ensemble, ces données convergent vers l'hypothèse d'un lien possible entre la présence de ces cellules et la faible proportion de dnDSA retrouvés chez les patients traités par belatacept. D'autres travaux corroborent cette hypothèse avec une augmentation de la proportion de LB CD24^{hi} CD38^{hi} chez les patients ne présentant pas de signe de rejet. Néanmoins dans cette étude, aucune relation entre l'évolution de la proportion de ces cellules et l'apparition de dnDSA au cours du temps n'a été mise en évidence (Shabir, Girdlestone et al. 2015). Afin de vérifier s'il existe un rôle régulateur des LB CD24^{hi} CD38^{hi} sur la production de DSA par les plasmablastes, il serait envisageable d'évaluer en coculture *in vitro* l'impact de ces cellules régulatrices sur la production de DSA par les plasmablastes. Au laboratoire, nous développons actuellement une méthode permettant d'évaluer *in vitro* l'impact du Belatacept directement sur la différenciation, la fonction (sécrétion de cytokines) et la sécrétion d'anticorps par les LB.

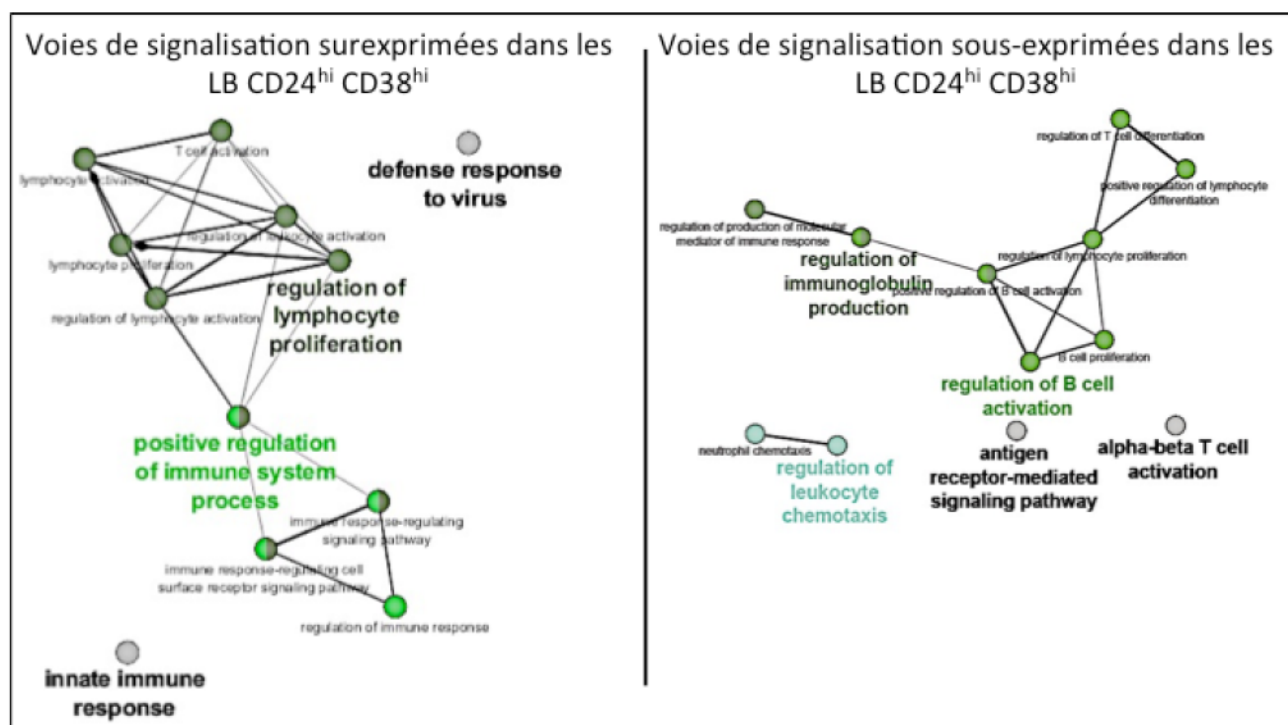


Figure 14 : Analyse ontologique des gènes dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi}

La sécrétion d'IL-10 apparaît comme le principal mécanisme d'immunosuppression des Breg, cependant il est encore bien difficile de caractériser spécifiquement les LB producteurs d'IL-10. Nos analyses par cytométrie en flux ont permis d'identifier 6 nouveaux marqueurs associés à l'expression d'IL-10 chez les LB totaux comme CD10, CD9, GARP, ICOS-L CD5 et CD1b.

Bien que le CD10 ait déjà été décrit comme un marqueur de LB transitionnels (Agrawal, Smith et al. 2013), il n'a jamais été associé spécifiquement à l'expression de l'IL-10 dans les LB humains. Néanmoins, Blair et son équipe ont montré dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} qui sont enrichis en cellules IL-10⁺, qu'une majorité de ces cellules exprimaient le CD10 (Blair, Norena et al. 2010). Bien que nos résultats ne montrent pas d'augmentation de l'intensité d'expression de l'IL-10 spécifiquement dans les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant le marqueur CD10, l'augmentation de la proportion

de cellules CD10⁺ dans la population de LB totaux IL-10⁺ par rapport aux LB IL-10⁻ corrobore un lien possible entre la présence de CD10 et l'expression de l'IL-10.

Le marqueur de surface CD9 semble pouvoir intervenir dans l'adhésion cellulaire, la migration et la transduction de signaux (Lagaudrière-Gesbert, Le Naour et al. 1997). Bien que toutes ses fonctions ne soient pas précisément établies, il est décrit comme un marqueur unique de LB de la zone marginale ou des cellules plasmiques (Won and Kearney 2002). L'importance de ce résultat réside dans le fait que 30% des LB de la zone marginale sont capables d'exprimer l'IL-10 (Sun, Wang et al. 2015). De plus, il est décrit dans cette étude que la majorité des Breg murins IL-10 compétents expriment le CD9 (87%) et que cette protéine joue un rôle important dans la maturation des cellules B10 murines. Ces cellules CD9⁺ sont notamment capables d'inhiber la prolifération de LT CD4⁺ CD25⁻.

In vivo, l'injection de LB CD9⁺ au niveau des poumons dans un modèle murin d'asthme induit permet également de réduire l'inflammation des voies respiratoires. Il est notamment montré dans cette étude que l'on retrouve une plus forte proportion de cellules IL-10⁺ dans les LB CD9⁺ (Braza, Chesne et al. 2015) ce qui est en accord avec nos résultats.

GARP est une protéine transmembranaire décrite comme étant sélectivement exprimée par les Treg (Wang, Kozhaya et al. 2009). GARP est capable de fixer le TGF- β permettant la formation d'une plateforme pour la présentation de TGF- β latent à la surface de la cellule, ce qui semble essentiel dans la fonction régulatrice des Treg. Dans ces cellules, GARP intervient dans l'induction de l'expression de Foxp3 mais joue également un rôle direct sur la capacité suppressive des Treg. Il est d'ailleurs montré que l'extinction du gène GARP par shRNA dans des Treg induits

humains atténuent leur capacité suppressive (Wang, Wan et al. 2008). Ces données indiquent que la protéine GARP est impliquée dans les capacités immunorégulatrices des Treg et qu'elle pourrait également participer directement aux capacités suppressives des Breg ou indirectement à travers l'induction par contact cellulaire de Treg Foxp3⁺. Dans ce cas, ces résultats seraient en adéquation avec la capacité des cellules CD24^{hi} CD38^{hi} à induire des Treg Foxp3⁺ via le TGF-β1 (Wang, Yuan et al. 2015). De façon intéressante, l'analyse transcriptomique révèle également une augmentation de l'expression de GP96 dans ces cellules, GP96 étant une protéine chaperonne de GARP intervenant également dans le contrôle de la fonction des Treg (Zhang, Wu et al. 2015). Une autre hypothèse est que l'expression de GARP par les LB pourrait aboutir à une forme soluble de la protéine connue pour ses capacités anti-inflammatoires et immunomodulatrices. En effet, l'utilisation de GARP soluble recombinante en culture avec des LT CD4⁺ humains activés inhibe non seulement la prolifération de ces cellules mais aussi la sécrétion de cytokines comme l'IFNγ et l'IL-2 (Hahn, Stahl et al. 2013). Pour étayer cette hypothèse, il conviendrait de faire un dosage *in vitro* de la forme soluble de GARP dans une culture de LB CD24^{hi} CD38^{hi} mais également de vérifier l'effet d'un anticorps bloquant dirigé contre GARP sur la prolifération et la réponse cytokinique de LT CD4⁺ activés placés en coculture avec ces LB.

Bien que nos résultats ne permettent pas de mettre en lien un rôle spécifique de GARP avec l'expression d'IL-10, il est intéressant de noter que les LB humains surexprimant l'IL-10 après avoir été transfectés, présentent une augmentation significative de l'expression de GARP par rapport à des cellules non transfectées (Stanic, van de Veen et al. 2015). Ce résultat montre d'une part que la protéine

GARP peut être exprimée par les LB, et permet d'autre part de suggérer l'intérêt potentiel de cette molécule pour la caractérisation de LB producteurs d'IL-10.

Dans ce travail, nous montrons pour la première fois une expression de GARP par les LB transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi}, cependant le rôle de cette protéine au sein de ces cellules reste encore à préciser.

Concernant l'expression d'ICOS-L, les résultats de cytométrie en flux mettent en valeur une plus forte expression de cette protéine sur les cellules CD24^{hi} CD38^{hi}, celle-ci étant également corrélée à une expression plus importante de l'IL-10 par ces cellules. ICOS-L est une molécule de costimulation appartenant à la famille de CD28. Il a été précédemment montré que la voie de costimulation ICOS/ICOS-L joue un rôle clé dans la fonction suppressive des Treg Foxp3⁺ et leur expansion chez la souris (Kornete, Sgouroudis et al. 2012). ICOS-L est exprimé majoritairement sur les cellules dendritiques, macrophages et certaines cellules épithéliales. Néanmoins, ICOS-L a été aussi retrouvé sur les LB de patients atteints de lymphome folliculaire. Ces cellules sont, entre autre, capables d'induire *in vitro* la génération de Treg CD25^{hi} Foxp3⁺ (LE, Thibult et al. 2016). D'autre part, la présence d'ICOS-L a également été rapportée sur des LB humains activés via la voie CD40/CD40L. Dans cette étude, la coculture de ces LB allogéniques avec des LT CD4⁺ CD25⁻ naïfs permet d'induire *in vitro* des Treg Foxp3⁺ exprimant fortement le récepteur ICOS. Dans cette expérience, l'ajout d'une protéine de fusion bloquant le récepteur ICOS engendre à la fois une augmentation de la mortalité des Treg et une diminution du nombre de Treg induits par les LB (Zheng, Chan et al. 2013). Ces travaux montrent que les LB sont d'une grande importance dans la survie et la génération de Treg, notamment via la voie ICOS/ICOS-L et appuie le fait que les LB CD24^{hi} CD38^{hi}

exprimant ICOS-L pourraient avoir un rôle dans le maintien de la tolérance. Cependant la difficulté d'accès à un nombre suffisant de ces cellules chez l'homme limite considérablement les investigations.

ICOS qui est principalement exprimé chez les CD4 activés et les Treg est également impliqué dans la production d'IL-10 par les CD4 mais aussi par les Treg (Tr1) (Ito, Yang et al. 2007). Ces données suggèrent l'hypothèse que les LB exprimant ICOS-L pourraient participer indirectement au renforcement du contrôle de la réponse immune par l'induction de LT IL-10⁺ via la voie de costimulation ICOS/ICOS-L. Nos résultats montrant un enrichissement en cellules IL-10⁺ parmi les LB CD24^{hi} CD38^{hi} laissent penser que ces cellules pourraient également jouer un rôle indirect dans le maintien de la tolérance via un mécanisme IL-10 dépendant.

Nous avons également mis en évidence une proportion plus importante de cellules exprimant CD1b dans les LB transitionnels CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant l'IL-10. Les protéines CD1(a-e) sont exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes comme les DC, les cellules de Langerhans, les LB, et ont un rôle de présentation des antigènes lipidiques ou glycolipidiques (Dougan, Kaser et al. 2007). Bien que l'expression de ce marqueur ne soit pas exclusive des LB IL-10⁺, nous montrons qu'il est préférentiellement exprimé sur les LB transitionnels. Ce marqueur pourrait donc jouer un rôle dans les propriétés régulatrices des LB CD24^{hi} CD38^{hi}. D'autre part, le niveau élevé d'expression du marqueur CD1d sur les LB est un des premiers marqueurs phénotypiques décrit pour caractériser les Breg murins producteur d'IL-10 (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002). Néanmoins, il n'a pas été retrouvé de population équivalente chez l'homme.

Nos résultats ont montré que les LB CD24^{hi} CD38^{hi} CD1b⁺ avaient une meilleure capacité immunosuppressive que les LB CD24^{hi} CD38^{hi} CD1b⁻, CD24^{int} CD38^{int} ou CD24⁺ CD38⁻. Cette immunosuppression passe notamment par leur capacité à inhiber la sécrétion d'IFN γ par les cellules effectrices. Cependant, dans nos expériences de coculture, bien que nous ayons utilisé un anticorps anti-CD3 pour la stimulation des LT, la présence d'autres types cellulaires dans le milieu tels que monocytes et macrophages ne permet pas de conclure précisément sur la cible cellulaire de cette inhibition. Bien que cela supporte le fait que CD1b soit associé à une fonction régulatrice chez ces cellules, ces résultats sont à interpréter avec prudence puisque CD1b n'est pas un marqueur exclusif des cellules CD24^{hi} CD38^{hi}.

2 Immunomonitoring en transplantation

Malgré les progrès effectués dans la détermination des compatibilités immunologiques et parallèlement dans le développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs, le rejet humoral et l'apparition de DSA restent de sérieux problèmes en transplantation rénale. La surveillance des signes de rejet aigu et de la fonction rénale au cours du temps après transplantation reste indispensable. Typiquement, la fonction rénale est évaluée par mesure du taux de créatinine dans le sérum des patients. Cependant, cette valeur n'est pas spécifique d'un épisode de rejet. Aujourd'hui, la biopsie du greffon reste la méthode de référence pour évaluer le degré de tolérance à une allogreffe mais cette méthode est invasive et peut être la source de complications. C'est pourquoi, il apparaît donc important d'identifier des biomarqueurs non invasifs susceptibles de renseigner sur la nature de la réponse allo-immune d'un receveur vis-à-vis de l'organe transplanté. Nos travaux réalisés

chez les patients traités par belatacept ne développant pas ou peu de DSA mettent en évidence, d'une part une proportion plus importante de cellules CD24^{hi} CD38^{hi} exprimant la cytokine régulatrice IL-10 et d'autre part une augmentation significative de l'expression du marqueur CD1b sur les cellules CD24^{hi} CD38^{hi}. L'identification de ce nouveau marqueur dont nous avons montré l'association à une fonction régulatrice ainsi que l'identification d'autres marqueurs associés à ces cellules comme CD9, CD10, GARP et ICOS-L, pourrait être d'un grand intérêt dans la compréhension et la prédiction du devenir de l'allogreffe et notamment de la réponse humorale à ces différents stades (développement de DSA, rejet humoral aigu et chronique). Ces biomarqueurs pourraient justifier une intervention thérapeutique ciblée et précoce et participer à une meilleure individualisation des schémas d'immunosuppression.

3 Lymphocytes B et autres cytokines immuno-modulatrices

De plus en plus de travaux évoquent que des mécanismes d'immunosuppression autres que l'IL-10 pourraient être mis en jeu par les Breg. Nos résultats préliminaires montrant la co-expression des gènes EBI3 et p35 par les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} suggèrent que d'autres cytokines immunorégulatrices comme l'IL35 pourraient également participer aux capacités régulatrices de ces cellules. L'absence de détection de p28 par RTqPCR dans les 3 populations de LB n'exclue pas complètement la possibilité d'une expression d'IL-27 mais supporte très fortement l'hypothèse d'une expression d'IL-35. Cependant, étant donné le peu d'outils moléculaires existants chez l'homme pour caractériser ces cytokines, il est encore

difficile de déterminer avec certitude si l'expression de ces molécules reflète une expression d'IL-35 ou d'IL-27.

Le rôle et l'expression de l'IL-35 ont déjà été montrés dans les LB murins. Il est en effet mis en évidence que l'utilisation d'IL-35 recombinante est capable d'induire à la fois des Breg IL-10⁺ et IL-35⁺. Ces observations suggèrent un effet autocrine de l'IL-35 à travers lequel cette cytokine permettrait de favoriser la production d'IL-10 par les LB eux-mêmes (Figure 15). Le fait que le transfert adoptif de LB déficients pour l'IL-10 stimulés avec de l'IL-35 abroge l'effet suppresseur des LB dans un modèle d'uvéite par rapport aux LB WT, qui eux sont capables de supprimer la maladie *in vivo*, renforce encore cette hypothèse (Wang, Yu et al. 2014). Ces données suggèrent donc que l'IL-10 reste le médiateur final dans l'effet immunosuppresseur des LB.

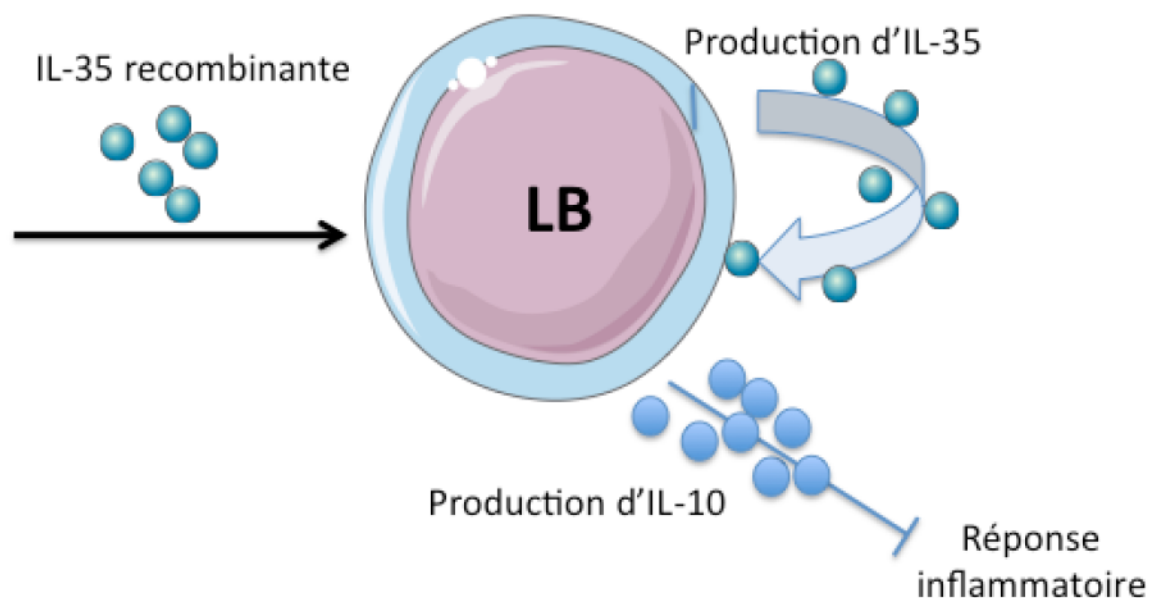


Figure 15 : Schéma théorique de l'effet synergique de l'IL-35 sur la production d'IL-10 par les LB

De façon intéressante, l'analyse transcriptomique sur les 3 populations de LB triées montre une plus forte expression dans les LB CD24^{hi} CD38^{hi} de la chaîne gp130

(résultat non présenté) composant le récepteur membranaire de l'IL-35. La sur expression du récepteur de l'IL-35 dans ces cellules pourrait donner un avantage compétitif à la fixation de l'IL-35 présent dans le milieu et donc favoriser la production d'IL-10 par ces cellules. Afin de vérifier l'hypothèse d'un effet autocrine de l'IL-35 sur les LB CD24^{hi} CD38^{hi}, il serait possible d'utiliser un anticorps neutralisant dirigé contre la protéine gp130 *in vitro* et de mesurer la quantités d'IL-10 produite après activation dans les surnageants de culture. En parallèle, il serait également envisageable de vérifier directement l'effet de cette neutralisation sur l'intensité de la réponse T en bloquant l'activité de gp130 dans une co-culture de LB CD24^{hi} CD38^{hi} et de LT CD4⁺ CD25⁻ activés, ce qui nous donnerait des indications sur le rôle joué par l'IL-35 dans la fonction immunosuppressive de ces LB.

Nos résultats restent encore à un stade préliminaire et sont en cours de développement au laboratoire. D'autres investigations sont nécessaires pour identifier clairement si l'expression d'EBI3 observée reflète une sécrétion d'IL-35. La réalisation d'un test fonctionnel bloquant l'expression ou l'activité d'EBI3 serait également nécessaire pour confirmer un rôle de cette molécule dans la fonction suppressive des cellules CD24^{hi} CD38^{hi}.

4 Conclusion et perspectives

Ces travaux s'inscrivent à la fois dans un contexte fondamental qui a pour objectif d'améliorer la caractérisation des Breg CD24^{hi} CD38^{hi} mais aussi dans un contexte clinique pour mieux comprendre et appréhender le rôle de ces cellules dans le devenir d'une allogreffe. Bien que les marqueurs mis en évidence dans cette étude ne soient pas uniquement spécifiques de la population CD24^{hi} CD38^{hi}, nous avons

pu montrer que leur présence est corrélée à une expression accrue d'IL-10 et que la présence de CD1b est associée à une augmentation de la capacité suppressive de ces cellules ainsi qu'à un meilleur pronostic clinique chez des patients traités par le Belatacept. D'autre part, le déficit de ces cellules a été évoqué dans de nombreuses pathologies auto-immunes et à l'inverse, la présence de ces cellules est associée à un état de tolérance en transplantation. Il paraît donc évident que la stratégie visant la déplétion des LB doit être reconsidérée notamment en transplantation, puisque cette déplétion prive également l'organisme de LB aux capacités immunosuppressives dont le rôle dans la tolérance immune a été conforté dans ce travail.

L'utilisation des Breg représente une perspective thérapeutique évidente, mais la difficulté de la caractérisation de ces cellules associée à un accès limité chez l'homme restreint encore considérablement ce type de projets.

De nombreuses questions restent encore à élucider, et notamment celle qui permettrait de savoir si, à l'instar des Treg avec Foxp3, il existe un facteur de transcription spécifique de cette population régulatrice que sont les Breg. Le devenir de ces cellules *in vivo* est également encore trop peu étudié et nous ne savons pas clairement si ces cellules sont capables de se différencier vers un stade terminal (plasmablaste) et/ou si ces cellules pourraient être les précurseurs d'autres Breg matures comme les LB CD24^{hi} D27⁺ décrits également comme des cellules productrices d'IL-10. La question d'une fonction régulatrice spécifique d'un antigène reste également ouverte.

Aujourd'hui la sécrétion d'IL-10 est le principal mécanisme d'immunosuppression décrit dans les LB humains CD24^{hi} CD38^{hi}, cependant, il est néanmoins hautement

probable que ces cellules utilisent d'autres voies de régulation qui pourraient passer par la sécrétion d'autres cytokines immunosuppressives comme l'IL-27 ou l'IL-35 ou bien par un contact cellulaire via les molécules de costimulation comme ICOS-L.

Il apparait donc comme fondamental d'améliorer la poursuite de la caractérisation de ces cellules afin de mieux comprendre leur fonctionnement et les facteurs moléculaires ou environnementaux permettant leur activation. Ces futures études rendront ainsi possible le développement de nouvelles stratégies ciblant spécifiquement ces cellules afin de permettre un meilleur contrôle de la réponse immune en transplantation ainsi que dans de nombreuses maladies auto-immunes.

BIBLIOGRAPHIE

- Aalberse, R. C., S. O. Stapel, J. Schuurman and T. Rispens (2009). "Immunoglobulin G4: an odd antibody." Clin Exp Allergy **39**(4): 469-477.
- Agrawal, S., S. A. Smith, S. G. Tangye and W. A. Sewell (2013). "Transitional B cell subsets in human bone marrow." Clin Exp Immunol **174**(1): 53-59.
- Alegre, M. L., S. Florquin and M. Goldman (2007). "Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment." Curr Opin Immunol **19**(5): 563-568.
- Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell (2006). "Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases." Nat Rev Immunol **6**(3): 205-217.
- Amu, S., S. P. Saunders, M. Kronenberg, N. E. Mangan, A. Atzberger and P. G. Fallon (2010). "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." J Allergy Clin Immunol **125**(5): 1114-1124.e1118.
- Anthony, R. M., F. Wermeling, M. C. Karlsson and J. V. Ravetch (2008). "Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19571-19578.
- Aybar, L. T., J. G. McGregor, S. L. Hogan, Y. Hu, C. E. Mendoza, E. J. Brant, C. J. Poulton, C. D. Henderson, R. J. Falk and D. O. Bunch (2015). "Reduced CD5(+) CD24(hi) CD38(hi) and interleukin-10(+) regulatory B cells in active anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis permit increased circulating autoantibodies." Clin Exp Immunol **180**(2): 178-188.
- Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Brière, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset and S. Saeland (1994). "The CD40 antigen and its ligand." Annu Rev Immunol **12**: 881-922.
- Banchereau, J., V. Pascual and A. O'Garra (2012). "From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines." Nat Immunol **13**(10): 925-931.
- Bankoti, R., K. Gupta, A. Levchenko and S. Stäger (2012). "Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection." J Immunol **188**(8): 3961-3971.
- Barr, T. A., S. Brown, G. Ryan, J. Zhao and D. Gray (2007). "TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells." Eur J Immunol **37**(11): 3040-3053.
- Bartram, U. and C. P. Speer (2004). "The role of transforming growth factor beta in lung development and disease." Chest **125**(2): 754-765.
- Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper and M. G. Roncarolo (2006). "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients." J Immunol **177**(12): 8338-8347.

Beebe, A. M., D. J. Cua and R. de Waal Malefyt (2002). "The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS)." Cytokine Growth Factor Rev **13**(4-5): 403-412.

Blair, P. A., K. A. Chavez-Rueda, J. G. Evans, M. J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2009). "Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice." J Immunol **182**(6): 3492-3502.

Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." Immunity **32**(1): 129-140.

Bodhankar, S., D. Galipeau, A. A. Vandembark and H. Offner (2013). "PD-1 Interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B-cells Mediates Protective Effects of Estrogen against EAE." J Clin Cell Immunol **4**(3): 143.

Boonstra, A., R. Rajsbaum, M. Holman, R. Marques, C. Asselin-Paturel, J. P. Pereira, E. E. Bates, S. Akira, P. Vieira, Y. J. Liu, G. Trinchieri and A. O'Garra (2006). "Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals." J Immunol **177**(11): 7551-7558.

Bosma, A., A. Abdel-Gadir, D. A. Isenberg, E. C. Jury and C. Mauri (2012). "Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells." Immunity **36**(3): 477-490.

Bouaziz, J. D., K. Yanaba and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation." Immunol Rev **224**: 201-214.

Boumendjel, A., L. Tawk, R. e. W. Malefijt, V. Boulay, H. Yssel and J. Pène (2006). "IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells." Eur Cytokine Netw **17**(4): 281-289.

Braza, F., J. Chesne, M. Durand, S. Dirou, C. Brosseau, G. Mahay, M. A. Cheminant, A. Magnan and S. Brouard (2015). "A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation." Allergy **70**(11): 1421-1431.

Brooks, D. G., K. B. Walsh, H. Elsaesser and M. B. Oldstone (2010). "IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3018-3023.

Cai, J. and P. I. Terasaki (2005). "Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment." Hum Immunol **66**(4): 334-342.

Capolunghi, F., S. Cascioli, E. Giorda, M. M. Rosado, A. Plebani, C. Auriti, G. Seganti, R. Zuntini, S. Ferrari, M. Cagliuso, I. Quinti and R. Carsetti (2008). "CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies." J Immunol **180**(2): 800-808.

Caraux, A., B. Klein, B. Paiva, C. Bret, A. Schmitz, G. M. Fuhler, N. A. Bos, H. E. Johnsen, A. Orfao, M. Perez-Andres and M. S. C. Network (2010). "Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells." Haematologica **95**(6): 1016-1020.

Cariappa, A., I. B. Mazo, C. Chase, H. N. Shi, H. Liu, Q. Li, H. Rose, H. Leung, B. J. Cherayil, P. Russell, U. von Andrian and S. Pillai (2005). "Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes." Immunity **23**(4): 397-407.

Carsetti, R., G. Köhler and M. C. Lamers (1995). "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." J Exp Med **181**(6): 2129-2140.

Carter, N. A., E. C. Rosser and C. Mauri (2012). "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." Arthritis Res Ther **14**(1): R32.

Chen, M., L. Zhang, Y. Ren, K. Zhang, Y. Yang, Y. Fang, X. Yan, D. Peng, C. Gao and S. Li (2015). "Defective Function of CD24(+)CD38(+) Regulatory B Cells in Ankylosing Spondylitis." DNA Cell Biol **35**(2):88-95.

Cherukuri, A., D. M. Rothstein, B. Clark, C. R. Carter, A. Davison, M. Hernandez-Fuentes, E. Hewitt, A. D. Salama and R. J. Baker (2014). "Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells." J Am Soc Nephrol **25**(7): 1575-1585.

Chung, J. B., M. Silverman and J. G. Monroe (2003). "Transitional B cells: step by step towards immune competence." Trends Immunol **24**(6): 343-349.

Collison, L. W. and D. A. Vignali (2008). "Interleukin-35: odd one out or part of the family?" Immunol Rev **226**: 248-262.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.

Correale, J., M. Farez and G. Razzitte (2008). "Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells." Ann Neurol **64**(2): 187-199.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-1265.

Deng, S., D. J. Moore, X. Huang, M. M. Lian, M. Mohiuddin, E. Velededeoglu, M. K. Lee, S. Sonawane, J. Kim, J. Wang, H. Chen, S. A. Corfe, C. Paige, M. Shlomchik, A. Caton and J. F. Markmann (2007). "Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes." J Immunol **178**(10): 6028-6032.

Devergne, O., M. Birkenbach and E. Kieff (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12041-12046.

Devergne, O., M. Hummel, H. Koeppen, M. M. Le Beau, E. C. Nathanson, E. Kieff and M. Birkenbach (1996). "A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes." J Virol **70**(2): 1143-1153.

DiLillo, D. J., T. Matsushita and T. F. Tedder (2010). "B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer." Ann N Y Acad Sci **1183**: 38-57.

Ding, Q., M. Yeung, G. Camirand, Q. Zeng, H. Akiba, H. Yagita, G. Chalasani, M. H. Sayegh, N. Najafian and D. M. Rothstein (2011). "Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice." J Clin Invest **121**(9): 3645-3656.

Diveu, C., M. J. McGeachy, K. Boniface, J. S. Stumhofer, M. Sathe, B. Joyce-Shaikh, Y. Chen, C. M. Tato, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, C. A. Hunter, D. J. Cua and R. A. Kastelein (2009). "IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells." J Immunol **182**(9): 5748-5756.

Dixon, K. O., J. O'Flynn, S. W. van der Kooij and C. van Kooten (2014). "Phagocytosis of apoptotic or necrotic cells differentially regulates the transcriptional expression of IL-12 family members in dendritic cells." J Leukoc Biol **96**(2): 313-324.

Dokmeci, E., L. Xu, E. Robinson, K. Golubets, K. Bottomly and C. A. Herrick (2011). "EBI3 deficiency leads to diminished T helper type 1 and increased T helper type 2 mediated airway inflammation." Immunology **132**(4): 559-566.

Dougan, S. K., A. Kaser and R. S. Blumberg (2007). "CD1 expression on antigen-presenting cells." Curr Top Microbiol Immunol **314**: 113-141.

Einecke, G., B. Sis, J. Reeve, M. Mengel, P. M. Campbell, L. G. Hidalgo, B. Kaplan and P. F. Halloran (2009). "Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure." Am J Transplant **9**(11): 2520-2531.

Ekberg, H., H. Tedesco-Silva, A. Demirbas, S. Vítko, B. Nashan, A. Gürkan, R. Margreiter, C. Hugo, J. M. Grinyó, U. Frei, Y. Vanrenterghem, P. Daloz, P. F. Halloran and E.-S. Study (2007). "Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation." N Engl J Med **357**(25): 2562-2575.

El Kasmi, K. C., J. Holst, M. Coffre, L. Mielke, A. de Pauw, N. Lhocine, A. M. Smith, R. Rutschman, D. Kaushal, Y. Shen, T. Suda, R. P. Donnelly, M. G. Myers, W. Alexander, D. A. Vignali, S. S. Watowich, M. Ernst, D. J. Hilton and P. J. Murray (2006). "General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response." J Immunol **177**(11): 7880-7888.

Evans, J. G., K. A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D. J. Rawlings, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2007). "Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis." J Immunol **178**(12): 7868-7878.

Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-1212.

Fehr, T., B. Rüssi, A. Fischer, H. Hopfer, R. P. Wüthrich and A. Gaspert (2009). "Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection." Transplantation **87**(12): 1837-1841.

Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." Nat Immunol **3**(10): 944-950.

Fitzgerald, D. C., G. X. Zhang, M. El-Behi, Z. Fonseca-Kelly, H. Li, S. Yu, C. J. Saris, B. Gran, B. Ciric and A. Rostami (2007). "Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells." Nat Immunol **8**(12): 1372-1379.

Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." Sci Transl Med **5**(173): 173ra123.

Fu, Y. X., G. Huang, Y. Wang and D. D. Chaplin (1998). "B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion." J Exp Med **187**(7): 1009-1018.

Fuchs, E. J. and P. Matzinger (1992). "B cells turn off virgin but not memory T cells." Science **258**(5085): 1156-1159.

Gonzalez, M., F. Mackay, J. L. Browning, M. H. Kosco-Vilbois and R. J. Noelle (1998). "The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles." J Exp Med **187**(7): 997-1007.

Gray, M., K. Miles, D. Salter, D. Gray and J. Savill (2007). "Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14080-14085.

Grönwall, C., E. Akhter, C. Oh, R. W. Burlingame, M. Petri and G. J. Silverman (2012). "IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE." Clin Immunol **142**(3): 390-398.

Haas, K. M., R. Watanabe, T. Matsushita, H. Nakashima, N. Ishiura, H. Okochi, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2010). "Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice." J Immunol **184**(9): 4789-4800.

Hagn, M., E. Schwesinger, V. Ebel, K. Sontheimer, J. Maier, T. Beyer, T. Syrovets, Y. Laumonnier, D. Fabricius, T. Simmet and B. Jahrsdörfer (2009). "Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21." J Immunol **183**(3): 1838-1845.

Hahn, S. A., H. F. Stahl, C. Becker, A. Correll, F. J. Schneider, A. Tuettenberg and H. Jonuleit (2013). "Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4⁺ T cells." Blood **122**(7): 1182-1191.

Hahne, M., T. Renno, M. Schroeter, M. Irmeler, L. French, T. Bornard, H. R. MacDonald and J. Tschopp (1996). "Activated B cells express functional Fas ligand." Eur J Immunol **26**(3): 721-724.

Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain and F. E. Lund (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." Nat Immunol **1**(6): 475-482.

Hegde, S., J. K. Mellon, S. L. Hargrave and J. Y. Niederkorn (2002). "Effect of alloantibodies on corneal allograft survival." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(4): 1012-1018.

Heidt, S., D. L. Roelen, C. Eijssink, M. Eikmans, C. van Kooten, F. H. Claas and A. Mulder (2010). "Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help." Clin Exp Immunol **159**(2): 199-207.

Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." J Immunol **173**(8): 4828-4837.

Hidalgo, L. G., B. Sis, J. Sellares, P. M. Campbell, M. Mengel, G. Einecke, J. Chang and P. F. Halloran (2010). "NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection." Am J Transplant **10**(8): 1812-1822.

Hippen, B. E., A. DeMattos, W. J. Cook, C. E. Kew and R. S. Gaston (2005). "Association of CD20⁺ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts." Am J Transplant **5**(9): 2248-2252.

Hoffman, W., F. G. Lakkis and G. Chalasani (2016). "B Cells, Antibodies, and More." Clin J Am Soc Nephrol **11**(1): 137-154.

Horikawa, M., V. Minard-Colin, T. Matsushita and T. F. Tedder (2011). "Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice." J Clin Invest **121**(11): 4268-4280.

Horikawa, M., E. T. Weimer, D. J. DiLillo, G. M. Venturi, R. Spolski, W. J. Leonard, M. T. Heise and T. F. Tedder (2013). "Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice." J Immunol **190**(3): 1158-1168.

Hou, Y. M., J. Dong, M. Y. Liu and S. Yu (2016). "Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 in cervical cancer: Association with clinicopathological parameters and prognosis." Oncol Lett **11**(1): 330-334.

Hussain, S. and T. L. Delovitch (2007). "Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner." J Immunol **179**(11): 7225-7232.

Ito, T., M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu and M. Gilliet (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." J Exp Med **204**(1): 105-115.

Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." Blood **117**(2): 530-541.

Jahrsdörfer, B., S. E. Blackwell, J. E. Wooldridge, J. Huang, M. W. Andreski, L. S. Jacobus, C. M. Taylor and G. J. Weiner (2006). "B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation." Blood **108**(8): 2712-2719.

Kaiser, F., D. Cook, S. Papoutsopoulou, R. Rajsbaum, X. Wu, H. T. Yang, S. Grant, P. Ricciardi-Castagnoli, P. N. Tsihchlis, S. C. Ley and A. O'Garra (2009). "TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells." J Exp Med **206**(9): 1863-1871.

Kaku, H., K. F. Cheng, Y. Al-Abed and T. L. Rothstein (2014). "A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production." J Immunol **193**(12): 5904-5913.

Kamar, N., A. Del Bello, N. Congy-Jolivet, C. Guilbeau-Frugier, I. Cardeau-Desangles, M. Fort, L. Esposito, J. Guitard, X. Gamé and L. Rostaing (2013). "Incidence of donor-specific antibodies in kidney transplant patients following conversion to an everolimus-based calcineurin inhibitor-free regimen." Clin Transplant **27**(3): 455-462.

Karulin, A. Y., M. D. Hesse, M. Tary-Lehmann and P. V. Lehmann (2000). "Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity." J Immunol **164**(4): 1862-1872.

Katz, J. B., A. J. Muller and G. C. Prendergast (2008). "Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape." Immunol Rev **222**: 206-221.

Katz, S. I., D. Parker and J. L. Turk (1974). "B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions." Nature **251**(5475): 550-551.

Khan, A. R., E. Hams, A. Floudas, T. Sparwasser, C. T. Weaver and P. G. Fallon (2015). "PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity." Nat Commun **6**: 5997.

Khoder, A., A. Sarvaria, A. Alsuliman, C. Chew, T. Sekine, N. Cooper, S. Mielke, H. de Lavallade, M. Muftuoglu, I. Fernandez Curbelo, E. Liu, P. A. Muraro, A. Alousi, K. Stringaris, S. Parmar, N. Shah, H. Shaim, E. Yvon, J. Mollrem, R. Rouce, R. Champlin, I. McNiece, C. Mauri, E. J. Shpall and K. Rezvani (2014). "Regulatory B-Cells Are Enriched Within the IgM Memory and Transitional Subsets in Healthy Donors but Deficient In Chronic Graft-Versus-Host Disease." Blood **124**(13):2034-45.

Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, V. P. Petersen and O. Fjeldborg (1966). "Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells." Lancet **2**(7465): 662-665.

Kopchaliiska, D., A. A. Zachary, R. A. Montgomery and M. S. Leffell (2009). "Reconstitution of peripheral allospecific CD19+ B-cell subsets after B-lymphocyte depletion therapy in renal transplant patients." Transplantation **87**(9): 1394-1401.

Kornete, M., E. Sgouroudis and C. A. Piccirillo (2012). "ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice." J Immunol **188**(3): 1064-1074.

Korniotis, S., C. Gras, H. Letscher, R. Montandon, J. Mégret, S. Siegert, S. Ezine, P. G. Fallon, S. A. Luther, S. Fillatreau and F. Zavala (2016). "Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells." Nat Commun **7**: 12134.

Lagaudrière-Gesbert, C., F. Le Naour, S. Lebel-Binay, M. Billard, E. Lemichez, P. Boquet, C. Boucheix, H. Conjeaud and E. Rubinstein (1997). "Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity." Cell Immunol **182**(2): 105-112.

Lal, G., Y. Nakayama, A. Sethi, A. K. Singh, B. E. Burrell, N. Kulkarni, C. C. Brinkman, D. Iwami, T. Zhang and J. S. Bromberg (2015). "Interleukin-10 From Marginal Zone Precursor B-Cell Subset Is Required for Costimulatory Blockade-Induced Transplantation Tolerance." Transplantation **99**(9): 1817-1828.

Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderón Gómez, C. H. Sweenie, Y. Hao, A. A. Freitas, U. Steinhoff, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2008). "TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity." J Immunol **180**(7): 4763-4773.

Larousserie, F., E. Bardel, A. Coulomb L'Herminé, D. Canioni, N. Brousse, R. A. Kastelein and O. Devergne (2006). "Variable expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 during normal B-cell differentiation and among B-cell lymphomas." J Pathol **209**(3): 360-368.

Larousserie, F., P. Charlot, E. Bardel, J. Froger, R. A. Kastelein and O. Devergne (2006). "Differential effects of IL-27 on human B cell subsets." J Immunol **176**(10): 5890-5897.

Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris and J. M. Austyn (1990). "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." J Exp Med **172**(5): 1483-1493.

LE, K. S., M. L. Thibult, S. Just-Landi, S. Pastor, F. Gondois-Rey, S. Granjeaud, F. Broussais, R. Bouabdallah, R. Colisson, C. Caux, C. Menetrier-Caux, D. Leroux, L. Xerri and D. Olive (2016). "Follicular B lymphomas generate regulatory T cells via the ICOS/ICOSL pathway and are susceptible to treatment by anti-ICOS/ICOSL therapy." Cancer Res.

Le Texier, L., P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Merieau, T. Quillard, B. Charreau, J. P. Soulillou, M. C. Cuturi, S. Brouard and E. Chiffoleau (2011). "Long-term allograft

tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile." Am J Transplant **11**(3): 429-438.

LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." Blood **112**(5): 1570-1580.

Lebranchu, Y., A. Thierry, E. Thervet, M. Büchler, I. Etienne, P. F. Westeel, B. Hurault de Ligny, B. Moulin, J. P. Rérolle, T. Frouget, S. Girardot-Seguín and O. Toupance (2011). "Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF- four-year results of the Postconcept study." Am J Transplant **11**(8): 1665-1675.

Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." J Exp Med **155**(1): 31-41.

Lee, J., S. Kuchen, R. Fischer, S. Chang and P. E. Lipsky (2009). "Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population." J Immunol **182**(7): 4116-4126.

Lee, K. M., J. I. Kim, R. Stott, J. Soohoo, M. R. O'Connor, H. Yeh, G. Zhao, P. Eliades, C. Fox, N. Cheng, S. Deng and J. F. Markmann (2012). "Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells." Am J Transplant **12**(8): 2072-2078.

Lee, K. M., R. T. Stott, G. Zhao, J. Soohoo, W. Xiong, M. M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, S. Deng, H. Yeh, J. F. Markmann and J. I. Kim (2014). "TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance." Eur J Immunol **44**(6): 1728-1736.

Lefaucheur, C., A. Loupy, G. S. Hill, J. Andrade, D. Nochy, C. Antoine, C. Gautreau, D. Charron, D. Glotz and C. Suberbielle-Boissel (2010). "Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation." J Am Soc Nephrol **21**(8): 1398-1406.

Leibler, C., M. Matignon, C. Pilon, F. Montespan, J. Bigot, P. Lang, E. D. Carosella, J. Cohen, N. Rouas-Freiss, P. Grimbert and C. Menier (2014). "Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naive and transitional B cells." Am J Transplant **14**(5): 1173-1182.

Lemoine, S., A. Morva, P. Youinou and C. Jamin (2011). "Human T cells induce their own regulation through activation of B cells." J Autoimmun **36**(3-4): 228-238.

Li, M. O., Y. Y. Wan and R. A. Flavell (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." Immunity **26**(5): 579-591.

Li, W., X. Tian, X. Lu, Q. Peng, X. Shu, H. Yang, Y. Li, Y. Wang, X. Zhang, Q. Liu and G. Wang (2016). "Significant decrease in peripheral regulatory B cells is an immunopathogenic feature of dermatomyositis." Sci Rep **6**: 27479.

Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T. F. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G. U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P.

Moller, H. Schrezenmeier and B. Jahrsdorfer (2013). "Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." Cancer Res **73**(8): 2468-2479.

Litvack, M. L., M. Post and N. Palaniyar (2011). "IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages." PLoS One **6**(3): e17223.

Liu, B. S., Y. Cao, T. W. Huizinga, D. A. Hafler and R. E. Toes (2014). "TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells." Eur J Immunol **44**(7): 2121-2129.

Liu, W. H., J. J. Liu, J. Wu, L. L. Zhang, F. Liu, L. Yin, M. M. Zhang and B. Yu (2013). "Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway." PLoS One **8**(1): e55487.

Liu, Y., Y. Chen, Z. Li, Y. Han, Y. Sun, Q. Wang, B. Liu and Z. Su (2013). "Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in Plasmodium berghei infected mice." Eur J Immunol **43**(11): 2907-2918.

Liubchenko, G. A., H. C. Appleberry, V. M. Holers, N. K. Banda, V. C. Willis and T. Lyubchenko (2012). "Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile." J Autoimmun **38**(4): 293-303.

Lobo, P. I., A. Bajwa, K. H. Schlegel, J. Vengal, S. J. Lee, L. Huang, H. Ye, U. Deshmukh, T. Wang, H. Pei and M. D. Okusa (2012). "Natural IgM anti-leukocyte autoantibodies attenuate excess inflammation mediated by innate and adaptive immune mechanisms involving Th-17." J Immunol **188**(4): 1675-1685.

Loupy, A., C. Suberbielle-Boissel, J. Zuber, D. Anglicheau, M. O. Timsit, F. Martinez, E. Thervet, P. Bruneval, D. Charron, G. S. Hill, D. Nochy and C. Legendre (2010). "Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study." Transplantation **89**(11): 1403-1410.

Lundy, S. K. and D. A. Fox (2009). "Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis." Arthritis Res Ther **11**(4): R128.

Mann, M. K., K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan and B. N. Dittel (2007). "B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **178**(6): 3447-3456.

Manzo, A., S. Paoletti, M. Carulli, M. C. Blades, F. Barone, G. Yanni, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, R. Caporali, C. Montecucco, M. Ugucioni and C. Pitzalis (2005). "Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis." Eur J Immunol **35**(5): 1347-1359.

Marie-Cardine, A., F. Divay, I. Dutot, A. Green, A. Perdrix, O. Boyer, N. Contentin, H. Tilly, F. Tron, J. P. Vannier and S. Jacquot (2008). "Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation." Clin Immunol **127**(1): 14-25.

Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-835.

Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S. L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki and Y. Baba (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." Immunity **41**(6): 1040-1051.

Matsumoto, M., Y. Fujii, A. Baba, M. Hikida, T. Kurosaki and Y. Baba (2011). "The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production." Immunity **34**(5): 703-714.

Matsushita, T., K. Yanaba, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression." J Clin Invest **118**(10): 3420-3430.

Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq and M. Londei (2003). "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells." J Exp Med **197**(4): 489-501.

Mei, H. E., D. Frölich, C. Giesecke, C. Loddenkemper, K. Reiter, S. Schmidt, E. Feist, C. Daridon, H. P. Tony, A. Radbruch and T. Dörner (2010). "Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab." Blood **116**(24): 5181-5190.

Minagawa, R., S. Okano, Y. Tomita, K. Kishihara, H. Yamada, K. Nomoto, M. Shimada, Y. Maehara, K. Sugimachi and Y. Yoshikai (2004). "The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen." Transplantation **78**(6): 799-806.

Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg and A. K. Bhan (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." Immunity **16**(2): 219-230.

Montandon, R., S. Korniotis, E. Layseca-Espinosa, C. Gras, J. Megret, S. Ezine, M. Dy and F. Zavala (2013). "Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): E2199-2208.

Moreau, A., P. A. Blair, J. G. Chai, K. Ratnasothy, E. Stolarczyk, R. Alhabbab, C. L. Rackham, P. M. Jones, L. Smyth, R. Elgueta, J. K. Howard, R. I. Lechler and G. Lombardi (2015). "Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival." Eur J Immunol **45**(3): 843-853.

Morris, P. J., G. M. Williams, D. M. Hume, M. R. Mickey and P. I. Terasaki (1968). "Serotyping for homotransplantation. XII. Occurrence of cytotoxic antibodies following kidney transplantation in man." Transplantation **6**(3): 392-399.

Nagata, S. and T. Suda (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." Immunol Today **16**(1): 39-43.

Natarajan, P., A. Singh, J. T. McNamara, E. R. Secor, L. A. Guernsey, R. S. Thrall and C. M. Schramm (2012). "Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a

murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF- β , and co-localize with CD4+Foxp3+ T cells." Mucosal Immunol **5**(6): 691-701.

Neta, R. and S. B. Salvin (1974). "Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity." J Immunol **113**(6): 1716-1725.

Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka and V. L. Seyfert-Margolis (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-1847.

Newell, K. A., A. Asare, I. Sanz, C. Wei, A. Rosenberg, Z. Gao, S. Kanaparthi, S. Asare, N. Lim, M. Stahly, M. Howell, S. Knechtle, A. Kirk, W. H. Marks, T. Kawai, T. Spitzer, N. Tolkoff-Rubin, M. Sykes, D. H. Sachs, A. B. Cosimi, W. J. Burlingham, D. Phippard and L. A. Turka (2015). "Longitudinal Studies of a B Cell-Derived Signature of Tolerance in Renal Transplant Recipients." Am J Transplant **15**(11): 2908-2920.

Ng, S. S., A. Li, G. N. Pavlakis, K. Ozato and T. Kino (2013). "Viral infection increases glucocorticoid-induced interleukin-10 production through ERK-mediated phosphorylation of the glucocorticoid receptor in dendritic cells: potential clinical implications." PLoS One **8**(5): e63587.

Ngo, V. N., R. J. Cornall and J. G. Cyster (2001). "Splenic T zone development is B cell dependent." J Exp Med **194**(11): 1649-1660.

Niedbala, W., X. Q. Wei, B. Cai, A. J. Hueber, B. P. Leung, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2007). "IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells." Eur J Immunol **37**(11): 3021-3029.

Niimi, M., T. C. Pearson, C. P. Larsen, D. Z. Alexander, D. Hollenbaugh, A. Aruffo, P. S. Linsley, E. Thomas, K. Campbell, W. C. Fanslow, R. S. Geha, P. J. Morris and K. J. Wood (1998). "The role of the CD40 pathway in alloantigen-induced hyporesponsiveness in vivo." J Immunol **161**(10): 5331-5337.

Nishino, R., A. Takano, H. Oshita, N. Ishikawa, H. Akiyama, H. Ito, H. Nakayama, Y. Miyagi, E. Tsuchiya, N. Kohno, Y. Nakamura and Y. Daigo (2011). "Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer." Clin Cancer Res **17**(19): 6272-6286.

Nouël, A., P. Pochard, Q. Simon, I. Ségalen, Y. Le Meur, J. O. Pers and S. Hillion (2015). "B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner." J Autoimmun **59**: 53-60.

Nova-Lamperti, E., G. Fanelli, P. D. Becker, P. Chana, R. Elgueta, P. C. Dodd, G. M. Lord, G. Lombardi and M. P. Hernandez-Fuentes (2016). "IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses." Sci Rep **6**: 20044.

Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton and L. M. Corcoran (2015). "The generation of antibody-secreting plasma cells." Nat Rev Immunol **15**(3): 160-171.

O'Garra, A. and M. Howard (1992). "Cytokines and Ly-1 (B1) B cells." Int Rev Immunol **8**(2-3): 219-234.

Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, C. Wei, R. J. Looney, I. Sanz and J. H. Anolik (2009). "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy." J Immunol **182**(10): 5982-5993.

Pallier, A., S. Hillion, R. Danger, M. Giral, M. Racape, N. Degauque, E. Dugast, J. Ashton-Chess, S. Pettre, J. J. Lozano, R. Bataille, A. Devys, A. Cesbron-Gautier, C. Braudeau, C. Larrose, J. P. Soulillou and S. Brouard (2010). "Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype." Kidney Int **78**(5): 503-513.

Pallotta, M. T., C. Orabona, C. Volpi, C. Vacca, M. L. Belladonna, R. Bianchi, G. Servillo, C. Brunacci, M. Calvitti, S. Bicciato, E. M. Mazza, L. Boon, F. Grassi, M. C. Fioretti, F. Fallarino, P. Puccetti and U. Grohmann (2011). "Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells." Nat Immunol **12**(9): 870-878.

Parker, D. C., D. L. Greiner, N. E. Phillips, M. C. Appel, A. W. Steele, F. H. Durie, R. J. Noelle, J. P. Mordes and A. A. Rossini (1995). "Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9560-9564.

Perez-Andres, M., B. Paiva, W. G. Nieto, A. Caraux, A. Schmitz, J. Almeida, R. F. Vogt, G. E. Marti, A. C. Rawstron, M. C. Van Zelm, J. J. Van Dongen, H. E. Johnsen, B. Klein, A. Orfao and P. H. C. G. o. S. f. t. S. o. MBL (2010). "Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic." Cytometry B Clin Cytom **78 Suppl 1**: S47-60.

Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick and R. A. Kastelein (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells." Immunity **16**(6): 779-790.

Rafei, M., J. Hsieh, S. Zehntner, M. Li, K. Forner, E. Birman, M. N. Boivin, Y. K. Young, C. Perreault and J. Galipeau (2009). "A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties." Nat Med **15**(9): 1038-1045.

Ramnath, D., K. Tunny, D. M. Hohenhaus, C. M. Pitts, A. S. Bergot, P. M. Hogarth, J. A. Hamilton, R. Kapetanovic, R. A. Sturm, G. M. Scholz and M. J. Sweet (2015). "TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes." Immunol Cell Biol **93**(9): 771-779.

Rauch, M., R. Tussiwand, N. Bosco and A. G. Rolink (2009). "Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells." PLoS One **4**(5): e5456.

Rivera, A., C. C. Chen, N. Ron, J. P. Dougherty and Y. Ron (2001). "Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations." Int Immunol **13**(12): 1583-1593.

Ron, Y. and J. Sprent (1987). "T cell priming in vivo: a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes." J Immunol **138**(9): 2848-2856.

Rowe, V., T. Banovic, K. P. MacDonald, R. Kuns, A. L. Don, E. S. Morris, A. C. Burman, H. M. Bofinger, A. D. Clouston and G. R. Hill (2006). "Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **108**(7): 2485-2492.

Sabat, R., G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk and J. Geginat (2010). "Biology of interleukin-10." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 331-344.

Sagoo, P., E. Perucha, B. Sawitzki, S. Tomiuk, D. A. Stephens, P. Miqueu, S. Chapman, L. Craciun, R. Sergeant, S. Brouard, F. Rovis, E. Jimenez, A. Ballow, M. Giral, I. Rebollo-Mesa, A. Le Moine, C. Braudeau, R. Hilton, B. Gerstmayr, K. Bourcier, A. Sharif, M. Krajewska, G. M. Lord, I. Roberts, M. Goldman, K. J. Wood, K. Newell, V. Seyfert-Margolis, A. N. Warrens, U. Janssen, H. D. Volk, J. P. Soulillou, M. P. Hernandez-Fuentes and R. I. Lechler (2010). "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1848-1861.

Sattler, S., G. S. Ling, D. Xu, L. Hussaarts, A. Romaine, H. Zhao, L. Fossati-Jimack, T. Malik, H. T. Cook, M. Botto, Y. L. Lau, H. H. Smits, F. Y. Liew and F. P. Huang (2014). "IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut." J Autoimmun **50**: 107-122.

Saze, Z., P. J. Schuler, C. S. Hong, D. Cheng, E. K. Jackson and T. L. Whiteside (2013). "Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells." Blood **122**(1): 9-18.

Schiemann, B., J. L. Gommerman, K. Vora, T. G. Cachero, S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, E. Frew and M. L. Scott (2001). "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." Science **293**(5537): 2111-2114.

Schioppa, T., R. Moore, R. G. Thompson, E. C. Rosser, H. Kulbe, S. Nedospasov, C. Mauri, L. M. Coussens and F. R. Balkwill (2011). "B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(26): 10662-10667.

Schwarz, C., S. Mayerhoffer, G. A. Berlakovich, R. Steininger, T. Soliman, B. Watschinger, G. A. Böhmig, F. Eskandary, F. König, F. Mühlbacher and T. Wekerle (2015). "Long-term outcome of belatacept therapy in de novo kidney transplant recipients - a case-match analysis." Transpl Int **28**(7): 820-827.

Shabir, S., J. Girdlestone, D. Briggs, B. Kaul, H. Smith, S. Daga, S. Chand, S. Jham, C. Navarrete, L. Harper, S. Ball and R. Borrow (2015). "Transitional B Lymphocytes Are Associated With Protection From Kidney Allograft Rejection: A Prospective Study." Am J Transplant **15**(5):1384-91.

Shalapour, S., J. Font-Burgada, G. Di Caro, Z. Zhong, E. Sanchez-Lopez, D. Dhar, G. Willmsky, M. Ammirante, A. Strasner, D. E. Hansel, C. Jamieson, C. J. Kane, T. Klatte, P. Birner, L. Kenner and M. Karin (2015). "Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy." Nature **521**(7550): 94-98.

Shaw, P. X., S. Hörkkö, M. K. Chang, L. K. Curtiss, W. Palinski, G. J. Silverman and J. L. Witztum (2000). "Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity." J Clin Invest **105**(12): 1731-1740.

Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V. D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M. D. Leech, R. C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinel, A. Grützkau, J. R. Grün, K. Horn, A. A. Köhl, T. Dörner, A. Bar-Or, S. H. Kaufmann, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.

Shinsuke, N. and I. Hiroshi (2013). "Overexpression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 protein (EBI3) in MRL/lpr mice suppresses their lupus nephritis by activating regulatory T cells." Autoimmunity **46**(7): 446-454.

Siewe, B., J. T. Stapleton, J. Martinson, A. Keshavarzian, N. Kazmi, P. M. Demarais, A. L. French and A. Landay (2013). "Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro." J Leukoc Biol **93**(5): 811-818.

Silva, H. M., M. C. Takenaka, P. M. Moraes-Vieira, S. M. Monteiro, M. O. Hernandez, W. Chaara, A. Six, F. Agena, P. Sesterheim, F. M. Barbé-Tuana, D. Saitovitch, F. Lemos, J. Kalil and V. Coelho (2012). "Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation." Mol Med **18**: 733-743.

Simon, Q., J. O. Pers, D. Cornec, L. Le Pottier, R. A. Mageed and S. Hillion (2015). "In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles." J Allergy Clin Immunol.

Sims, G. P., R. Ettinger, Y. Shirota, C. H. Yarboro, G. G. Illei and P. E. Lipsky (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." Blood **105**(11): 4390-4398.

Singh, A., W. F. Carson, E. R. Secor, L. A. Guernsey, R. A. Flavell, R. B. Clark, R. S. Thrall and C. M. Schramm (2008). "Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease." J Immunol **180**(11): 7318-7326.

Stanic, B., W. van de Veen, O. F. Wirz, B. Rückert, H. Morita, S. Söllner, C. A. Akdis and M. Akdis (2015). "IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses." J Allergy Clin Immunol **135**(3): 771-780.e778.

Stoehr, A. D., C. T. Schoen, M. M. Mertes, S. Eiglmeier, V. Holecska, A. K. Lorenz, T. Schommartz, A. L. Schoen, C. Hess, A. Winkler, H. Wardemann and M. Ehlers (2011).

"TLR9 in peritoneal B-1b cells is essential for production of protective self-reactive IgM to control Th17 cells and severe autoimmunity." J Immunol **187**(6): 2953-2965.

Sun, J., J. Wang, E. Pefanis, J. Chao, G. Rothschild, I. Tachibana, J. K. Chen, I. I. Ivanov, R. Rabadan, Y. Takeda and U. Basu (2015). "Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells." Cell Rep.

Suryani, S., D. A. Fulcher, B. Santner-Nanan, R. Nanan, M. Wong, P. J. Shaw, J. Gibson, A. Williams and S. G. Tangye (2010). "Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells." Blood **115**(3): 519-529.

Svachova, V., A. Sekerkova, P. Hrubá, I. Tycová, M. Rodová, E. Cecdlova, J. Slatinska, E. Honsova, I. Striz and O. Viklicky (2016). "Dynamic changes of B cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection." Transpl Int.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Tang, Y., W. Qu, Y. Wang, H. Liu, S. Ding, Y. Zhang, L. Li, R. Fu, H. Wang, G. Wang, X. Wang, Y. Wu, J. Song, L. Xing, J. Guan and Z. Shao (2015). "[Quantity and function of regulatory B cells of the patients with immune thrombocytopenia]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **95**(20): 1599-1601.

Tanida, S., H. Yoshitomi, M. Ishikawa, T. Kasahara, K. Murata, H. Shibuya, H. Ito and T. Nakamura (2011). "IL-27-producing CD14(+) cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration." Cytokine **55**(2): 237-244.

Tao, K., M. Fujii, S. Tsukumo, Y. Maekawa, K. Kishihara, Y. Kimoto, T. Horiuchi, H. Hisaeda, S. Akira, S. Kagami and K. Yasutomo (2007). "Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population." Ann Rheum Dis **66**(7): 905-909.

Teague, B. N., Y. Pan, P. A. Mudd, B. Nakken, Q. Zhang, P. Szodoray, X. Kim-Howard, P. C. Wilson and A. D. Farris (2007). "Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus." J Immunol **178**(12): 7511-7515.

Tebbe, B., B. Wilde, Z. Ye, J. Wang, X. Wang, F. Jian, S. Dolff, M. Schedlowski, P. F. Hoyer, A. Kribben, O. Witzke and A. Hoerning (2016). "Renal Transplant Recipients Treated with Calcineurin-Inhibitors Lack Circulating Immature Transitional CD19+CD24hiCD38hi Regulatory B-Lymphocytes." PLoS One **11**(4): e0153170.

Terasaki, P. I. and M. Ozawa (2005). "Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial." Transplantation **80**(9): 1194-1197.

Thaunat, O., S. Graff-Dubois, S. Brouard, C. Gautreau, A. Varthaman, N. Fabien, A. C. Field, L. Louedec, J. Dai, E. Joly, E. Morelon, J. P. Soulillou, J. B. Michel and A. Nicoletti (2010).

"Immune responses elicited in tertiary lymphoid tissues display distinctive features." PLoS One **5**(6): e11398.

Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott and D. L. Kaufman (2001). "Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **167**(2): 1081-1089.

Trapani, J. A. and V. R. Sutton (2003). "Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions." Curr Opin Immunol **15**(5): 533-543.

Tretter, T., R. K. Venigalla, V. Eckstein, R. Saffrich, S. Sertel, A. D. Ho and H. M. Lorenz (2008). "Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells." Blood **112**(12): 4555-4564.

Tussiwand, R., M. Rauch, L. A. Flück and A. G. Rolink (2012). "BAFF-R expression correlates with positive selection of immature B cells." Eur J Immunol **42**(1): 206-216.

van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Söllner, D. G. Akdis, B. Rückert, C. A. Akdis and M. Akdis (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 1204-1212.

van der Geest, K. S., P. G. Lorencetti, W. H. Abdulahad, G. Horst, M. Huitema, C. Roozendaal, B. J. Kroesen, E. Brouwer and A. M. Boots (2015). "Aging-dependent decline of IL-10 producing B cells coincides with production of antinuclear antibodies but not rheumatoid factors." Exp Gerontol **75**:24-9.

-

van der Neut Kolfschoten, M., J. Schuurman, M. Losen, W. K. Bleeker, P. Martínez-Martínez, E. Vermeulen, T. H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L. A. Aarden, M. H. De Baets, J. G. van de Winkel, R. C. Aalberse and P. W. Parren (2007). "Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange." Science **317**(5844): 1554-1557.

Vignali, D. A. and V. K. Kuchroo (2012). "IL-12 family cytokines: immunological playmakers." Nat Immunol **13**(8): 722-728.

Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris and C. A. Hunter (2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection." Immunity **19**(5): 645-655.

Vincenti, F., C. Larsen, A. Durrbach, T. Wekerle, B. Nashan, G. Blancho, P. Lang, J. Grinyo, P. F. Halloran, K. Solez, D. Hagerty, E. Levy, W. Zhou, K. Natarajan, B. Charpentier and B. S. Group (2005). "Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation." N Engl J Med **353**(8): 770-781.

Vincenti, F., C. P. Larsen, J. Alberu, B. Bresnahan, V. D. Garcia, J. Kothari, P. Lang, E. M. Urrea, P. Massari, G. Mondragon-Ramirez, R. Reyes-Acevedo, K. Rice, L. Rostaing, S. Steinberg, J. Xing, M. Agarwal, M. B. Harler and B. Charpentier (2012). "Three-year

outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients." Am J Transplant **12**(1): 210-217.

Vincenti, F., E. Ramos, C. Brattstrom, S. Cho, H. Ekberg, J. Grinyo, R. Johnson, D. Kuypers, F. Stuart, A. Khanna, M. Navarro and B. Nashan (2001). "Multicenter trial exploring calcineurin inhibitors avoidance in renal transplantation." Transplantation **71**(9): 1282-1287.

Vincenti, F., L. Rostaing, J. Grinyo, K. Rice, S. Steinberg, L. Gaité, M. C. Moal, G. A. Mondragon-Ramirez, J. Kothari, M. S. Polinsky, H. U. Meier-Kriesche, S. Munier and C. P. Larsen (2016). "Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation." N Engl J Med **374**(4): 333-343.

Vlkova, M., O. Ticha, J. Nechvatalova, T. Kalina, J. Litzman, C. Mauri and P. A. Blair (2015). "Regulatory B cells in CVID patients fail to suppress multifunctional IFN- γ + TNF- α + CD4+ T cells differentiation." Clin Immunol **160**(2): 292-300.

Wang, R., L. Kozhaya, F. Mercer, A. Khaitan, H. Fujii and D. Unutmaz (2009). "Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13439-13444.

Wang, R., Q. Wan, L. Kozhaya, H. Fujii and D. Unutmaz (2008). "Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression." PLoS One **3**(7): e2705.

Wang, R. X., C. R. Yu, I. M. Dambuza, R. M. Mahdi, M. B. Dolinska, Y. V. Sergeev, P. T. Wingfield, S. H. Kim and C. E. Egwuagu (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." Nat Med **20**(6): 633-641.

Wang, W. W., X. L. Yuan, H. Chen, G. H. Xie, Y. H. Ma, Y. X. Zheng, Y. L. Zhou and L. S. Shen (2015). "CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer." Oncotarget **6**(32): 33486-33499.

Wang, W. W., X. L. Yuan, H. Chen, G. H. Xie, Y. H. Ma, Y. X. Zheng, Y. L. Zhou and L. S. Shen (2015). "CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer." Oncotarget.

Wang, X., Y. Wei, H. Xiao, X. Liu, Y. Zhang, G. Han, G. Chen, C. Hou, N. Ma, B. Shen, Y. Li, C. E. Egwuagu and R. Wang (2016). "A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice." Eur J Immunol **46**(6): 1343-1350.

Wang, X., Y. Zhu, M. Zhang, H. Wang, Y. Jiang and P. Gao (2016). "Ulcerative Colitis Is Characterized by a Decrease in Regulatory B Cells." J Crohns Colitis.

Wang, X. N., L. Sviland, A. J. Ademokun, J. Dunn, G. Cavanagh, S. J. Proctor and A. M. Dickinson (1998). "Cellular alloreactivity of human cord blood cells detected by T-cell frequency analysis and a human skin explant model." Transplantation **66**(7): 903-909.

Watanabe, R., N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Kuwano, H. Okochi, K. Tamaki, S. Sato, T. F. Tedder and M. Fujimoto (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role

in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity." J Immunol **184**(9): 4801-4809.

Wiebe, C., I. W. Gibson, T. D. Blydt-Hansen, M. Karpinski, J. Ho, L. J. Storsley, A. Goldberg, P. E. Birk, D. N. Rush and P. W. Nickerson (2012). "Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant." Am J Transplant **12**(5): 1157-1167.

Williams, L., L. Bradley, A. Smith and B. Foxwell (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages." J Immunol **172**(1): 567-576.

Willicombe, M., P. Brookes, R. Sergeant, E. Santos-Nunez, C. Steggar, J. Galliford, A. McLean, T. H. Cook, T. Cairns, C. Roufosse and D. Taube (2012). "De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy." Transplantation **94**(2): 172-177.

Wolf, S. D., B. N. Dittel, F. Hardardottir and C. A. Janeway (1996). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice." J Exp Med **184**(6): 2271-2278.

Won, W. J. and J. F. Kearney (2002). "CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice." J Immunol **168**(11): 5605-5611.

Xiao, S., C. R. Brooks, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2015). "Tim-1 is essential for induction and maintenance of IL-10 in regulatory B cells and their regulation of tissue inflammation." J Immunol **194**(4): 1602-1608.

Yan, Y., K. van der Putten, D. G. Bowen, D. M. Painter, J. Kohar, A. F. Sharland, G. W. McCaughan and G. A. Bishop (2002). "Postoperative administration of donor B cells induces rat kidney allograft acceptance: lack of association with Th2 cytokine expression in long-term accepted grafts." Transplantation **73**(7): 1123-1130.

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." Immunity **28**(5): 639-650.

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata and T. F. Tedder (2009). "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals." J Immunol **182**(12): 7459-7472.

Yanaba, K., A. Yoshizaki, Y. Asano, T. Kadono, T. F. Tedder and S. Sato (2011). "IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model." Am J Pathol **178**(2): 735-743.

Yang, M., J. Deng, Y. Liu, K. H. Ko, X. Wang, Z. Jiao, S. Wang, Z. Hua, L. Sun, G. Srivastava, C. S. Lau, X. Cao and L. Lu (2012). "IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation." Am J Pathol **180**(6): 2375-2385.

Yang, S., W. Ding, D. Feng, H. Gong, D. Zhu, B. Chen and J. Chen (2015). "Loss of B cell regulatory function is associated with delayed healing in patients with tibia fracture." APMIS **123**(11): 975-985.

Yoshimoto, T., K. Okada, N. Morishima, S. Kamiya, T. Owaki, M. Asakawa, Y. Iwakura, F. Fukai and J. Mizuguchi (2004). "Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27." J Immunol **173**(4): 2479-2485.

Yoshizaki, A. and T. F. Tedder (2015). "[IL-21 induces regulatory B cell differentiation and immunosuppressive effect through cognate interaction with T cells]." Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi **38**(1): 57-64.

Zeng, Q., Y. H. Ng, T. Singh, K. Jiang, K. A. Sheriff, R. Ippolito, S. Zahalka, Q. Li, P. Randhawa, R. A. Hoffman, B. Ramaswami, F. E. Lund and G. Chalasani (2014). "B cells mediate chronic allograft rejection independently of antibody production." J Clin Invest **124**(3): 1052-1056.

Zha, B., L. Wang, X. Liu, J. Liu, Z. Chen, J. Xu, L. Sheng, Y. Li and Y. Chu (2012). "Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease." PLoS One **7**(11): e49835.

Zhang, Q., J. M. Cecka, D. W. Gjertson, P. Ge, M. L. Rose, J. K. Patel, A. Ardehali, J. A. Kobashigawa, M. C. Fishbein and E. F. Reed (2011). "HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation." Transplantation **91**(10): 1153-1158.

Zhang, S., M. Pruitt, D. Tran, W. Du Bois, K. Zhang, R. Patel, S. Hoover, R. M. Simpson, J. Simmons, J. Gary, C. M. Snapper, R. Casellas and B. A. Mock (2013). "B cell-specific deficiencies in mTOR limit humoral immune responses." J Immunol **191**(4): 1692-1703.

Zhang, S., J. A. Readinger, W. DuBois, M. Janka-Junttila, R. Robinson, M. Pruitt, V. Bliskovsky, J. Z. Wu, K. Sakakibara, J. Patel, C. A. Parent, L. Tessarollo, P. L. Schwartzberg and B. A. Mock (2011). "Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production." Blood **117**(4): 1228-1238.

Zhang, Y., B. X. Wu, A. Metelli, J. E. Thaxton, F. Hong, S. Rachidi, E. Ansa-Addo, S. Sun, C. Vasu, Y. Yang, B. Liu and Z. Li (2015). "GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions." J Clin Invest **125**(2): 859-869.

Zheng, J., P. L. Chan, Y. Liu, G. Qin, Z. Xiang, K. T. Lam, D. B. Lewis, Y. L. Lau and W. Tu (2013). "ICOS regulates the generation and function of human CD4+ Treg in a CTLA-4 dependent manner." PLoS One **8**(12): e82203.

Zheng, L. M., D. M. Ojcius, F. Garaud, C. Roth, E. Maxwell, Z. Li, H. Rong, J. Chen, X. Y. Wang, J. J. Catino and I. King (1996). "Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism." J Exp Med **184**(2): 579-584.

ANNEXES

Brief Communication

Kidney Transplant Recipients Treated With Belatacept Exhibit Increased Naïve and Transitional B Cells

C. Leibler^{1,2}, M. Matignon^{1,2}, C. Pilon²,
F. Montespan^{3,4}, J. Bigot², P. Lang^{1,2},
E. D. Carosella^{3,4}, J. Cohen², N. Rouas-Freiss^{3,4},
P. Grimbert^{1,2,*} and C. Menier^{3,4}

¹Nephrology and Transplantation Department, CHU Henri Mondor, APHP, Créteil, France

²Unité Inserm U955, équipe 21 and CIC Biothérapies 504, CHU Henri Mondor, APHP, Paris XII University, Créteil, France

³CEA, IMETI, Service de Recherches en Hémato-Immunologie (SRHI), Paris, France

⁴UMR_E5, Université Paris-Diderot-Paris-7, Institut Universitaire d'Hématologie (IUH), Hôpital Saint-Louis, Paris, France

*Corresponding author: Philippe Grimbert, philippe.grimbert@hmn.aphp.fr

Present address: CEA Saclay DSV/Institut de biologie et de technologies de Saclay (iBiTec-S)/SIMOPRO/LCV, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.

Marie Matignon and Caroline Pilon contributed equally to this work.

Catherine Menier and Philippe Grimbert contributed equally to this work.

Phase III clinical studies have shown that kidney transplant (KT) recipients treated with the costimulation blocker Belatacept exhibited a better renal allograft function and lower donor-specific anti-HLA immunization when compared to recipients treated with calcineurin inhibitors (CNI). We analyzed B cell phenotype in KT recipients treated with Belatacept and stable renal function (N = 13). Results were compared to those observed in stable patients treated with CNI (N = 12), or with chronic antibody-mediated rejection (N = 5). Both transcriptional profile and phenotypic characterization of peripheral B cells were performed by real-time polymerase chain reaction and flow cytometry, respectively. In Belatacept group, the frequency and absolute number of transitional B cells as defined by both phenotypes: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} and CD19⁺IgD^{hi}CD38^{hi}CD27⁻, as well as naïve B cells were significantly higher compared with CNI group. B cell activating factor (BAFF) and BAFF receptor mRNA levels were significantly lower in Belatacept group than in CNI group. These results show for the first time that Belatacept influences B cell compartment by favoring the occurrence of transitional B cells with potential regulatory properties, as described in operational tolerant patients. This role may explain the lower

alloimmunization rate observed in Belatacept-treated patients.

Keywords: BAFF, BAFF-R, Belatacept, CTLA-4-Ig, kidney transplantation, transitional B cells

Abbreviations: APRIL, A proliferating inducing ligand; BAFF, B cell activating factor; BAFF-R, BAFF receptor; BANK1, B cell scaffold protein ankyrin repeats 1; BCMA, B cell maturation protein; CNI, calcineurin inhibitors; CR, chronic antibody-mediated rejection; DC, dendritic cells; DSA, donor-specific alloantibodies; KT, kidney transplant; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; sHLA-G, soluble HLA-G; TACI, transmembrane activator and CAML interactor

Received 13 November 2013, revised 05 February 2014 and accepted for publication 24 February 2014

Introduction

Extensive studies carried out in the recent years have clearly highlighted the importance of humoral immunity as a major component of the alloimmune response in the field of solid organ transplantation. Actually, the production of donor-specific alloantibodies (DSA) after transplantation is clearly involved in both acute and chronic graft injury, and graft lost (1–3). By contrast, recent data have also suggested that B cells could play a role in operational tolerance. Indeed, a B cell signature has been identified in two distinct cohorts of tolerant kidney transplant (KT) recipients (4,5). Such signature includes an increase in naïve and transitional B cells with potential regulatory properties, when compared to KT recipients with stable graft function or with biopsy-proven chronic rejection. Thus and as previously established in the field of cellular alloimmune response, the belief is currently emerging that the outcome of allograft response—rejection or tolerance after transplantation could be in part determined by the balance between DSA-producing to tolerogenic B cells. In this context, monitoring B cell phenotype could be of importance to both analyze and better predict the characteristics of the humoral alloimmune response. Moreover, the influence of immunosuppressive drugs on the B cell compartment should now be taken into account in order to define the most protective strategy against B cell-mediated injury.

Leibler et al

Belatacept, a first-in-class selective costimulation blocker, inhibits the interaction between CD80/CD86 and CD28 preventing T cell activation. This drug is currently designed in solid organ transplantation to provide effective immunosuppression while avoiding both the renal and nonrenal toxicities associated with calcineurin inhibitors (CNI). Belatacept was approved by the US Food and Drug Administration in June 2011 based on the 3-year results of two open-label, randomized, multicenter Phase III trials. These studies compared a more or less intensive regimen of Belatacept to cyclosporine in patients receiving a KT from either living or standard criteria deceased donors (BENEFIT) or extended-criteria deceased donors (BENEFIT-EXT) (6,7). The 3-year results demonstrated comparable patient and graft survival between Belatacept and cyclosporine with better renal function despite higher rates and grades of early (within 6 months) T cell-mediated acute rejection (8,9). However, acute rejection in patients receiving Belatacept was not typically associated with DSA (9,10). In contrast, cyclosporine was more frequently associated with the development of DSA (7).

Taking also into account that the engagement of CD28 on plasma cells (11) with CD80/CD86 induces antibody secretion (12,13), we therefore hypothesized that Belatacept influences B cell compartment. We report here the first B cell phenotype analysis in KT recipients who had stable renal function treated with Belatacept as maintained immunosuppression.

Materials and Methods

Patients and study design

The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. All participating patients gave written informed consent. A total of 30 first KT recipients were included for this study. Detailed clinical data are presented in Table 1. Blood samples were obtained from patients with the following status at the time of blood collection:

- (1) First kidney recipients with stable graft function treated with Belatacept (Bristol-Myers Squibb [BMS] Company, New York, NY), mycophenolate mofetil and steroids (n = 13; Belatacept). We picked out patients from Phases II (n = 1) and III (n = 10) clinical studies cohorts (BMS) and local cohort treated after full market approval (n = 2). These patients have had stable renal function (GFR) as estimated by MDRD formula, nonsignificant proteinuria and no acute rejection within the year before inclusion. Four patients have presented an acute T cell-mediated rejection episode, all were treated with high doses of steroids alone and none was classified as resistant (resistant if the estimated GFR level did not return to within 15% of the baseline within 2 weeks after initiation of antirejection treatment). Time between acute rejection and blood collection was 45 (23–110) months. Nineteen samples were analyzed from the 13 patients. Time between transplantation and sample analysis ranged between 12 and 113 months
- (2) First kidney recipients with stable graft function treated with CNI, mycophenolate mofetil and/or steroids (CNI; n = 12). Patients were selected from our database and closely matched to Belatacept patients on the basis of date of transplantation, age, number of HLA mismatches, sensitization status at the time of renal transplant, donor

type and age, induction and maintenance immunosuppressive treatment. All patients have had stable renal function, nonsignificant proteinuria and no acute rejection within the year before inclusion. Two patients have an acute T cell-mediated rejection episode both 1 month after transplantation. Both episodes were sensitive to high dose of steroids. Blood samples were collected 67 and 84 months after acute T cell-mediated rejection episode. Fourteen samples were analyzed from the 12 patients.

- (3) First KT recipients with chronic antibody-mediated rejection (CR; n = 5). All CR were biopsy proven and presented histological evidences of chronic tissue injury (i.e. allograft glomerulopathy (cg) and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy (ci+ct) and/or fibrous intimal thickening in arteries (cv) associated with the presence of C4d and DSA) (14). DSA were not detected in two patients. We chose patients closest to the stables treated with Belatacept or CNI on the basis of date of kidney transplantation, age, donor type and age and immunosuppressive regimen. Patients treated with Rituximab within 1 year before blood collections were excluded. Time between diagnosis of CR and sampling for the studies ranged from 1 to 8 months. Three patients from the five included were treated for at least one episode of acute antibody-mediated rejection, respectively, 4, 3 and 2 years before the diagnosis of CR. Treatment included in all patients plasmapheresis, intravenous immunoglobulins and high doses of steroids, and Rituximab in two.

Cell isolation and flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation. Total B cells from freshly isolated PBMC were purified by negative selection using the B cell isolation kit II for magnetic cell separation (MACS system; Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). PBMC and purified B cells were stained according to standard protocols using the following mAbs purchased from Beckman-Coulter (Villepinte, France), unless otherwise specified: CD3-ECD, CD19-ECD or CD19-PECy5, CD138-PE, CD24-FITC (BD Pharmingen [Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France]), CD38-ECD, CD27-PE, IgD-FITC, CD5-FITC (EXBIO Praha, a.s. Vestec, Czech Republic), CD1d-PE (BD Pharmingen) alongside isotype-matched controls. CD45-FITC, -PE, -ECD and -PECy5 were used to perform fluorescence signal compensation. Cells (2×10^5 to 4×10^5) were analyzed using EPICS™ XL4 flow cytometer (Beckman-Coulter). CD4-FITC, CD127-PE and CD25-PECy5 were used to stain T cells.

Messenger RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction

Messenger RNA was extracted from 5×10^6 PBMC using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions for nine patients from the Belatacept group and nine from the CNI group. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Qiagen). Total RNA was reverse transcribed to complementary DNA using reverse transcription reagents (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using commercially available primer and probe sets (Applied Biosystems, Foster City, CA): HPRT: Hs99999909_m1, CD19: Hs00174333_m1, CD32a: Hs00234969_m1, CD32b: Hs00269610_m1, BANK1: Hs00215678_m1, BAFF-R: Hs00606874_g1, BAFF: Hs00198106_m1, APRIL: Hs00601664_g1, TACI: Hs00963364_m1, BCMA: Hs03045080_m1. We used $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method to figure out relative expression of RNAs between a sample and a reference. All samples were tested in duplicates in 96-well plates with the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). HPRT and CD19 were used as endogenous controls to normalize RNA amounts.

Statistics

Quantitative variables are presented as means (SD) and medians with range (min-max) values, according to the distribution of the variable concerned. Qualitative values are expressed as percentages. Stable KT groups were

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

Table 1: Clinical characteristics

Variables	Stable graft function		p-Value ¹	Chronic antibody-mediated rejection (CR)
	Belatacept	CNI		
Patients, N	13	12		5
Samples,				
Early analysis, N	13	12	—	5
Delay from renal transplant, months, mean (SD) ²	64±25	71±27	0.49	149±126
Late analysis, N	7	2	—	0
Delay from renal transplant, months, mean (SD)	87±4	90±1	0.30	—
At the time of transplantation				
Sex (male/female), N	10/3	11/1	0.59	2/3
Recipient age, years, mean (SD)	50±15	51±17	0.89	46±20
Donor age, years, mean (SD)	55±14	56±13	0.84	56±24
Living/deceased donor, N	0/13	2/10	0.48	0/5
Donor-specific alloantibodies, N	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)
HLA mismatches, mean (SD)	3.4±1	2.9±1	0.27	2.4±1.6
Cold ischemia time, min, mean (SD)	1291±543	1138±339	0.45	1149±141
Cause of end-stage kidney disease, N (%)				
Glomerulonephritis	6 (46)	4 (33)	0.23	0
Chronic interstitial nephropathy	3 (23)	2 (17)	—	1 (20)
Unknown nephropathy	2 (15)	0 (0)	—	2 (40)
Other	2(15)	6 (50)	—	2 (40)
Viral infectious disease, N (%)				
CMV viremia	3 (25)	2 (17)	1.00	1 (20)
BK viruria	6 (50)	2 (17)	0.19	1 (20)
Immunosuppression, N (%)				
Induction	13 (100)	11 (92)	1.00	2 (40)
Thymoglobulin	1 (8)	0 (0)	—	1 (50)
Belatacept	12 (100)	0 (0)	—	0
Calcineurin inhibitors	0 (0)	12 (100)	—	4 (80)
Mycophenolate mofetil	13 (100)	11 (92)	1.00	3 (60)
Steroids	13 (100)	9 (75)	0.22	4 (80)
Rejection,				
Acute T cell-mediated rejection, N (%)	4 (33)	2 (17)	0.64	0
Delay from transplant, months, median (min-max)	2.5 (2–47)	1 (1–1)	—	—
Acute antibody-mediated rejection, N (%)	0 (0)	0 (0)	—	2 (40)
Delay from transplant, months, median (min-max)	—	—	—	80 (62–98)
Chronic antibody-mediated rejection	0 (0)	0 (0)	—	5 (100)
Delay from transplant, months, median (min-max)	—	—	—	104 (58–368)
End of follow-up				
Time from transplant, months, median (min-max)	86 (9–127)	84 (27–136)	0.95	105 (89–384)
eGFR mL/min/1.73 m ² , mean (SD)	57.18±16.31	63.93±17.43	0.34	32.05±7.8
Proteinuria, g/day, median (min-max)	0.13 (0.03–0.51)	0.12 (0.07–0.80)	0.86	0.75 (0.25–1.61)
Donor-specific alloantibodies, N (%)	1 (8)	2 (17)	1.00	4 (80)
Number, median (min-max)	0 (0–1)	0 (0–5)	—	1 (0–2)
MFI, median (min-max)	2459	2159 (1437–6136)	—	3934 (743–19734)

CMV, cytomegalovirus; CNI, calcineurin inhibitors; eGFR, estimated GFR; MFI, mean fluorescence intensity.

¹p-Value between the two stable groups.

²Standard deviation.

compared at the time of inclusion. Quantitative variables were compared with unpaired t-test or Mann–Whitney, depending on the distribution of the variable concerned. Qualitative variables were compared with Fisher test or chi-square test.

Biological data were analyzed with the nonparametric Mann–Whitney test (flow cytometry and qPCR data). To compare early and late B cell phenotype, we used paired t-test. A p-value <0.05 was considered as significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

Belatacept patients display higher proportion of transitional B cells than CNI patients

The total lymphocyte, CD3⁺ T and CD19⁺ B cells counts were assessed in the peripheral blood of patients from the three groups: Belatacept or CNI-treated patients with stable graft function and CR patients. The total lymphocyte count was not significantly different between the three groups

Leibler et al

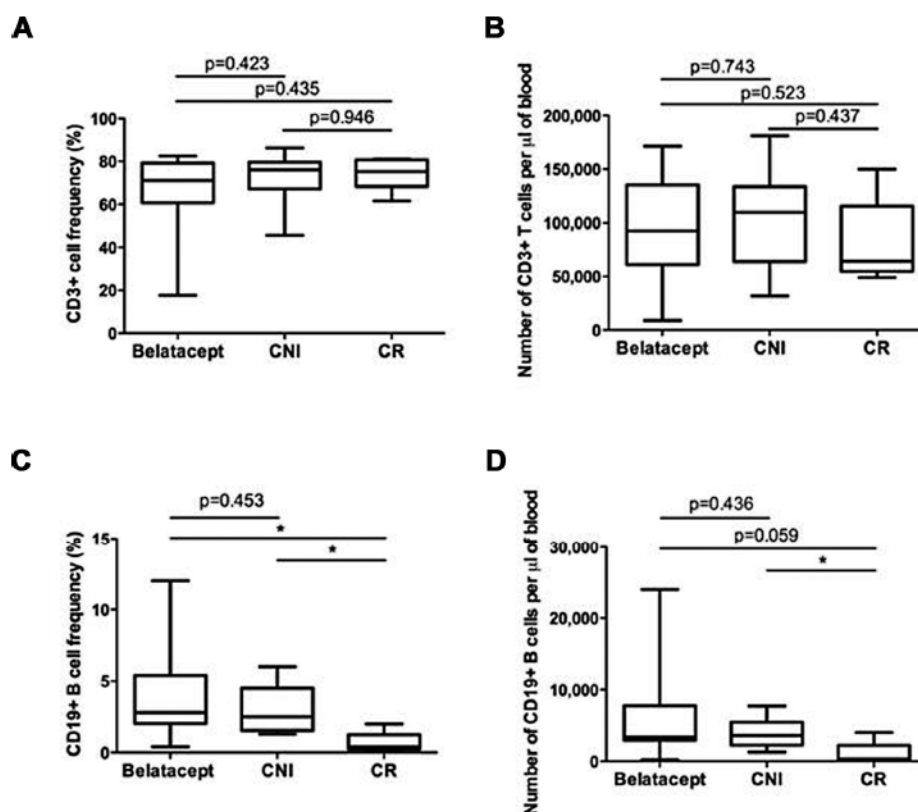


Figure 1: Absolute number of (A) lymphocytes and of (B) CD3⁺ T cells, (C) percentage and (D) absolute number of CD19⁺ B cells in the peripheral blood of patients from the three groups: Belatacept- or CNI-treated patients with stable graft function and CR patients. The absolute number of cells was determined by multiplying the respective percentages obtained by flow cytometry by absolute lymphocyte counts from clinical laboratory reports. The only difference observed is the number of CD19⁺ B cells (frequency, absolute number) between patients with stable graft function and CR (nonparametric Mann-Whitney test, two-tailed p-values, *p < 0.05). CNI, calcineurin inhibitors; CR, chronic antibody-mediated rejection.

(Figure 1A). The absolute number of CD3⁺ T cells in the PBMC of the three groups was also similar (Figure 1B). While the frequency of CD19⁺ B cells did not differ between the Belatacept and CNI groups (2.9 [0.2–12] % vs. 2.4 [1.3–6] %), it was significantly higher when both were compared to the CR group (0.5 [0.1–2.0] %, p = 0.011 and p = 0.011, respectively) (Figure 1C). Accordingly, the absolute number of B cells was higher in the Belatacept and CNI groups compared with the CR group (3.38 [2.00–24.000] and 3.59 [1.26–7.7] vs. 0.360 [0.08–4.00]; p = 0.036 and p = 0.012, respectively) (Figure 1D).

To identify peripheral B cell developmental stages among the CD19⁺ B cells by flow cytometry, we used the Bm1–Bm5 classification based on the expression of CD27, CD38 and IgD (Figure 2), and thresholds of expression of CD24/CD38 (Figure 3). Analysis of B cell subsets was performed on purified B cells from stable Belatacept- and CNI-treated patients. CR patients were not analyzed. Actually, these

patients exhibited a small amount of B-lymphocytes (0.5% of PBMC, even after B-lymphocyte enrichment number of the different subclasses of B cells remains under the threshold required for analysis. Using the CD27/IgD classification (15), we did not observe any significant difference in the percentage of CD19⁺ B cells displaying a memory phenotype (CD27⁺) or a naïve phenotype (CD27⁻) between the Belatacept and CNI groups (Figure 2A). However, mean frequencies of CD27⁺ and of unswitched CD27⁺IgD⁺ subset memory B cells were slightly lower in the Belatacept group compared with the CNI group (22.5 [6.92–78] % and 7.5 [2.7–34] % vs. 33.35 [11–71.5] % and 11 [3–41.5] %, respectively) (Figure 2A). Consequently, the proportion of CD27⁻ (IgD⁺) naïve B cells was increased in the Belatacept group (Figure 2A).

The analysis of memory B cell populations according to the Bm classification (16) showed that the Belatacept group had a significantly lower number of late Bm5 cells, which

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

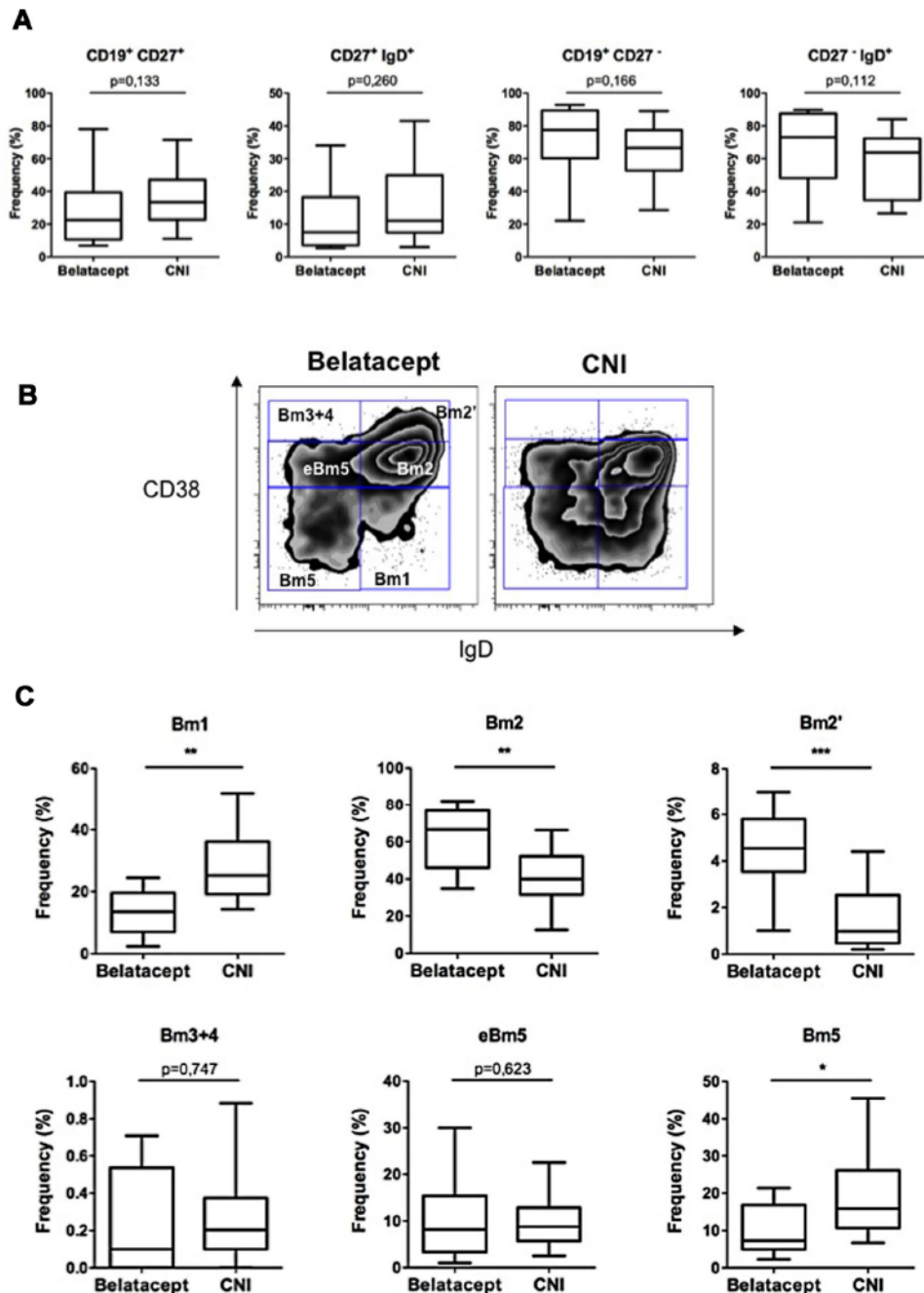


Figure 2: Phenotype of circulating CD19⁺ B cell subsets in Belatacept- and CNI-treated patients (N = 13 and 12, respectively) according to expression levels of CD27, IgD and CD38. (A) Percentage of CD19⁺CD27⁺ memory B cells (total and CD27⁺IgD⁺ unswitched memory) in both groups. (B) Representative dot plots of B cells using the Bm1–Bm5 classification. Gating strategy is shown. (C) Frequency (%) of the different Bm cell subsets within CD19⁺ B cells in the two groups. Belatacept group had significantly more Bm2' cells (IgD⁺CD38^{hi}), corresponding essentially to transitional B cells and naïve Bm2 cells (IgD⁺CD38^{hi}). Belatacept patients presented significantly less Bm1 cells (IgD⁺CD38⁻) and late Bm5 cells (Bm5, IgD⁻CD38⁻, CD27⁺ switched memory B cells). All statistics: Mann-Whitney test, two-tailed p-values; *p < 0.05, **p < 0.005, *p < 0.0001. CNI, calcineurin inhibitors.**

Leibler et al

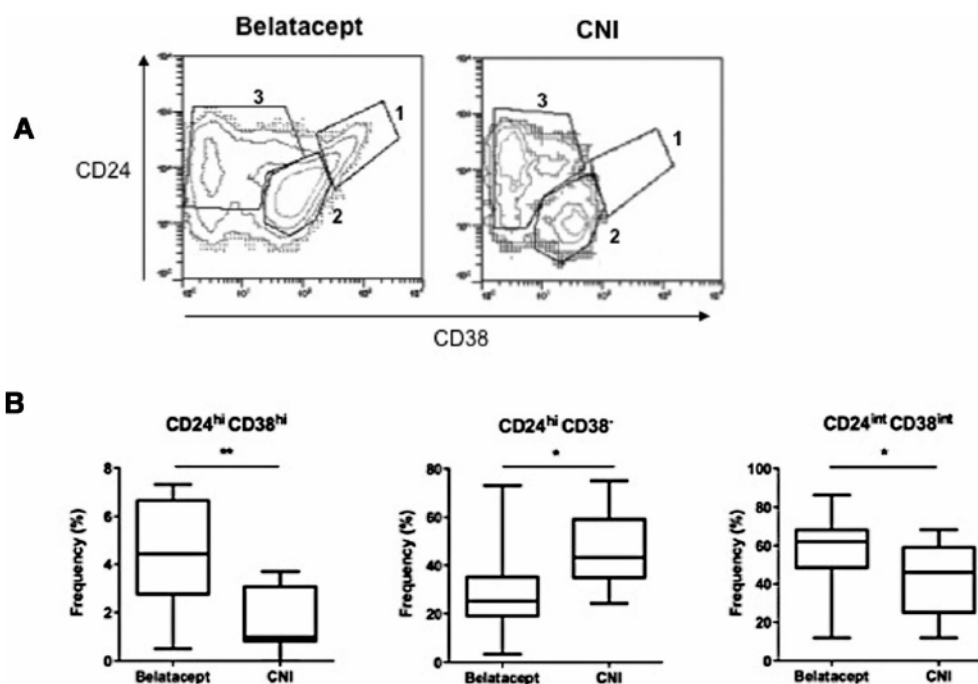


Figure 3: Phenotype of circulating CD19⁺ B cell subsets in Belatacept- and CNI-treated (N= 13 and 12, respectively) patients according to expression levels of CD24 and CD38. (A) Representative dot plots of B cells in one Belatacept and one CNI patient according to the expression levels of CD24 and CD38. The gate number one corresponds to immature B cells including the transitional cell subset that expresses high levels of CD24 and CD38. The gate number two corresponds to CD24^{int}CD38^{int} cells, which are primarily mature B cells and the gate three to CD24^{hi}CD38⁻ cells, which are primarily memory B cells. (B) Frequency (%) of these three different B cell subsets in studied groups. Belatacept patients had significantly higher proportion of transitional B cells ($p = 0.003$) and significantly lower proportion of memory B cells ($p = 0.01$) than CNI patients. The increased proportion of mature B cells in Belatacept patients is at the limit of statistical significance ($p = 0.0495$). Statistics: Mann-Whitney test, two-tailed p-values; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. CNI, calcineurin inhibitors.

are CD27⁺ switched memory cells, than the CNI group (7.3 [2.9–21.4] % vs. 15.9 [6.7–45.5] %; $p = 0.02$) (Figure 2C). Both Belatacept and CNI groups displayed similar numbers of early Bm5 cells (also switched memory B cells). As previously described for peripheral blood (16), there were virtually no Bm3+4 cells. The Bm1 virgin naïve IgD⁺ cells were significantly decreased in the Belatacept group compared with the CNI group (7 [2.4–24.5] % vs. 25.3 [14.3–52] %; $p = 0.0015$). By contrast, activated naïve Bm2 cells were significantly increased in the Belatacept group compared with the CNI group (66.5 [34.7–82.2] % vs. 40 [12.6–66.2] %; $p = 0.004$). This result is consistent with the increasing trend of CD27⁻ cells and particularly of CD27⁻IgD⁺ naïve B cells, in the Belatacept group. Altogether Belatacept patients display a lower number of memory B cells and, consequently, a higher proportion of B cells having a naïve phenotype, than CNI patients.

The proportion of Bm2⁺ cells, which are mainly CD27⁻ transitional B cells (17,18), was significantly higher in the Belatacept group than in the CNI group (4.5 [1–7] % vs. 0.98 [0.2–4.4] %; $p = 0.0009$) (Figure 2C). To confirm that this B

cell subset was enriched in the Belatacept group, we analyzed expression levels of CD24 and CD38 since transitional B cells can also be identified by their high expression levels of both these markers (17,18). We indeed observed higher numbers of CD24^{hi}CD38^{hi} immature B cells in the Belatacept group than in the CNI group (4.45 [0.5–7.3] % vs. 1 [0–3.7] %; $p = 0.003$) (Figure 3). In accordance with above results, CD24^{hi}CD38⁻ cells, which are primarily memory B cells, were less frequent in the Belatacept group (25.3 [3.37–73] % vs. 43.4 [24.2–75] %; $p = 0.01$). The proportion of CD24^{int}CD38^{int}, comprising primarily mature B cells, was increased in the Belatacept group when compared to the CNI group (62 [12–86.3] % vs. 46 [12–68.1] %; $p = 0.049$), although the difference reached the limit of statistical significance. This is likely to be related to the increase in transitional B cells and decrease of the memory B cells.

Belatacept patients maintain higher proportion of transitional B cells along KT

We performed a late B cell phenotype in seven patients treated with Belatacept and in two patients treated with

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

stable KT recipients remained stable within almost 6 years posttransplant.

Belatacept patients show lower levels of BAFF and BAFF-R transcripts than CNI patients

We next analyzed the transcript levels of molecules involved in inhibitory B cell profiles (CD32 isoforms and the B cell scaffold protein ankyrin repeats 1 [BANK1]) and in B cell survival and differentiation (the A proliferating inducing ligand [APRIL], the B cell activating factor [BAFF] and its receptors: BAFF receptor [BAFF-R], the transmembrane activator and CAML interactor [TACI] and the B cell maturation protein [BCMA]) in the PBMC from Belatacept and CNI patients. The transcript levels of both CD32a and CD32b isoforms and BANK1 were comparable in both patient groups. APRIL, TACI and BCMA transcripts were also expressed at similar levels in both groups. By contrast, we observed a significant difference in the quantity of BAFF and BAFF-R transcripts. The Belatacept group displayed significantly less BAFF and BAFF-R transcripts than the CNI group (0.59 [0.11] vs. 0.96 [0.12] and 4.53 [0.39] vs. 6.21 [0.74], respectively) (Figure 5).

Discussion

Here we report for the first time the analysis of peripheral B cell compartment in renal transplant patients treated with Belatacept. The present study was prompted by the observation that KT patients enrolled in Phase III clinical studies have lower incidence of DSA upon Belatacept (CTLA-4-Ig) treatment compared with CNI. Since a B cell signature has been described in operationally tolerant renal transplant recipients (4,5), we analyzed whether B cell compartment was modified by Belatacept. We showed that Belatacept patients have a higher number of naïve and

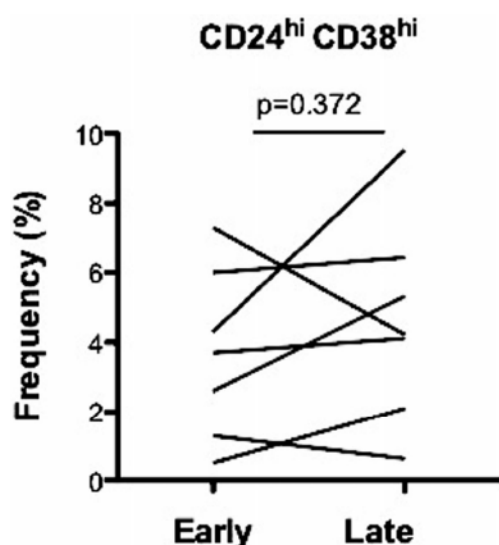


Figure 4: Evolution over time of the CD24^{hi} and CD38^{hi} compartment (transitional B cells) in Belatacept-treated patients (N=7). Late blood samples were collected 20.80 ± 0.79 months after the initial one. The proportion of naïve transitional B cells (CD24^{hi} CD38^{hi}) was similar in both time points (p=0.37). Statistics: paired t-test, two-tailed; p-values.

CNI. Late blood samples were collected 20.80 ± 0.79 months after the initial one. The proportion of naïve transitional B cells (CD24^{hi}CD38^{hi}) was similar in both time points (N=7; p=0.37) (Figure 4). In CNI patients, lower proportion of naïve transitional B cells was stable (N=2; data not shown). B cell phenotype observed in

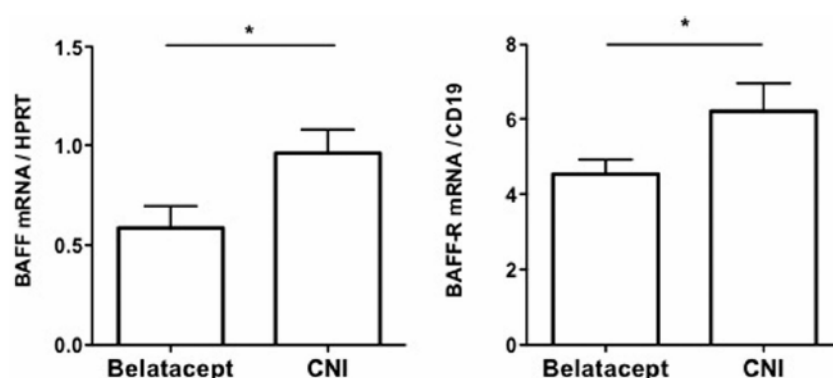


Figure 5: Comparison of the transcript levels of BAFF and BAFF-R in PBMC from the Belatacept and CNI groups. The amounts of BAFF mRNA and of its receptor BAFF-R were reported to the HPRT gene and to the CD19 gene, respectively. The Belatacept patients (N=9) had lower transcript levels of BAFF and BAFF-R than the CNI patients (N=9). Statistics: Mann-Whitney test, two-tailed p-values; *p < 0.05. BAFF, B cell activating factor; BAFF-R, BAFF receptor; CNI, calcineurin inhibitors; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Leibler et al

transitional B cells. Moreover, we showed that such B cell signature is maintained over time with same proportion of naïve transitional B cells.

In our study, patients from the Belatacept, CNI and CR groups had similar count of both total lymphocytes and T cells. While both the frequency and absolute number of B cells were comparable between the Belatacept and CNI groups, they were significantly lower by comparing these two groups with the CR group. These results contrast with previous findings showing a similar number and frequency of B cells in patients with stable renal function when compared to patients with chronic rejection. The only significant difference was the higher number of B cells in drug-free tolerant recipients (5,19). Our results may be related to the limited number of analyzed patients, rather than to the immunosuppression strategy, which was not modified within the previous 12 months. However, our results reinforce the recent concept of the association between graft acceptance and the predominance of B cells with tolerogenic phenotype.

Our observation of increased number of naïve B cells in Belatacept patients was described by other groups in long-term immunosuppressive drug-free tolerant KT patients (4) and in alemtuzumab-treated KT patients (20). In line with this result, immature B cells, namely the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells, was increased in Belatacept patients compared to CNI patients. This B cell subset was shown as exhibiting regulatory capability through IL-10 release (21) and interestingly was also found in operational tolerant KT patients (4). The development of naïve and/or transitional B cells with regulatory functions has been hypothesized as being involved in graft tolerance induction and/or maintenance in such KT patients (4).

Since CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells have regulatory capacity (21), we analyzed the transcript levels of molecules involved in regulatory B cell profiles and in B cell maturation and activation (19). Unlike operational tolerant KT patients, expression of BANK1 transcripts, which negatively regulates CD40-mediated AKT activation and which has been described as a leader gene in these patients, was not significantly different in both Belatacept and CNI groups. Two isoforms of the low-affinity Fc γ receptor CD32 are expressed on B cell surface: while CD32b mediates an inhibitory signal upon co-ligation with the B cell receptor, CD32a, transduces an activating signal. Although decreased CD32a/CD32b ratio was described for tolerant patients, it was similar between both our groups. Interestingly, we observed a decrease in BAFF and BAFF-R transcripts in patients from the Belatacept group when compared to patients treated with CNI. BAFF has emerged as a critical factor for B cell survival and differentiation. BAFF exerts these actions by binding to BAFF-R with a high affinity, and to TACI and BCMA with a low affinity. While BAFF is predominantly produced by innate immune cells, BAFF-R expression begins at the late transitional stage and

is present on all mature B cells. BAFF-R signaling was demonstrated to determine transitional B cell maturation and the subsequent survival of mature B cells (22,23). Our observation of reduced BAFF and BAFF-R transcripts are in accordance with our B cell phenotypic analysis and other studies reporting an association of high levels of BAFF with abnormal renal function and HLA immunization or a local humoral alloimmune response in kidney transplantation (24–26). Levels of BAFF transcripts were also increased in rejected allografts (27). In line with our results, elevated BAFF-R transcripts were also associated with long-term graft dysfunction, as described in a previous study measuring BAFF-R levels in a cohort of 143 kidney recipients with stable graft function at enrollment for more than 6 years (28).

The rationale for the use of Belatacept in organ transplantation is primarily focused on its ability to block CD80/86–CD28 mediated T cell activation and its potential activity on other immune cells such as B cells was initially thought to be mainly mediated by an alteration of the T cell/B cell cooperation. Our results suggest that Belatacept could also act directly on B cells. Mechanisms by which Belatacept could influence B cell compartment remain however to be determined. First, Belatacept could act directly on B cells through CD28–CD80/CD86 costimulation blockade. CD28 expression in B cells is repressed by the transcription factor Pax5 and de-repressed during differentiation to plasma cells. The role of CD28 in humoral immune responses has been predominantly attributed to helper T cell costimulation and germinal center formation in lymphoid organs (29,30). An intrinsic B cell role for CD28 has been identified in controlling the differentiation or function of plasma cells beyond germinal center formation (11). Recently, it has been shown that sustained antibody responses depend on the function of CD28, which selectively supports the survival of bone marrow–resident nonproliferating plasma cells, the long-lived plasma cells (13). Second, Belatacept could act indirectly through the induction of the tolerogenic HLA-G molecule. Indeed, it has been demonstrated that dendritic cells (DC) generated *in vitro* in presence of Belatacept released soluble HLA-G (sHLA-G) in response to allostimulation; these Belatacept-treated DC acting as tolerogenic antigen-presenting cells. In addition, renal transplant patients receiving Belatacept exhibited increased levels of plasma HLA-G than those receiving CNI. This sHLA-G secretion by DC during an allogeneic challenge was thus suggested as an explanation to the better graft acceptance observed in Belatacept treated renal transplant patients (31). Another study on a large cohort of renal transplant patients showed an inverse association between plasma sHLA-G and the presence of anti-HLA alloantibodies (32). Finally, we demonstrated that sHLA-G inhibits the proliferation and differentiation of B cells through binding to the ILT2 receptor expressed to their cell surface (33). Through these direct/indirect mechanisms, we hypothesize that the Belatacept may affect the B cell maturation process and promote the

maintenance of transitional B cells, which could help explain the weak anti-HLA alloimmunization.

In conclusion, present data showed that KT recipients treated with Belatacept exhibited a B cell phenotype that shares similarity to that observed in operational tolerant patients, suggesting that costimulation blocker may, at least partially, create an environment that limits anti-donor-specific B cell alloimmune response. Whether the B cell pattern observed predicts further occurrence or not of DSA and antibody-mediated events remains to be established.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Bristol-Myers Squibb France and the Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

- Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 348–357.
- Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363: 1451–1462.
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665–673.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836–1847.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848–1861.
- Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 547–557.
- Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 535–546.
- Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, et al. Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: A phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant* 2012; 12: 630–639.
- Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; 12: 210–217.
- Larsen CP, Grinyo J, Medina-Pestana J, et al. Belatacept-based regimens versus a cyclosporine A-based regimen in kidney transplant recipients: 2-year results from the BENEFIT and BENEFIT-EXT studies. *Transplantation* 2010; 90: 1528–1535.
- Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 2006; 24: 269–281.
- Njau MN, Kim JH, Chappell CP, et al. CD28-B7 interaction modulates short- and long-lived plasma cell function. *J Immunol* 2012; 189: 2758–2767.
- Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, et al. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J Exp Med* 2011; 206: 1435–1446.
- Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10: 464–471.
- Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (IgM+ 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* 1998; 188: 1679–1689.
- Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 2001; 167: 3610–3618.
- Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004; 197: 179–191.
- Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; 105: 4390–4398.
- Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 2010; 78: 503–513.
- Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. *Am J Transplant* 2012; 12: 1784–1792.
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)/CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32: 129–140.
- Chhabra M, Conlon TM, Saeb-Parsy K, Pettigrew GJ. BAFF and associated TNF superfamily members in renal transplantation: An end to BlySful ignorance. *Transplantation* 2013; 96: 853–859.
- Tussiwand R, Rauch M, Fluck LA, Rolink AG. BAFF-R expression correlates with positive selection of immature B cells. *Eur J Immunol* 2012; 42: 206–216.
- Thaunat O, Field AC, Dai J, et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14723–14728.
- Xu H, He X, Liu Q, et al. Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2009; 41: 1552–1556.
- Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation* 2008; 85: 1705–1714.
- Thaunat O, Patey N, Gautreau C, et al. B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* 2008; 85: 1648–1653.
- Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, et al. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2012; 12: 2754–2762.

Leibler et al

29. Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 1996; 156: 4576–4581.
30. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261: 609–612.
31. Bahri R, Naji A, Menier C, et al. Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: Implication in human renal transplant acceptance. *J Immunol* 2009; 183: 7054–7062.
32. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6: 2152–2156.
33. Naji A, Menier C, Maki G, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction. *Leukemia* 2012; 26: 1889–1892.

Résumé :

A l'instar des lymphocytes T régulateurs, l'étude de populations lymphocytaires B au potentiel immunosuppresseur a émergé ces dernières années. La capacité immunosuppressive des lymphocytes B régulateurs CD24^{hi} CD38^{hi} passant notamment par leur capacité à exprimer l'IL-10 a été mise en évidence dans plusieurs pathologies notamment chez les patients atteints de maladies auto-immunes. En transplantation rénale, le rôle de ces cellules dans la tolérance du greffon a également été suggéré. Néanmoins, la caractérisation de ces cellules semble très controversée et complexe. En effet à ce jour, il n'a été mis en évidence aucun marqueur spécifique permettant d'identifier clairement cette population régulatrice chez l'homme. L'analyse transcriptomique de ces cellules issues de donneurs sains nous a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs qui leur sont associés tels que CD9, CD10, CD5, ICOS-L (inducible T cell co-stimulator ligand), GARP (glycoprotein-A repetitions predominant protein) et CD1b. Nous avons pu montrer que la présence de ces marqueurs était corrélée à l'expression d'IL-10 et que l'expression de CD1b sur les cellules CD24^{hi} CD38^{hi} était associée à une augmentation de la capacité suppressive de ces cellules. La présence de ces cellules CD1b⁺ a également été retrouvée en plus forte proportion chez les patients traités par belatacept identifiés comme présentant un meilleur pronostic clinique du greffon. Des résultats préliminaires suggèrent également que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la fonction immunorégulatrice des LB CD24^{hi} CD38^{hi} comme la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'IL-35. L'identification de ces molécules permet d'améliorer la caractérisation et la compréhension des mécanismes immunorégulateurs de ces cellules et pourrait être d'une grande aide pour le monitoring immunologique de la réponse humorale en transplantation.

Mots clés : Lymphocyte B régulateur, transplantation, tolérance, IL-10.

Abstract :

Like for regulatory T cells, many studies on B cells immunoregulatory functions have emerged in the past few years. The immunosuppressive capacity of CD24^{hi}CD38^{hi} regulatory B cells known for their ability to produce IL-10 has been demonstrated in several pathologies, in particular in autoimmune diseases. In kidney transplant, the role of these cells in graft tolerance has also been suggested. So far, accurate phenotypic and functional analyses of these Breg are still lacking. Transcriptomic microarray analysis of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells from healthy donors led us to identify new phenotypic markers as CD9, CD10, CD5, ICOS-L (inducible T cell co-stimulator ligand), GARP (glycoprotein-A repetitions predominant protein) and CD1b. We showed a link between this markers and IL-10 expression and we demonstrated that a CD1b marker on CD24^{hi}CD38^{hi} B cells was associated with an increase of regulatory properties. Breg CD24^{hi}CD38^{hi}CD1b⁺ was also found in higher frequencies in kidney transplant recipients treated with belatacept. Finally, preliminary results also suggest that other regulatory mechanisms may be involved in immunoregulatory function of CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, especially through immunoregulatory cytokines such as IL-35. The identification of these molecules can improve characterization and understanding of immune-regulatory mechanisms of these cells and could be helpful in humoral response immuno-monitoring in transplantation.

Key words : Regulatory B cell, transplantation, tolerance, IL-10.