



HAL
open science

Etude du TLR9 à la membrane plasmique des lymphocytes B : caractérisation des anticorps anti-TLR9 commerciaux

Marie Cumin

► **To cite this version:**

Marie Cumin. Etude du TLR9 à la membrane plasmique des lymphocytes B : caractérisation des anticorps anti-TLR9 commerciaux. Immunologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0042 . tel-01945286v2

HAL Id: tel-01945286

<https://theses.hal.science/tel-01945286v2>

Submitted on 5 Dec 2018

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Marie CUMIN

**Etude du TLR9 à la membrane plasmique des lymphocytes B.
Caractérisation des anticorps anti-TLR9 commerciaux.**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le vendredi 31 août 2018
Unité de recherche : Laboratoire Lymphocyte B et Autoimmunité (LBAI) – INSERM (UMR1227)

Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

Lucette PELLETIER DR INSERM (U1043) / CNRS
(UMR5282) /
Université de Toulouse
Hélène DUMORTIER Directrice CNRS (UMR3572, IBMC) /
Université de Strasbourg

Présidente
Lucette PELLETIER DR INSERM (U1043) / CNRS
(UMR5282) / Université de Toulouse

Hélène DUMORTIER Directrice CNRS (UMR3572, IBMC) /
Université de Strasbourg
Karine PICHAVANT MCF (EA4322, ORPHY) / Université
de Bretagne, Brest

Directeur de thèse
Christophe JAMIN MCU-PH (LBAI, INSERM UMR1227) /
Université de Bretagne Occidentale

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Docteur Hélène Dumortier, le Docteur Lucette Pelletier et le Docteur Karine Pichavant d'avoir si généreusement accepté de faire partie de ce jury, d'avoir pris sur votre temps précieux et d'avoir fait tout ce chemin pour évaluer ce travail.

Merci également au Professeur Jacques-Olivier Pers de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et au Docteur Christophe Jamin de m'avoir permis de faire cette thèse. Merci également, Christophe, pour la confiance que tu as placée en moi. Au cours de ces trois années, j'ai eu la liberté de m'exprimer dans la réalisation de ce travail et je t'en remercie.

Un grand merci au Docteur Laëtitia Le Pottier de son aide si précieuse dans la réalisation de la protéine chimérique TLR9-hémagglutinine, ainsi que de ses conseils et de ses encouragements.

Merci au Docteur Pierre Pochard de m'avoir suivie de près au début de ma thèse, pour toute l'aide apportée en cytométrie et d'avoir été là, tout simplement. Merci également au Docteur Sophie Hillion et au Docteur Christelle Le Dantec qui ont toutes deux été très souvent disponibles pour m'appuyer aussi bien scientifiquement que moralement. Enfin, merci au Docteur Olivier Mignen, de son humour, de son soutien et de ses conseils.

Aux techniciennes, secrétaires, aide de laboratoire et membres de la partie hospitalière du laboratoire, merci de tous les bons moments passés ensemble, souvent autour d'un café : Sylvie, Carole, Christine, Nelly, Geneviève, Simone, Christine, Ben et Yves.

A la folle jeunesse, merci de ces trois années de vie commune que je n'oublierai pas. Pleines de travail, pleines de rires et d'amitié. Votre présence et votre soutien ont beaucoup compté : Amandine, Lucas, Paul, Nelig, Kahina, Cristina, Patrice, Audrey, Quentin, Delphine, Charlotte, Alexis, Fiona, Marina, Nathan, Tiphaine, Alice, Kristell, Arthur, Christophe et Marine. Un mot spécial pour le Docteur Marjolaine Debant qui a été une très bonne amie dans tant de moments dont, j'espère, elle se souviendra. A tous les prochains ! A tous enfin, une très bonne continuation et j'espère que l'on se reverra souvent.

A ma famille, que j'aime ! A mes parents Anne et Frédéric, à mes grands-frères Pierre et Thomas, à ma sœur Cécile et à ma belle-sœur Marine, merci de votre amour, de votre soutien et de votre exemple. Merci de m'avoir donné envie de m'intéresser à tant de choses, et de m'avoir toujours accompagnée et encouragée. Je suis fière d'être votre fille et votre sœur.

Aux merveilleux Carvajaux : Catherine, Esteban, Eleonor, Amanda et Adrien. Merci infiniment de votre gentillesse et de vos encouragements !

A mes amies de loin également, parce que malgré la distance, rien n'a changé : Barbara, Grace et Bogna !

A mes amis brestois : Anaïs et Mattieu, Rackel et Florent, Caroline-Jade et Rémi. Merci de votre soutien !

Enfin, à Guillermo. Je referai tout ce parcours une deuxième fois pour te rencontrer. Sans toi, cette thèse n'existerait pas. Merci pour tout, et à nos futures années ensemble. Je sais qu'elles seront pleines d'amour et de bonheur.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des illustrations.....	6
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
INTRODUCTION.....	16
LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS	17
Ontogenèse et fonction des lymphocytes B.....	17
TLR, IMMUNITE INNEE & ADAPTATIVE	39
Les récepteurs de l'immunité innée.....	39
Les Toll-like receptors.....	40
Le TLR9 humain et Lymphocyte B.....	52
OBJECTIFS DE LA THESE	66
MATERIEL ET METHODES	68
Lignées et culture cellulaire	68
Lignées cellulaires.....	68
Cellules primaires et purification cellulaires.....	68
Cocultures LB-LT issus d'amygdales	69
Analyse quantitative de l'expression d'ARNm.....	70
L'extraction d'ARN totaux.....	70
La rétrotranscription.....	70
La PCR quantitative	71
Clonage du TLR9 tagué avec une hémagglutinine.....	71
Pour la réalisation de la protéine de fusion TLR9-hémagglutinine (HA) en C-terminal :	71
Pour l'étude de l'expression des protéines de fusion TLR9-HA :.....	75
Pour l'étude du trafic intracellulaire du TLR9-HA par microscopie à épifluorescence :.....	75
Cytométrie en flux.....	75
Microscopie à fluorescence	76
Western Blot, fractionnement cellulaire et immunoprécipitations.....	76

Préparation des échantillons protéiques et des gels de polyacrylamide	76
Réalisation de l'électrophorèse, du transfert semi-sec et du marquage de la membrane	78
Réalisation des immunoprécipitations.....	78
Spectrométrie de masse	79
RESULTATS	80
I. Expression du TLR9 à la surface des LB – hypothèse et résultats préliminaires.....	81
II. Analyse quantitative de l'expression des ARNm du TLR9	88
III. Cytométrie en flux.....	89
IV. Western Blot – Extraits protéiques totaux.....	97
V. WB – Fractions protéiques	102
VI. Immunoprécipitations totales et membranaires.....	104
VII. Clonage moléculaire – réalisation de la protéine de fusion TLR9-hémagglutinine (HA) en C-terminal.....	105
Pour obtenir la séquence d'ADN complémentaire de l'ARNm du TLR9 humain [NM_017442] :	106
Pour cloner une hémagglutinine en 3' du cDNA du TLR9 :.....	109
Pour obtenir un plasmide pcDNA3.1/Zeo(+)-TLR9-HA :	111
VIII. Etude de l'expression des protéines de fusion TLR9-HA sur HEK293	113
IX. Microscopie – TLR9-HA ne colocalise pas avec l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2	116
X. TLR9 recombinant – détection correcte avec anticorps anti-TLR9	117
XI. Le TLR9 et sa voie de signalisation dans la LLC.....	119
DISCUSSION	125
Relevance de l'étude du TLR9 dans le contexte de la régulation par les LB.....	126
Caractérisation des anticorps anti-TLR9	127
Les anticorps anti-TLR9 humain dans la littérature	129
L'étude du TLR9 sans anticorps.....	130
Protéines de fusion	131
Modifications post-traductionnelles : la phosphorylation	132
Analyse de la glycosylation.....	132

Analyse en <i>pulse-chase</i>	132
Test de clivage protéolytique à la furine	133
“ Les anticorps sont la bête de somme des expérimentations biologiques mais ils polluent le domaine avec de fausses découvertes” (Baker, 2015)	133
CONCLUSION GENERALE	137
Annexe 1	138
Annexe 2	178
BIBLIOGRAPHIE	212

Liste des illustrations

Figure 1 : Ontogenèse des lymphocytes B.....	18
Figure 2 : Induction du caractère régulateur des lymphocytes B producteurs d'IL-10.....	26
Figure 3 : Modèle de contrôle de la réponse auto-réactive par la stimulation des lymphocytes B via les Toll-like receptors.....	30
Figure 4 : Les mécanismes de l'action des lymphocytes B régulateurs.....	35
Figure 5 : Historique de la découverte des TLR.....	41
Figure 6 : Aperçu des voies de signalisation et ligands des TLR.....	44
Figure 7 : Les populations de DC experiment différents TLRs.....	49
Figure 8 : Structure du TLR9 humain entier.....	53
Figure 9 : Entrée du ligand du TLR9 dans la cellules et trafic vers les endosomes où ils se rencontrent.....	54
Figure 10 : Les trois classes de CpG-ODN synthétiques, agonistes du TLR9.....	56
Figure 11 : Trafic intracellulaire des TLRs.....	57
Figure 12 : Expression du TLR9 à la surface des lymphocytes B (LB).....	82
Figure 13 : Mise en évidence d'une colocalisation de la cible de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 et du BCR dans les radeaux lipidiques.....	83
Figure 14 : TLR9 de surface et CpG-ODN de type B.....	84
Figure 15 : L'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris n'induit pas les mêmes effets fonctionnels que le CpG-ODN de type B.....	85
Figure 16 : L'anticorps anti-TLR9 26C593.2 monoclonal de souris bloque l'effet du CpG-ODN de type B sur l'activation des lymphocytes B (LB) d'amygdales.....	87
Figure 17 : Niveaux d'expression des ARNm du TLR9 par différents types cellulaires d'après Genevisible.com..	88
Figure 18 : Analyse quantitative de l'expression des ARNm du TLR9.....	89
Figure 19 : Analyse par cytométrie de flux d'un marquage de cellules mononuclées d'amygdales par un anticorps anti-TLR9.....	90
Figure 20 : Evaluation de l'expression totale du TLR9 sur les différentes populations cellulaires du sang périphérique.....	92
Figure 21 : Marquages intracellulaires simples des cinq anticorps anti-TLR9 en cytométrie en flux sur les lymphocytes B RAMOS, les cellules rénales HEK293 et lymphocytes T (LT) du sang périphérique.....	94
Figure 22 : Western Blot sur extraits protéiques totaux de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293.....	98
Figure 23 : Western Blot sur 100µg, 150µg et 200µg d'extraits protéiques totaux sur cellules B RAMOS (n=1)	101
Figure 24 : Vérification de l'enrichissement dans chaque fraction cellulaire.....	102
Figure 25 : Présence de la protéine TLR9 dans la membrane plasmique des lymphocytes B.....	103
Figure 26 : Immunoprécipitation par les anticorps anti-TLR9.....	105
Figure 27 : Evaluation de la pureté des lymphocytes B (LB) d'amygdales humains par cytométrie en flux.....	106
Figure 28 : Evaluation au bioanalyseur de la qualité et de la quantité d'ARN messagers extraits de LB d'amygdales.....	106

<i>Figure 29 : Produits de PCR réalisée pour vérifier la présence des gènes de la GAPDH, de la $\beta 2$ microglobuline ou de la β actine dans l'ADN complémentaire obtenus après rétrotranscription des ARNm de LB d'amygdales humaines.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 30 : Carte génétique de l'ARN messager du TLR9.</i>	<i>107</i>
<i>Figure 31 : Produit de la PCR d'amplification de l'ORF du TLR9.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 32 : Carte du plasmide pCR Blunt-II TOPO contenant l'ORF du TLR9 inséré en sens.</i>	<i>108</i>
<i>Figure 33 : Produits de PCR obtenus après clonage. Les clones 2, 5, 6 et 7 contiennent le plasmide pCR Blunt II Topo avec le gène du TLR9 inséré en sens.....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 34 : Produits de PCR réalisée afin d'insérer les sites de restrictions nécessaires à l'insertion d'un tag hémagglutinine en C-terminal de l'ORF du TLR9.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 35 : Produits de PCR réalisée pour amplifier l'insert sous-cloné dans le plasmide pCR Blunt II-TOPO.</i>	<i>110</i>
<i>Figure 36 : Résultat du séquençage du plasmide pCR BluntII-TOPO-TLR9-hémagglutinine.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 37 : Clonage des bactéries contenant le pcDNA3.1/zeo(+)-TLR9-HA</i>	<i>112</i>
<i>Figure 38 : Représentation schématique de la protéine TLR9-HA exprimée dans des lignées de cellules eucaryotes humaines transfectées avec le plasmide pcDNA3.1/zeo-TLR9-HA</i>	<i>112</i>
<i>Figure 39 : Expression de la protéine TLR9-HA transfectée dans les cellules HEK293.....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 40 : Western blot avec des extraits protéiques issus des transfections de cellules rénales HEK293 avec le plasmique pcDNA3.1-TLR9-HA ou le plasmide pcDNA3.1 vide.</i>	<i>114</i>
<i>Figure 41 : Détection de la protéine TLR9-HA avec les anticorps anti-TLR9 dans les cellules HEK293 transfectées.</i>	<i>115</i>
<i>Figure 42 : Microscopie confocale sur U937-TLR9-HA.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 43 : Caractéristique du TLR9 recombinant</i>	<i>117</i>
<i>Figure 44 : Reconnaissance de la protéine TLR9 recombinante par les anticorps anti-TLR9.</i>	<i>118</i>
<i>Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique par les lymphocytes B autologues</i>	<i>119</i>
<i>Figure 46 : Index de prolifération des lymphocytes T (LT) cultivés in vitro avec des lymphocytes B (LB) de leucémie lymphoïde chronique (LLC).....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 47 : Niveaux d'expression par les lymphocytes B (LB) de leucémie lymphoïde chronique (LLC) classés dans cette étude en groupe régulateur positif ou régulateur négatif de la prolifération de leurs lymphocytes T autologues.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 48 : Heat-Map représentant les niveaux d'expression de gènes de la voie du TLR9 des lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique (LLC) du groupe régulateur négatif ou du groupe régulateur positif</i>	<i>121</i>
<i>Figure 49 : Western Blot sur extraits protéiques totaux de lymphocytes B de LLC du groupe régulateur (REG) ou non régulateur (NON REG) ou de témoins</i>	<i>123</i>
<i>Figure 50 : Comparaison des niveaux d'expression des ARNm et des protéines IRAK-1, IRAK-4 et TANK dans les LB des patients LLC régulateurs positif et régulateurs négatifs par rapport aux contrôles sains (HC).....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 51 : Guide étape par étape de validation des anticorps.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 52 : Projet Minimum Information About Protein Affinity Reagent (MIAPAR)</i>	<i>136</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Récapitulatif historique des découvertes associées aux lymphocytes B régulateurs</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 2 : Récapitulatif du phénotype des populations lymphocytaires B humaines et murines capables d'avoir un comportement régulateur de l'inflammation</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 3 : Propriétés des Pattern Recognition Receptors (PRR).....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 4 : Récapitulatif de l'ensemble des oligonucléotides utilisés</i>	<i>73</i>
<i>Tableau 5 : Récapitulatif et composition des tampons de lyse utilisés pour l'extraction protéique</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 6 : Récapitulatif des informations relatives aux anticorps anti-TLR9 utilisés</i>	<i>93</i>
<i>Tableau 7 : Intensité moyenne de fluorescence des anticorps anti-TLR9 avec ou sans saturation des cellules par 3µM de CpG.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 8 : Récapitulatif des bandes détectées par Western Blot à l'aide des différents anticorps anti-TLR9 par comparaison des extraits de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293.</i>	<i>100</i>
<i>Tableau 9 : Concentration des plasmides purifiés à partir des clones 2 et 7.....</i>	<i>109</i>
<i>Tableau 10 : Concentration du produit de PCR purifié</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 11 : Expression différentielle de gènes associés à la voie de signalisation du TLR9 chez les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique du groupe régulateur négatif par rapport au groupe régulateur positif.</i>	<i>122</i>

Liste des abréviations

5' AMP	5' adénine monophosphate
α -GAL-Cer	α -galactosylcéramide
ACK	ammonium chloride potassium (K)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADO	adénosine
Ac	anticorps
Ag	antigène
AIC	arthrite induite par le collagène
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AP-2/3	<i>adaptor-protein-2/3</i>
ATP	adénosine tryphosphate
autoAg	auto-antigène
ARN	acide ribonucléique
BAFF	<i>b cell activating factor</i>
BANK	<i>b cell scaffold protein with ankyrin repeats</i>
Bm(1-5)	lymphocyte B mature
BCAP	<i>b cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase</i>
BCR	<i>b cell receptor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CD	cluster de différenciation
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	<i>c reactiv proteins</i>

CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte protein 4</i>
CTV	<i>cell trace violet</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DOCK8	<i>dedicator of cytokinesis-8</i>
DTT	<i>dithiothréitol</i>
EAE	<i>encéphalomyélite autoimmune expérimentale</i>
EDTA	<i>éthylènediaminetétraacétique</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FITC	<i>isothiocyanate de fluorescéine</i>
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	<i>glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</i>
GFP	<i>green fluorescente protein</i>
GIFT15	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor IL-15</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GrB	<i>granzyme B</i>
GRM	<i>globules rouges de mouton</i>
GRO- α	<i>growth-related oncogene-α</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i>
HA	<i>hémagglutinine</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMGB	<i>high mobility group box 1</i>
HRP	<i>horse radish peroxydase</i>
HRS	<i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>

IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
iBreg	B _{regs} inductibles
iDNA	ADN interférent
IC-DNA	<i>immune complexe-DNA</i>
IFNAR	<i>interferon α/β receptor</i>
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
ICOS	<i>inducible t cell costimulator</i>
IDO	<i>indoléamine 2,3 dioxygénase</i>
IFN	interferon
Ig	immunoglobuline
I κ B	inhibitor of kappa B kinases
IKK	<i>IκB kinase α</i>
IL	interleukine
IL-1R	<i>interleukine-1 receptor</i>
KO	<i>knock-out</i>
LAMP	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAP	<i>LC3 associated phagocytosis</i>
LB	lymphocyte b
LB _{FO}	lymphocyte b folliculaire
LB _{ZM}	lymphocyte b de la zone marginale
LBreg	lymphocyte b régulateur
LBt	lymphocyte b transitionnel
LC MS	<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>

LES	lupus érythémateux systémique
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LPS	lipopolysaccharides
LT	lymphocyte t
LTc	lymphocyte t cytotoxique
LTh	lymphocyte t <i>helper</i>
LT _{FH}	lymphocyte t folliculaire <i>helper</i>
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
Lyn	<i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MBL	<i>Mannose binding lectins</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MFI	mean fluorescence intensity
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MKK	<i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase</i>
MO	moëlle osseuse
MYD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NETs	<i>Neutrophils extracellular traps</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>natural killer</i>
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
ODN	oligodéoxynucléotides
OLS	organe lymphoïde secondaire
ORF	<i>open reading frame</i>

PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD1	<i>Programmed death 1</i>
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDL1-2	<i>programmed death-ligand 1-2</i>
PFA	paraformaldéhyde
pré-B	cellules précurseurs B
pro-B	cellules progénitrices B
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVDF	polyvinylidene difluoride
Qsp	quantité suffisante pour
RANTES	<i>regulation on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RE	réticulum endoplasmique
RPM	rotation par minute
RPMI	Roswell Park memorial Institute
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SI	système immunitaire
SOC	<i>super optimal broth complemented</i>
SR	récepteurs scavengers
STAT	<i>signal transducer and activators of transcription family</i>
SVFdec	sérum de veau fœtal décomplémenté
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>

T2-MZP	précurseurs de la zone marginale
TAK	<i>Transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TIM-1	<i>t cell Ig domain and mucin domain protein 1</i>
TIR	<i>toll/Il-1 receptor</i>
TMC	<i>tonsil mononuclear cells</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>tumour necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VAMP	<i>vesicule-associated membrane protein 3</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS

ONTOGENESE ET FONCTION DES LYMPHOCYTES B

Généralités

Les lymphocytes B (LB) tirent leur nom de la Bourse de Fabricius chez les oiseaux puis de la moelle osseuse (MO), appelée *bone marrow* en anglais, où sont produits les progéniteurs lymphoïdes dont ils dérivent. Ils participent au système immunitaire (SI) acquis grâce à leur spécificité antigénique qui les rendra immunocompétents, c'est-à-dire capable de reconnaître des antigènes et de produire une réponse efficace *via* la production et la sécrétion d'immunoglobulines. Appartenant au SI adaptatif, 10 à 100 000 clones de LB différents permettent de produire une réponse mémoire plus rapide et plus forte dès la seconde rencontre avec des antigènes dont ils sont individuellement spécifiques.

Génération de LB immatures fonctionnels dans la moelle osseuse

Le développement de LB immunocompétents démarre dans la moelle osseuse où les précurseurs lymphoïdes se différencient en cellules progénitrices B (pro-B) puis en cellules précurseurs B (pré-B) capables de se différencier à leur tour avec l'aide des cellules stromales en LB immatures. Suite à des séquences ordonnées de réarrangements géniques, les LB immatures expriment un récepteur à l'antigène (*B cell receptor*, BCR) unique et spécifique d'un épitope d'un antigène (Ag) donné, antigène qui peut être endogène (autoAg). Le SI met donc en place des mécanismes de contrôle du développement des LB afin d'en éliminer les cellules autoréactives, c'est-à-dire possédant un BCR reconnaissant des autoAg. Ce processus élimine jusqu'à 90% des LB dans la MO. Il existe 3 mécanismes principaux permettant d'optimiser la régulation de l'ontogenèse : l'**édition du récepteur** (remplacement d'un BCR autoréactif), la **délétion clonale** (élimination des LB autoréactifs) et l'**anergie** (état de non activation de LB autoréactifs). Malheureusement, certains LB autoréactifs parviennent à échapper aux mécanismes de sélection et représentent un risque de développement de réactions auto-immunes. A la fin de l'ontogenèse dans la moelle osseuse, les LB immatures rejoignent le sang et la lymphe où ils seront appelés LB transitionnels (figure 1).

Circulation des LB immature en périphérie : les LB transitionnels

Par définition, les LB transitionnels (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IgM⁺ IgD^{+/-}) sont des LB immatures ayant quitté la moelle osseuse. Il s'agit d'une population hétérogène de cellules dont on distingue 3 sous-groupes : LB T1, T2 et T3. Les LB transitionnels de type 1 (LB T1) circulent dans le sang et sont essentiels au maintien de la tolérance périphérique. Notamment

via la production d'IL10, ils régulent le développement et le maintien de l'inflammation (Rosser and Mauri, 2015). Après délétion clonale, une partie seulement de ces cellules atteindra les organes lymphoïdes secondaires (OLS) où les LB T1 se différencieront en LB T2 à l'origine des LB folliculaires (LB_{F0}) et des LB de la zone marginale (LB_{ZM}) (figure 1).

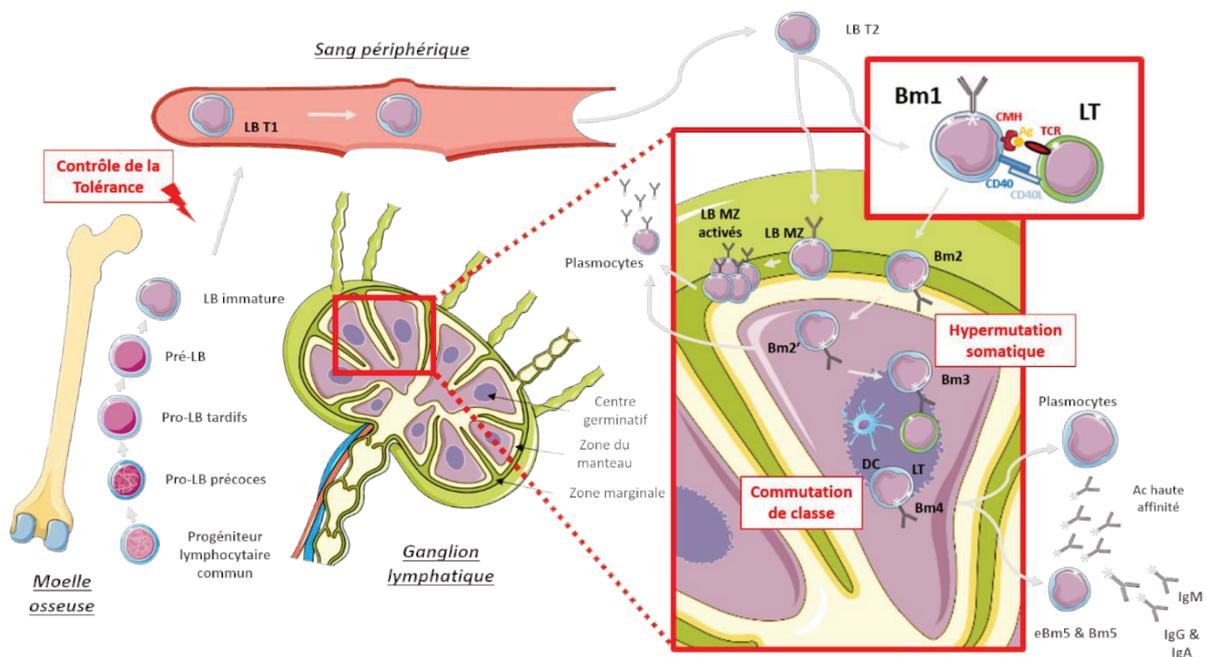


Figure 1 : Ontogenèse des lymphocytes B

Les premiers évènements de l'ontogenèse des lymphocytes B ont lieu dans la moelle osseuse des os longs. A cet endroit, le progéniteur lymphoïde commun se différencie plusieurs fois avant de devenir LB immatures. Au cours de ces étapes de différenciation, des réarrangements géniques permettent au LB immature d'exprimer un récepteur à l'antigène (*B cell receptor*, BCR) spécifique d'un antigène donné. Les LB immatures vont migrer par le sang périphérique vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Dans les OLS, ils vont subir une série de différenciations LT dépendantes ou LT indépendantes aboutissant à la formation de plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en LB mémoires. MZ = zone marginale, Bm = lymphocyte B mature, Ig = Immunoglobuline, DC = cellules dendritiques, LT = lymphocyte T, eBm5 = *early memory B cells*, Bm5 = *memory B cells*, Bm3 = centroblaste, Bm4 = centrocytes.

[Dans les organes lymphoïdes secondaires : différenciation des LB T2 en LB Folliculaires et LB de la zone marginale](#)

Les LB folliculaires

Dans la pulpe blanche des OLS, les LB T2 donnent naissance aux LB_{F0} qui correspondent à la principale population de LB périphériques. Naïfs, ces LB conventionnels

appelés Bm1 (IgD⁺CD38⁻) recherchent la rencontre avec un Ag dépendante des LT à l'intérieur des OLS.

Ces Bm1 peuvent se transformer en LB activés Bm2 (IgD⁺CD38⁺), précurseurs de plasmocytes à courte durée de vie sécréteurs d'IgM.

Ils peuvent également former des centres germinatifs en présence de LT folliculaires *helper* (LT_{FH}) et de cellules dendritiques (*Dendritic cells*, DC) et seront alors appelés Bm2' (IgD⁺CD38⁺⁺). Les LT_{FH} et DC vont permettre au Bm2' de s'activer par la présentation antigénique. Au cours de cette phase de développement dépendante de l'Ag, la maturation d'affinité permet une augmentation progressive de l'affinité moyenne des anticorps (Ac) produits grâce à une hypermutation somatique.

L'ensemble de ces étapes permet d'obtenir des Bm3 ou centroblastes (IgD⁻CD38⁺⁺CD77⁺) et Bm4 ou centrocytes (IgD⁻CD38⁺⁺CD77⁻) qui subissent une commutation de classe entraînant un changement isotypique des Ac produits. Ces LB matures et activés se multiplient au cours de l'expansion clonale et se différencient en plasmocytes producteurs d'Ac de haute affinité (IgD⁻CD38⁺CD138⁺) ou en LB mémoires (*early* Bm5 IgD⁻CD38⁺CD27⁺ et Bm5 IgD⁻CD38⁻CD27⁺) (figure 1).

Les LB de la zone marginale et LB du manteau

Une autre partie des LB T2 dans les OLS ne formera pas de follicule mais se retrouvera localisée dans la zone dite « extrafolliculaire ». Ils formeront deux groupes distincts en fonction de leur localisation précise : soit dans la zone marginale, alors appelée LB_{ZM} (IgM⁺IgD⁻CD23⁻CD5⁻) ou dans le manteau (LB CD5⁺).

La zone marginale correspond à une région diffuse de séparation entre la pulpe rouge et la pulpe blanche dans la rate. Les LB_{ZM} sont en présence de macrophages, de cellules stromales et représentent 10% des LB spléniques. Ils sont spécialisés dans la réponse aux infections systémiques et, après multiplication et différenciation, deviendront des plasmocytes producteurs d'Ac de faible affinité principalement dirigés contre des glucides.

Le manteau correspond à la seconde structure extrafolliculaire des OLS. S'y retrouvent des LB exprimant le marqueur CD5, producteurs d'anticorps polyréactifs (figure 1).

Les LB B1 de la cavité péritonéale, ou LB « innés »

Les LB B1, souvent appelés « LB innés » sont localisés dans le péritoine et les cavités pleurales. Possédant des progéniteurs qui leurs sont propres, les LB B1 apparaissent rapidement

dans le développement. Ils représentent 5% de la population totale de LB, sont capables de s'auto-renouveler et de produire des Ac de faible affinité qui leur confèrent une multispécificité (figure 1).

Les lymphocytes B régulateurs

Découverte et phénotypes

Dans des modèles animaux

La défense immunitaire repose sur un équilibre entre inflammation et régulation. Si un rôle d'inhibition de l'inflammation a déjà été associé à des LT et des DC, le concept de LB aux propriétés régulatrices est une découverte plus récente (Mauri and Menon, 2015a).

La première apparition du concept de LB régulateur (LB_{reg}) remonte à une étude conduite dans un modèle de cochons d'Inde souffrant d'une réaction d'hypersensibilité retardée au niveau de la peau (Katz et al., 1974; Neta and Salvin, 1974). Des animaux traités avec du cyclophosphamide, ainsi déplétés en cellules immunitaires, ont été stimulés avec de l'ovalbumine. Quelques jours plus tard, ces animaux ont reçu par transfert adoptif des splénocytes d'autres animaux pré-stimulés avec de l'ovalbumine: soit des splénocytes totaux, soit des splénocytes déplétés en LB. Les auteurs ont alors pu constater que la réaction cutanée des cochons d'Inde ayant reçu des LB dans la fraction de splénocytes totaux était moins importante que celle des animaux n'ayant pas eu de LB (Tableau 1).

Douze ans plus tard, une nouvelle étude réalisée dans un modèle murin d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (Mizoguchi et al., 1997; Wolf et al., 1996) a permis de renforcer l'idée de l'existence de LB_{reg}. Dans ce modèle, une mutation de la chaîne μ de la région transmembranaire du BCR a permis d'obtenir des souris déplétées en LB (B10.PL(μ MT)). Ces souris souffraient de symptômes beaucoup plus violents que les souris témoins. Les auteurs concluent que, si les LB n'étaient pas impliqués dans le développement de la pathologie, ils étaient en revanche capables de la moduler.

Ce n'est qu'en 2002 que le terme LB régulateur apparaît (Fillatreau et al., 2002; Mizoguchi et al., 2000). Dans cette étude conduite dans un modèle murin de colite chronique spontanée, le transfert adoptif d'une population de LB matures (CD38⁺) permettait de diminuer le nombre de LT pathogéniques (TCR $\alpha\beta$ ^{faible}) et de LB auto-réactifs, limitant ainsi l'évolution de la pathologie. Il est alors décrit que la fonction de régulation associée aux LB est médiée par contact cellulaire via l'interaction CD40-CD40L et la molécule de co-stimulation CD86. Ce dernier point a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'Ac monoclonaux bloquants anti-CD40

et anti-CD86 qui a eu pour conséquence de ne pas réduire le nombre de LT pathologiques chez les souris après transfert de LB (Mauri et al., 2003).

Deux ans plus tard, la même équipe montre dans ce même modèle de colite que la présence d'une sous-population de LB de l'intestin (*Gut Associated Lymphoid Tissue*, GALT) permet de diminuer l'importance de l'inflammation grâce à la sécrétion de l'IL10 et à la surexpression du marqueur membrane CD1d. Ces signaux semblent limiter la progression de l'inflammation en diminuant les signaux pro-inflammatoires médiés par l'IL1 et le facteur de transcription *signal transducer and activators of transcription family* (STAT) 3.

En 2009, un laboratoire de Montréal démontre que le facteur *granulocyte-macrophage colony stimulating factor IL15* (GIFT15) est capable de générer des LB_{reg} *ex vivo* au phénotype proche des LB producteur de IL-10 (B10) et des précurseurs de la ZM appelés T2-MZP LB en envoyant un signal aberrant via le récepteur à l'IL15 aux cellules lymphomyéloïdes (Rafei et al., 2009). Ces cellules transférées par voie intraveineuse à un modèle murin d'EAE ont permis de conduire à la rémission complète de la maladie et à une suppression de la neuroinflammation.

En 2011, Ding et al. établissent l'importance du facteur *T cell Ig domain and mucin domain protein 1* (TIM-1) dans la tolérance périphérique lorsqu'il est exprimé à la surface de LB. Ces LB TIM-1+ sont pour une large majorité une population hétérogène de LB_{reg} IL10⁺ comprenant des LB transitionnels (LB_{transi}), des LB_{ZM}, des LB_{FO} et des B10 CD1d^{hi} CD5⁺. Ces LB_{reg} expriment l'IL4 et l'IL10, promouvant ainsi la réponse Th2 et permettant la tolérance d'allogreffe.

Enfin, une étude datant de 2012 démontre que les DC_{reg} sont capables de programmer des LB T1, T2, ZM et B1 de la rate pour qu'ils constituent une population distincte de LB_{reg} au phénotype CD19^{hi} Fc_γIIb^{hi} (Qian et al., 2012). Ces LB sécrètent de l'IL10 *in vitro* et *in vivo* et exercent également des fonctions régulatrices.

Année	Découverte	References
1974	Cochons d'Inde : LB retardent d'hypersensibilité après transfert adoptif	Katz et al. (1974), Neta and Salvin (1974)
1996, 1997	Souris : souris déficientes en LB développent des colites exacerbées et une EAE	Mizoguchi et al. (1997), Wolf et al. (1996)
2002	Souris chimériques LB-IL-10 ^{-/-} souffrent d'une maladie auto-immune Souris : Inflammation intestinale induit des LB _{reg} dans les GALT	Fillatreu et al. (2002) Mizoguchi et al. (2002)
2003	Souris : Les LB activés par le CD40 suppriment l'arthrite après transfert adoptif	Mauri et al. (2003)
2007	Souris : LB T2-MZP suppriment l'arthrite après transfert adoptif Souris : corps apoptotiques induisent des LB _{reg} Souris : LB régulent l'EAE en induisant des LT _{reg} via le marqueur B7	Evans et al. (2007) Gray et al. (2007) Mann et al. (2007)
2008	Souris : LB B10 CD5 ⁺ CD1d ^{hi} régulent les réponses inflammatoires dépendantes des LT Souris : Les LB activés par les TLR suppriment l'EAE après transfert adoptif	Yanaba et al. (2008) Lampropoulou et al. (2008)
2009	Souris : le facteur GIFT-15 induit des LB _{reg}	Rafei et al. (2009)
2010	Hommes : La différenciation Th1 est supprimée par des LB immatures producteurs d'IL-10	Blair et al. (2010)
2011	Souris : Les LB _{reg} protège de l'AIA en induisant des Lt _{reg} et en supprimant les LT effecteurs Souris : L'IL-10 produit par des LB est contrôlée par des senseurs calciques intracellulaires, STIM-1 and STIM-2 Souris : les Lb _{reg} suppriment la réponse LT CD8 ⁺ dans le cancer Hommes : Les LB CD24 ^{hi} CD27 ⁺ humains sont identifiés comme équivalents des LB B10 murins.	Carter et al. (2011) Matsumoto et al. (2011) Iwata et al. (2011)
2012	Souris : IL-21 induit des LB B10	Yoshizaki et al. (2012)
2013	Hommes : LB immatures suppriment la polarisation Th1 & Th17, et induisent des Ltreg fonctionnels Hommes : La tolérance à long terme aux antigènes allergiques est associée avec une augmentation de la production d'IgG4 par les LBregs.	Flores-Borja et al. (2013) van de Veen et al. (2013)

Tableau 1 : Récapitulatif historique des découvertes associées aux lymphocytes B régulateurs

LB = lymphocyte B, LB_{reg} = lymphocyte B régulateur, EAE = encéphalomyélite allergique expérimentale, IL = interleukine, GALT = *gut associated lymphoid tissue*, CD = cluster de différenciation, LB T2-MZP = lymphocyte B transitionnels 2-précurseurs de la zone marginale, TLR = *Toll-like receptors*, GIFT-15 = *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, AIA = anastomose iléo-anale, STIM = *stromal interaction molecule*, LT_H = lymphocyte T *helper*, Ig = immunoglobuline (d'après Mauri et Menon, 2015).

Chez l'Homme

❖ Les LB immatures CD24^{hi}CD38^{hi}

En 2010, une équipe décrit que par la stimulation de cellules du sang périphérique de témoins sains *via* le CD40, il est possible d'observer l'émergence de B10 dont la plupart expriment les marqueurs de LB transitionnels CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} et sont capables de supprimer la différenciation des LTh1 *via* la production d'IL10 et l'interaction entre le CD80, le CD86 et leurs ligands (Blair et al., 2010). En revanche, les LB CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} issus de patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES) n'ont pas cette capacité de

suppression après stimulation par le CD40. Des éléments suggèrent que ces LB auraient un défaut de conduction du signal en aval du CD40 associé à un défaut d'activation par phosphorylation de STAT3. La même année, une autre étude démontre que les LB humains stimulés au niveau de leur BCR par un Ac anti-Ig et de leur *Toll-like receptor* (TLR) 9 par du CpG produisent de l'IL10 et sont enrichis en LB CD27⁺ et en LB transitionnels (Bouaziz et al., 2010) (Tableau 2).

❖ Les B10 CD24^{hi}CD27⁺

En 2011, Iwata et al. établissent que, de manière basale, les LB CD24^{hi}CD27⁺ produisent davantage d'IL10 que les LB CD24^{lo}CD27⁻ et sont davantage capables de répondre *ex vivo* aux stimulations de leur CD40 ou par le CpG ou le lipopolysaccharide (LPS). Ils sont capables de réguler la production de cytokines par les monocytes. Khoder et al. assoient cette démonstration en écrivant que les LB IgM⁺CD27⁺ sont en mesure d'inhiber la prolifération des LT CD4⁺ ainsi que leur production d'IL2, d'IFN γ et de TNF α (Iwata et al., 2011; Khoder et al., 2014) (Tableau2).

❖ Les LB CD38⁺CD1d^{hi}IgM⁺CD147⁺GrB⁺

Les LB CD38⁺CD1d^{hi}IgM⁺CD147⁺GrB⁺ expriment, comme leur nom l'indique, le granzyme B (GrB) et agissent de manière indépendante de l'IL10 sur l'inflammation. Le granzyme B est une sérine protéase capable d'induire l'apoptose de ses cibles. Principalement marquée sur les cellules *natural killer* (NK) et les LT cytotoxiques, l'expression de GrB est associée à celle de *indoléamine 2,3 dioxygénase* (IDO). IDO est une autre molécule immunorégulatrice également découverte à la surface des LB naïfs après stimulation conjointe du BCR et par l'IL21 (Ettinger et al., 2005).

Cette population LB CD38⁺CD1d^{hi}IgM⁺CD147⁺GrB⁺ a été identifiée pour la 1^{ère} fois dans le microenvironnement de tumeurs solides chez l'Homme (Lindner et al., 2013). Ces LB sécrétant le granzyme B et l'IL10 sous stimulation par l'IL21 produite par les LB CD24⁺ sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des LT en dégradant leur TCR. Cette population a également été retrouvée chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kaltenmeier et al., 2015). Suite à la perte de l'expression du CD40L, les LB_{reg} sont induits aux dépens de la différenciation en plasmocytes, contribuant au dysfonctionnement de la réponse immunitaire (Tableau 2).

❖ Les LBr1 CD25^{hi}CD71^{hi}CD73^{lo}

Les LB Br1 (CD25^{hi}CD71^{hi}CD73^{lo}) ont été mis en évidence dans un modèle humain d'allergie au venin d'abeille (van de Veen et al., 2013). Les LB Br1 contribuent au maintien de la tolérance en produisant une grande quantité d'Ac IgG4a anti-allergènes, une Ig produite suite à l'exposition prolongée d'un individu à un allergène. Ces LB Br1 agissent également en supprimant la prolifération des LT allergènes-spécifiques ainsi que la production d'IgE (tableau 2).

❖ Les plasmablastes CD27^{int}CD38^{hi}

La présence de ces cellules a été démontrée chez l'Homme dans le contexte du développement de la maladie du greffon contre l'hôte (de Masson et al., 2015). Les auteurs ont montré que plus le nombre de plasmablastes CD27^{int}CD38^{hi} sécrétant d'IL10 était diminué chez les patients, plus sévère était la pathologie (tableau 2).

❖ Les LB CD39⁺CD73⁺

Les LB CD39⁺CD73⁺ exercent leur influence directement sur l'environnement inflammatoire grâce à leur production d'adénosine. Les marqueurs CD39 et CD73 sont des ectonucleotidases. Leur fonction est d'hydrolyser l'adénosine tryphosphate (ATP) en adénosine 5'-monophosphate (5'-AMP) et adénosine. Dans une étude datant de 2013, les auteurs activent les LB CD39⁺CD73⁺ *in vitro* avec du CD40L et de l'IL4, induisant ainsi l'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ via la production de 5'-AMP (Saze et al., 2013). Chez les souris, elles sont exprimées sur les cellules B1 et il a été remarqué que le transfert de LB-1 CD73⁺ chez des souris CD73^{-/-} souffrant de colites a permis de diminuer la réponse inflammatoire en corrélation avec l'augmentation d'adénosine dont le rôle anti-inflammatoire a été précédemment établi (Kaku et al., 2014) (tableau 2).

❖ Les iB_{regs}

Comme d'autres cellules immunosuppressives, des B_{regs} inductibles (iB_{regs}) peuvent émerger suite à certains stimuli. Les LT CTLA-4⁺ encouragent la différenciation d'une population de LB appelés iB_{regs} capables de moduler les réponses immunes via la production de *Tumor Growth Factor bêta* (TGF-β) et d'IDO qui convertissent les LT en LT_{regs} producteurs de TGF-β et d'IL10 (Nouël et al., 2015) (tableau 2).

❖ Les LB CD19⁺TIM1⁺

La glycoprotéine TIM-1 est une molécule de co-stimulation exprimée à la surface des LT CD4⁺ ainsi que par 70% des LB_{reg} (Ding et al., 2011). C'est un facteur nécessaire à l'induction et au maintien de la fonction régulatrice dont l'effet est médié par le domaine mucine. La stimulation de LB avec un Ac anti-TIM-1 permet l'augmentation de la sécrétion d'IL4 et d'IL10 et augmente la réponse Th2.

En conclusion, plusieurs études ont permis de démontrer l'existence de LB aux fonctions régulatrices de l'inflammation dans le sang et les organes lymphoïdes dans des modèles animaux comme chez l'Homme. Ils semblent représenter moins de 10% des LB totaux en circulation chez un individu sain. Leur fonction est au moins partiellement dépendante de la production d'IL10 (Mauri and Menon, 2015b) et aucun facteur de transcription ou marqueur de surface unique et discriminant n'a été découvert à ce jour (tableau 2).

Sous-types	Phénotype LB _{reg} humains	Phénotype LB _{reg} murins	Mécanismes de suppression
LB immatures	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}		IL-10, PD-L1
LB « B10 »	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	CD19 ^{hi} CD1d ^{hi} CD5 ⁺	IL-10
LB CD19 ⁺ CD1d ⁺	-	CD19 ⁺ CD1d ⁺ CD21 ^{int} CD23 ^{hi} CD62 ^{lo} IgM ^{int}	
LB GrB ⁺	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	CD19 ⁺ GrzB ⁺	GrB, IL-10, IDO
LB T2-MZP	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi}	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{hi} CD1d ^{hi}	IL-10
LB MZ	-	CD19 ⁺ CD21 ^{hi} CD23 ⁺ CD24 ^{hi} IgM ^{hi} IgD ^{lo} CD1d ^{hi}	IL-10
LB Br1	CD25 ^{hi} CD71 ^{hi} CD73 ^{lo}	-	IL-10, IgG4
Plasmablastes	CD27 ^{int} CD38 ^{hi}	CD138 ⁺ CD44 ^{hi}	IL-10
Plasmocytes		CD138 ^{hi} IgM ⁺ TACI ⁺ CXCR4 ⁺ CD1d ^{hi} Tim1 ^{int}	IL-10, IL-35
iBregs			TGF-β, IDO
LB B1a		CD5 ⁺	IL-10
LB TIM-1 ⁺		CD19 ⁺ TIM-1 ⁺	IL-10
LB PD-L1 ^{hi}		CD19 ⁺ PD-L1 ^{hi}	PD-L1
LB FoxP3	CD19 ⁺ FoxP3 ⁺		
LB GIFT-15		B220 ⁺ CD21 ⁺ CD22 ⁺ CD23 ⁺ CD24 ⁺ CD1d ⁺ CD138 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺	IL-10

Tableau 2 : Récapitulatif du phénotype des populations lymphocytaires B humaines et murines capables d'avoir un comportement régulateur de l'inflammation

(d'après Mauri et Menon, 2015).

Rôle du microenvironnement dans l'induction de la fonction B régulatrice

L'origine et le développement de la grande diversité de phénotypes de LB_{reg} que nous avons rapportés plus haut est aujourd'hui encore sujette à controverse. Cependant, il est certain que, si la production d'IL10 peut se faire de manière spontanée, elle peut également être induite par des facteurs environnementaux (Iwata et al., 2011; Lindner et al., 2013; Liu et al., 2014; Matsumoto et al., 2014). Plusieurs études se sont penchées sur l'identification de ces stimuli ou combinaison de stimuli qui permettent de créer un microenvironnement favorable et durable au développement des LB_{reg} (Rosser et al., 2014) (figure 2).

Signal par le CD40

La molécule CD40 est une protéine membranaire de la famille des *tumor necrosis factors* (TNF) localisée à la surface de cellules présentatrices d'antigène dont les LB, et jouant le rôle de facteur de co-stimulation lorsqu'il se lie à son ligand, le CD40L, présent à la surface des LT activés. Le CD40 est impliqué dans de nombreux processus immunologiques dont la maturation des LB. Le rôle joué par le CD40 dans l'induction du caractère régulateur des LB a été démontré dans plusieurs études (figure 2).

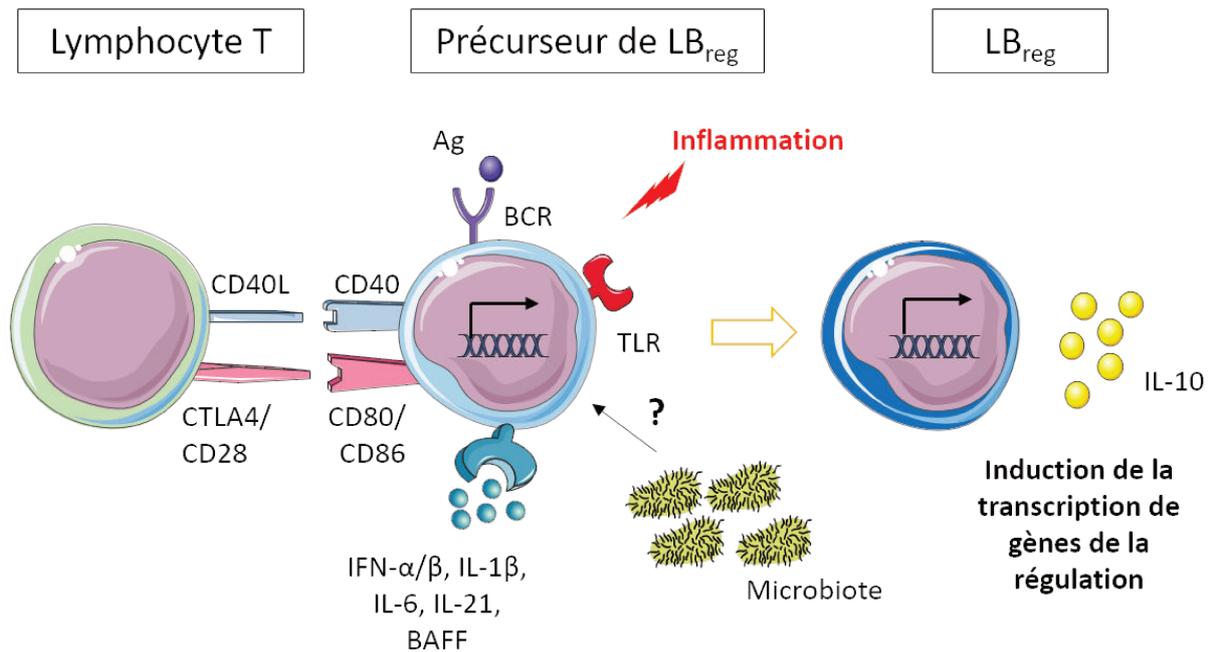


Figure 2 : Induction du caractère régulateur des lymphocytes B producteurs d'IL-10

Il est possible de générer des LB régulateurs (LB_{reg}) producteurs de l'IL-10 et exprimant des gènes régulateurs. Plusieurs signaux participent à cette induction : la costimulation par des lymphocytes T (LT), les TLRs, le microbiote et les cytokines (tiré de Mauri & Menon, 2017).

En 2002, une équipe montre, après blocage du CD40 dans un modèle murin d'EAE (B6 CD40^{-/-}), que les LB sont alors moins capables de produire de l'IL10 et les souris moins capables de se remettre de l'encéphalomyélite dont ils souffrent (Fillatreau et al., 2002). Un an plus tard, l'équipe de Claudia Mauri établit qu'après une stimulation par le CD40 de LB murins, une production d'IL10 commence et des souris souffrant d'arthrite induite par le collagène (AIC) ont pu se remettre de leur maladie (Mauri et al., 2003). La stimulation du CD40 semble donc nécessaire à la suppression de l'EAE et de l'AIC, ce qui suggère que l'interaction entre les LB et les LTh CD4⁺CD40L⁺ est nécessaire à la suppression de l'inflammation médiée par les LB.

Chez l'Homme, d'autres études confirment l'importance du CD40 dans l'induction de la régulation par les LB. En 2008, des LB du sang périphérique ont été stimulés *in vitro* à l'aide de CD40L. Ces LB étaient alors capables d'induire des LT_{reg} CD4^{hi}CD25⁺Foxp3⁺ qui eux-même suppriment les LT CD4⁺CD25⁻ (Tu et al., 2008). Il a également été montré qu'une stimulation des LB CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} par le CD40L induit une expansion cellulaire et supprime la différenciation Th1. Cependant les LB CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} du sang périphérique de patients atteints LES sont insensibles à la stimulation CD40L et produisent peu d'IL10. D'autre part, ces LB étaient incapables d'éliminer les LT CD4⁺CD25⁻ de donneurs sains. Les auteurs ont ainsi démontré que, dans le cas précis du Lupus Erythémateux Systémique (LES), un défaut intrinsèque de la voie CD40 des LB nuit au développement de leur caractère régulateur (Blair et al., 2010).

Signal par le BCR

Le rôle joué par le BCR dans le développement d'une régulation par les LB a été suggéré mais n'est pas clairement établi. En 2007, une étude conduite sur un modèle murin de diabète de type I auto-immun (souris *non-obese diabetic*, NOD) a permis de montrer qu'en présence de LT, les LB des souris NOD produisent plus d'IL10 après une stimulation par un Ac anti-IgM (Hussain and Delovitch, 2007). De plus, le transfert syngénique de ces LB activés *in vitro* par le BCR à des souris NOD permet de limiter le développement de la pathologie grâce à la production d'IL10. Par ailleurs, il a été remarqué que la déficience en CD19, co-récepteur du BCR, chez des souris *knock-out* (KO) pour ce gène (*cd19*^{-/-}), est la cause d'une diminution de plus de 80% de LB_{reg} CD1d^{hi}CD5⁺ ainsi que du nombre de LB IL10⁺ (Yanaba et al., 2009) (figure 2).

Signal par les TLR

Les *Toll-like receptors* (TLR) sont une famille de récepteurs de l'immunité innée présents sur de nombreux types cellulaires. Ils sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés à des pathogènes (*PAMP : pathogen associated molecular pattern*) et d'induire une cascade de signalisation requérant la mobilisation de la protéine adaptatrice *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88). MYD88 conduit le signal provenant de la liaison d'un TLR avec son ligand, ce qui aboutit à la production d'une réponse immunologique. Certains PAMPs en particulier encouragent la différenciation des LB en plasmocytes et favorisent la réponse humorale (Krieg and Vollmer, 2007). Parmi ces PAMPs, il existe le lipopolysaccharides (LPS) et les motifs répétés de dinucléotides CpG non méthylés qui activent respectivement les TLR4 et TLR9. Notons que l'expression des différents TLR varie d'une espèce à l'autre. L'expression du TLR4 par les LB humains est quasi nulle, même après activation cellulaire, contrairement au TLR9 qui y est exprimé. C'est pourquoi la stimulation des LB humains requiert préférentiellement le CpG- oligodéoxynucléotides (ODN), un équivalent synthétique aux motifs CpG méthylés retrouvés naturellement dans le matériel génétique bactérien (figure 2).

En 1990, une équipe montre que les B1a CD5⁺ du péritoine de souris produisent une quantité particulièrement importante d'IL10 après une stimulation au LPS *in vitro* (O'Garra et al., 1990). En 2001, le transfert adoptif de LB activés avec du LPS *in vitro* à des souris NOD semble les protéger contre le diabète de type 1 (Tian et al., 2001). L'année suivante, l'équipe de Fillatreau démontre qu'une signalisation par des TLR permet d'initier la production d'IL10 par des LB naïfs. Cependant, ces LB semblent avoir également besoin de la signalisation du CD40 et du BCR pour permettre cette production (Fillatreau et al., 2002). Un modèle d'induction de la production optimale d'IL10 par les LB a alors été suggéré et requiert une activation en deux temps :

- étape initiale : une pré-stimulation par les TLR qui seule ne permet d'induire que quelques B10
- étape suivante : la stimulation par le BCR et/ou le CD40 permet alors d'amplifier le nombre de B10. Ces stimulations sont classiquement impliquées dans la survie et la prolifération des LB.

C'est donc souvent dans des conditions combinatoires de stimulation que le TLR9 parvient à induire la production d'IL10 par les LB (Barr et al., 2007; Harris et al., 2000, 2005; Lampropoulou et al., 2008a).

En 2005, une équipe démontre qu'une stimulation de LB murins de la zone marginale par du CpG-ODN induit la sécrétion d'IL10 par ces cellules (Lenert et al., 2005). Il a, par ailleurs, été montré qu'une stimulation au CpG-ODN permet l'inhibition de la progression de la maladie dans un modèle murin d'EAE (Lampropoulou et al., 2008a).

Neves *et al.* montrent en 2010 que, chez la souris, les plasmocytes spléniques CD19⁺CD138⁺ au cours d'une infection bactérienne par *Salmonella typhimurium* produisent de l'IL10. De plus, lorsque les LB sont déficients pour le gène *myd88*, il n'y a pas de production d'IL10, ce qui indique que dans ce modèle d'infection bactérienne, la contribution de la signalisation par les TLR à la production d'IL10 est essentielle (Lampropoulou et al., 2010). Bouaziz *et al.* ont montré que le signal optimal permettant, à partir de LB périphériques humains, d'induire *in vitro* la production d'IL10 par des LB mémoires (CD27⁺), des LB CD5⁺ et des LB immatures transitionnels (CD38^{hi}CD24^{hi}) est la combinaison de CpG-ODN avec un Ac anti-IgM (Bouaziz et al., 2010). En revanche, chez la souris, les LB de la rate traités au LPS ou avec une costimulation par le TLR4 et le CD40 pendant 48h permettent d'induire davantage de B10 CD1d^{hi}CD5⁺ et une production optimale d'IL10 après stimulation par PMA et ionomycine *in vitro* pendant 5h (Yanaba et al., 2009).

Le rôle capital joué par le TLR9 dans l'induction des LB_{reg} a été souligné dans une étude utilisant un modèle murin de LES où les animaux MRL/MP^{lpr/lpr}, déficientes en TLR9, présentaient une augmentation de la production d'interféron gamma (IFN γ) et une inflammation plus importante. Une étude suggère que les LB développent une activité régulatrice en fonction des conditions d'activation et en particulier en fonction des ligands de TLR disponibles (Fillatreau et al., 2008). En effet, le TLR7 semble jouer le rôle opposé à celui du TLR9 : sa délétion entraînant une amélioration des symptômes de la maladie chez ces souris lupiques (Christensen et al., 2006; Prinz et al., 2006). La balance entre ces deux TLR contrôle donc l'initiation, la progression et la résolution de l'inflammation médiée par les LT.

Il est intéressant de noter que si certains TLR semblent antagoniser leurs effets, un rôle double est également joué par certains ligands en fonction du type cellulaire qu'ils stimulent. Dans le cas de maladie de Crohn (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) par exemple, ces molécules peuvent induire soit une protection soit une aggravation de la maladie (Sartor, 2004) (figure 3).

Au sein d'une même espèce, le TLR9 est exprimé principalement par les cellules présentatrices d'antigène et donc par les DC de même que par les LB. Son ligand, le CpG, est utilisé de manière différente par ces deux types cellulaires (Fillatreau et al., 2008).

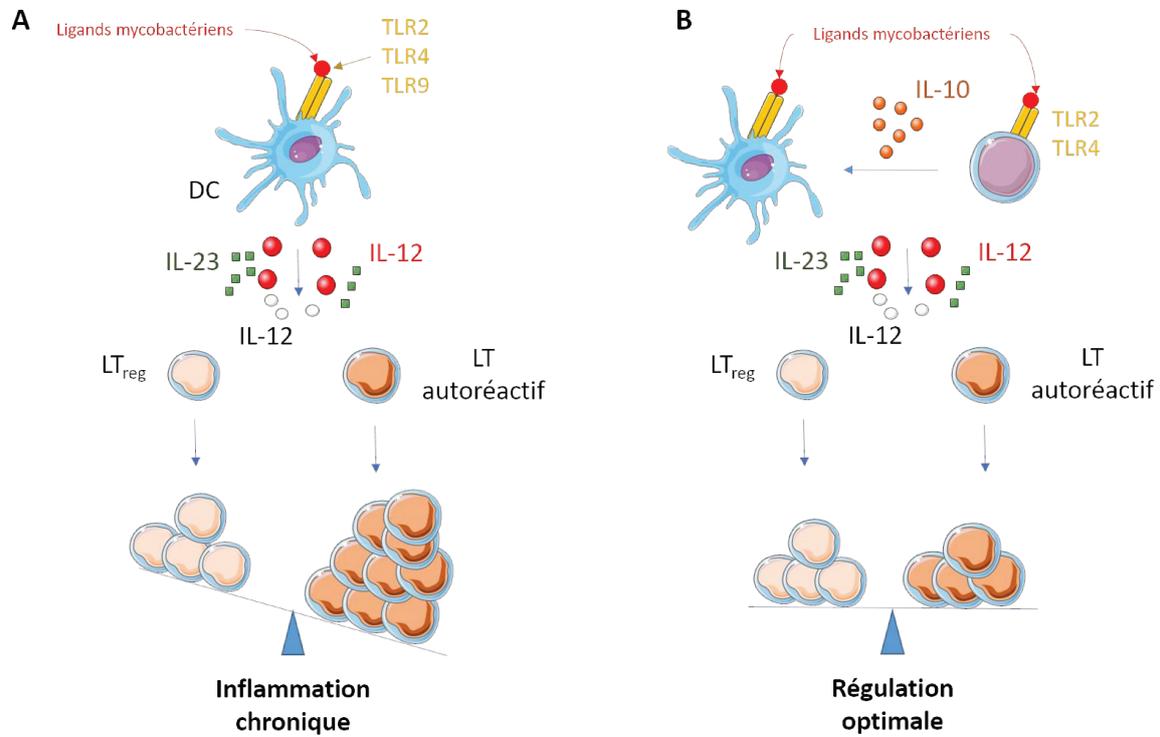


Figure 3 : Modèle de contrôle de la réponse auto-réactive par la stimulation des lymphocytes B via les Toll-like receptors

A : les cellules dendritiques (DC) immunisées par un autoantigène via les Toll-like receptors (TLR) 2, 4 et 9 induisent la prolifération de lymphocyte T (LT) CD4+ autoréactifs et à une hyperinflammation incontrôlable. **B :** La stimulation concomittante de LB via les mêmes TLR au début de la réponse inflammatoire induit la production d'IL-10 par ces cellules. Cela limite l'expansion des LT autoréactifs et permet le contrôle de l'inflammation (d'après Fillatreau *et al.*, 2008)

Il existe plusieurs formes de CpG différentes par de légères variations dans la structure. Le CpG-A contient une séquence palindromique centrale de CpG-PO (phosphodiester) et une queue 3' poly-G modifiée. Il forme spontanément des complexes de type nanoparticules (Kerkmann et al., 2005). D'une structure hautement stable, le CpG-A peut être endocyté efficacement pour rejoindre le TLR9 au niveau des endosomes et induire une forte stimulation et maturation des DC et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) en particulier, ainsi

qu'une production de grandes quantités d'IFN α , de cytokines pro-inflammatoires qui encourage la prolifération des LT effecteurs. A contrario, le CpG-B consiste en une séquence monomérique de 18-28mer d'oligodeoxynucleotides linéaires contenant un motif 6mer CpG (GTCGTT) chez l'Homme ; GACGTT chez la souris) qui active efficacement les LB mais ne permet qu'une faible production d'IFN α (Gürsel et al., 2002; Krieg, 2002; Verthelyi and Zeuner, 2003). Les LB ainsi activés vont produire de l'IL10 et induire une régulation de l'inflammation par les DC en parallèle, cela aboutissant à une inhibition de l'activation des LT effecteurs (Barr et al., 2007; Lampropoulou et al., 2008a).

Au sein de notre laboratoire, un modèle de co-culture de LB humains avec des LT autologues issus d'amygdales ou de sang périphérique et stimulés respectivement pendant 5 jours avec du CpG-ODN et des Ac anti-CD3-anti-CD28 nous permet d'induire la fonction LB régulatrice et de l'étudier (Lemoine et al., 2011).

Signal par les facteurs solubles

❖ IL1 β , IL6, IL21

En 2014, une étude suggère que la génération de LB_{reg} est en partie sous l'influence de facteurs solubles présents dans le micro-environnement. En effet, dans le microbiote intestinal des souris, l'IL1 β et l'IL6 produits par les macrophages et les DC permettent l'induction de LB_{reg} ainsi que la promotion de l'inflammation. (Rosser et al., 2014). Les auteurs réalisent une stimulation *in vitro* de LB naïfs avec de l'IL1 β et l'IL6, ce qui aboutit à l'augmentation de 5 fois du nombre de LB CD5⁺, LB TIM-1⁺ et B10. Cette augmentation de cellules productrices d'IL10 est également observable chez les souris traitées avec ces deux cytokines.

L'IL21 conduit également à l'apparition de LB_{reg} qui sont producteurs de GrB (Lindner et al., 2013) et d'IL10 (Yoshizaki et al., 2012).

❖ BAFF

La cytokine *B cell activating factor* (BAFF) est membre de la famille du TNF et joue un rôle clé dans la régulation de la maturation des LB et de leur survie. C'est ce que démontre en effet Schiemann *et al.* en 2001 avec un modèle de souris BAFF KO, où un examen des OLS a permis de révéler une perte quasi complète de la ZM et folliculaire. Les auteurs démontrent ainsi que BAFF joue un rôle crucial dans le développement des LB (Schneider et al., 2001). De plus, cette cytokine permet en culture *in vitro* de différencier les LB CD19⁺ de la rate en B10

CD5⁺CD1d^{hi} présentant des phénotypes proches de ceux des LB CD21^{hi}CD23^{low} de la ZM (Yang et al., 2010).

Sur d'autres souris BAFF KO, Walters *et al.* apportent de nouvelles preuves que BAFF est capable d'induire *in vivo* l'expansion de LT_{reg} CD4⁺FoxP3⁺ et CD62^{low}CD103^{hi}ICAM-1^{hi}, phénotype correspondant à celui de LT localisés dans les sites inflammatoires. Cette expansion est induite *via* les LB qui expriment largement les récepteurs à cette cytokine (Walters et al., 2009). Enfin, de faibles doses de BAFF pendant trois jours de culture *in vitro* induisent une augmentation sélective de LB CD1d^{hi}CD5⁺ et la production d'IL10, ainsi qu'une augmentation du nombre de B10 *in vivo* dans les ZM de la rate (Yang et al., 2010).

❖ GIFT15

En 2009, Rafei *et al.* démontrent que, *ex vivo*, un traitement de splénocytes murins par le facteur GIFT15 agit *via* le récepteur à l'IL15 sur les LB CD19⁺. Cela permet l'apparition d'une population de LB_{reg} au phénotype hybride entre les B10 CD1d^{hi}CD5⁺, les LB T2-MZP et plasmocytes CD138⁺. Cette population transférée à un modèle murin de l'EAE permet la complète rémission de la maladie (Rafei et al., 2009). Cet effet a été annulé sur les animaux déficients pour le facteur de transcription STAT6, pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) ou encore déficients en IL10, ce qui confirme l'importance de ces molécules dans l'établissement de la régulation par les LB.

❖ Les corps apoptotiques

En 2007, une étude montre que les corps apoptotiques agissent comme des signaux endogènes et déclenchent la production d'IL10 par les LB de la rate, de la zone marginale préférentiellement de la ZM par rapport aux LB_{FO}, ce qui encourage les LT à produire de l'IL10 également et qui conduit à l'amélioration de l'AIC (Gray et al., 2007).

❖ DC régulatrices

Enfin, notons que les DC régulatrices peuvent également induire un changement du phénotype des LB de la rate par l'expression du CD40L et la sécrétion d'IFN β . Ces LB ainsi générés expriment le phénotype CD19^{hi}Fc γ IIB^{hi} et inhibent la réponse LT CD4⁺ *via* l'IL10 (Qian et al., 2012).

Les mécanismes d'action des LB régulateurs

Pour mettre en place leur action de régulation de l'inflammation, les LB_{reg} vont agir par différents moyens. Nous l'avons déjà vu, la production de la cytokine IL10 est capitale. En

effet, chez la souris, deux populations de LB_{reg} ($B10\ CD19^{hi}CD1d^{hi}CD5^{+}$ et T2-MZP) suppriment la prolifération des LT et la production de cytokines pro-inflammatoires ($TNF\alpha$ et $IFN\gamma$) par les Th1 par la production d'IL10 (Evans et al., 2007; Yanaba et al., 2008; Yang et al., 2010). Cependant, le transfert de LB_{reg} après expansion clonale *in vitro* maintien une protection à long terme de plusieurs pathologies auto-immunes dans des modèles animaux. Cela suggère que les LB_{reg} peuvent proliférer davantage *in vivo* ou initier une cascade immunosuppressive efficace avec d'autres cellules immunosuppressives (Mauri, 2010). Cela suggère que d'autres populations cellulaires, d'autres mécanismes de régulation, facteurs solubles ou récepteurs de surface jouent un rôle clé dans la régulation de l'inflammation.

Dans cette partie nous allons voir comment les LB_{reg} peuvent agir sur l'inflammation tant au niveau de la réponse adaptative en jouant, par exemple, sur la balance Th1/Th2, la différenciation des Th17 et l'induction de LT_{reg} (Blair et al., 2009; Carter et al., 2011; Gray et al., 2007; Tedder and Matsushita, 2010), qu'au niveau de la réponse innée en induisant des DC régulateurs et en favorisant l'action des cellules T *natural killer* invariants (iNKT) (Iwata et al., 2011; Moulin et al., 2000).

Contrôle par la sécrétion de molécules solubles

❖ IL10

Comme déjà vu précédemment, la production d'IL10 est caractéristique de l'action des LB_{reg} . Plusieurs études le démontrant ont déjà été citées. Ici nous rappelons que d'autres travaux assoient également ce fait (figure 4).

En 2000, une étude montre dans un modèle murin d'EAE que le traitement par l' $IFN\beta$, utilisé pour traiter les patients atteints de sclérose en plaques, agit sur la balance d'expression entre l'IL10 et l'IL12 par les DC en favorisant la production de l'IL10 *in vitro* et *in vivo*. Cela a un effet bénéfique sur la progression de la pathologie qui est alors inhibée (Tuohy et al., 2000). Ce propos est renforcé cinq ans plus tard par une autre étude conduite sur des souris qui confirme que, dans le SI des nouveaux nés susceptible aux infections, une importante production d'IL10 *in vitro* par les LB après stimulation *via* le TLR9 empêche la production d'IL12 par les DC néonataux et induit une réponse Th2 plus importante qu'*in vivo* sans stimulation (Matsumura et al., 2006; Moore et al., 2001; Moulin et al., 2000; Sun et al., 2005; Tian et al., 2001). Enfin, chez l'Homme sain, il a également été montré que, par la production d'IL10, les LB_{reg} empêchent celle d' $IFN\alpha$ par les pDC (Menon et al., 2016).

En 2008, une équipe montre sur un modèle murin d'EAE déplété pour le gène de *myd88*, ou celui de l'IL10 ou encore celui de certains TLR que l'on peut induire la production d'IL10 par la stimulation de LB *in vitro* avec une combinaison de stimuli impliquant les TLR4 ou TLR9. Cette production supprime la réponse Th1 (Blair et al., 2010; Lemoine et al., 2011) et inhibe la différenciation des Th17 en agissant sur la production d'IL6 et d'IL12 par les DC (Lampropoulou et al., 2008a).

❖ TGFβ

Les LB TGFβ⁺ stimulés *in vitro* avec du LPS peuvent d'une part induire l'apoptose des Th1 pathogéniques par des interactions Fas-FasL et/ou l'inhibition de la présentation antigénique via la sécrétion de TGFβ (Tian et al., 2001) et d'autre part provoquer l'anergie des LT CD8⁺ (Parekh et al., 2003). Dans un modèle murin du diabète, le transfert de LB ainsi stimulés peut inhiber le développement de la pathologie. Ce TGFβ peut être produit par les LB humains normaux ainsi que par les LB CD5⁺ et CD5⁻ des souris NZB auto-immunes.

Au sein même de notre laboratoire, une étude montre, dans un modèle de co-culture *in vitro* de LT et de LB autologues, que les LB activés régulent la prolifération des LT et induit la différenciation des LT_{reg} via la production de TGFβ et IDO. Ces LT_{reg} sont capables en retour de produire du TGFβ et IDO, et, *via* l'expression du récepteur *cytotoxic T-lymphocyte protein 4* (CTLA4), sont également capables d'induire une boucle de d'amplification de la régulation en induisant à leur tour des iB_{reg} producteurs de TGFβ et IDO (Nouël et al., 2015) (figure 4).

❖ IL35

L'IL35 est une cytokine appartenant à la « famille des cytokines IL12 ». Il s'agit d'une protéine dimérique composée des sous-unités IL12α et IL27β. De manière surprenante, cette cytokine semble jouer un rôle double au sein du SI. Elle peut jouer un rôle régulateur puisqu'il a été montré dans un modèle murin d'EAE que l'absence de LB producteurs d'IL35 conduit à une maladie exacerbée et à l'absence de rémission alors que, dans le cadre d'une infection à *Salmonella enterica*, son absence se traduit par un effet protecteur par une résistance vis-à-vis de ce pathogène. Elle peut être produite par les LT_{reg} mais également par les LB suite à une stimulation par le TLR4 et le CD40 (Shen et al., 2014). Son effet régulateur est médié par l'augmentation du nombre de LT_{reg} et une inhibition de la production de Th17. Notons qu'une population de plasmocytes CD138⁺ est responsable de la sécrétion majoritaire d'IL35, démontrant à nouveau le pouvoir régulateur de ces cellules différenciées (figure 4).

❖ IL17

Les LB sont la principale population cellulaire productrice d'IL17 pendant une infection parasitaire à *Trypanosoma cruzi*. Une étude a montré que le transfert de LB sauvages décroît l'inflammation et la mortalité des souris déficientes en LB et infectées avec *T. cruzi*. Les LB déficients en IL17 ne permettent pas d'observer cet effet protecteur (Tosello Boari et al., 2012) (figure 4).

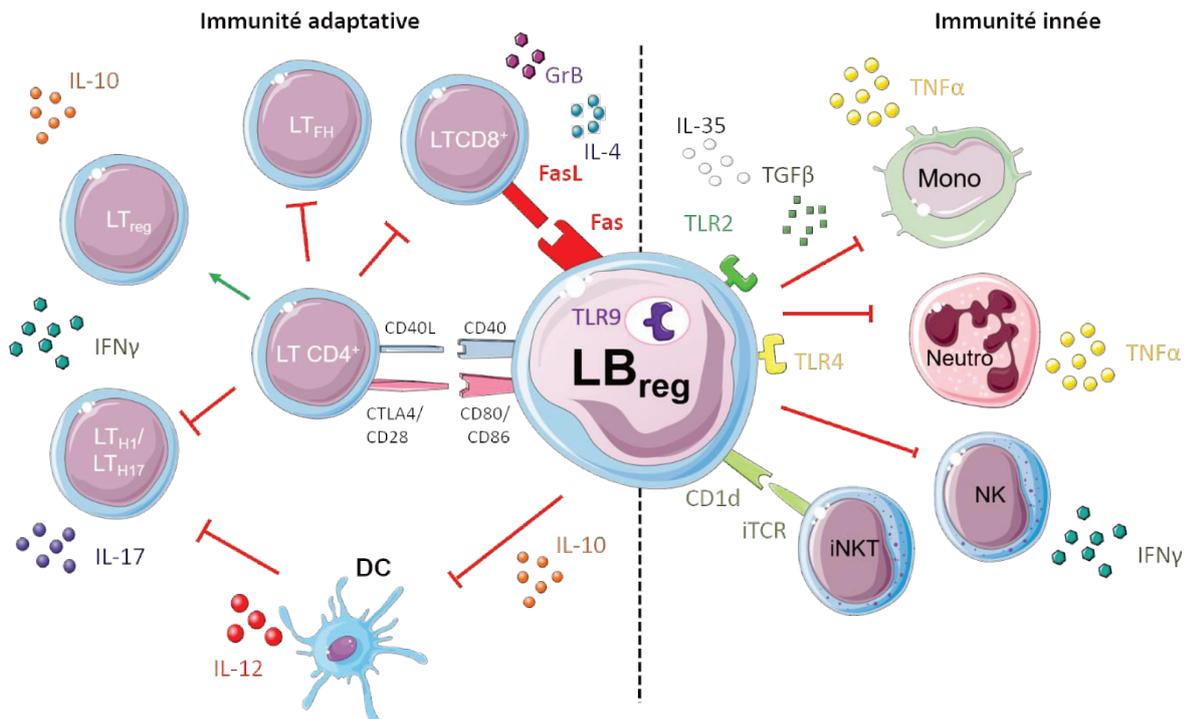


Figure 4 : Les mécanismes de l'action des lymphocytes B régulateurs

Les lymphocytes B régulateurs (LB_{reg}) sont capables de contrôler l'inflammation en agissant tant sur les cellules de l'immunité innée que sur les cellules de l'immunité adaptative. Pour cela, des cytokines telles que l'IL-10, le $TGF\beta$ ou l'IL-35 sont produites. Les LB_{reg} sont également capables d'agir directement par contact cellule-cellule grâce aux molécules CD40, CD1d, CD80/CD86 et Fas. NK = *natural killers cells*, NKT = *natural killer T cells*, $TNF\alpha$ = *tumor necrosis factor alpha*, DC = *dendritic cell*, Th = lymphocyte T helper, LT_{reg} = lymphocyte T régulateur, LT_{FH} = lymphocyte T follicular helper, IL = interleukine, $IFN\gamma$ = interféron gamma, GrB = granzyme B (d'après Rosser et al., 2014). → active -| inhibe

Contrôle par contact cellule-cellule direct ou autocrine

Avec plusieurs exemples, nous avons rapporté ci-dessus l'implication de plusieurs facteurs solubles dans la régulation de l'inflammation produits par les LB. Or, les LB_{reg} peuvent

également agir directement par contact cellulaire. Plusieurs molécules membranaires sont alors impliquées et nous tâcherons de les rapporter ici.

❖ B7H et ICOS

Dans une maladie du système nerveux central, une réduction transitoire du niveau d'ARN messager par les LT a été rapporté chez les souris déficientes en LB et dans les souris où les LB ne sont pas en mesure de sécréter de l'IL10 (O'Connor et al., 2007). Si les conséquences de cette réduction ne sont pas encore connues, il est intéressant de rappeler que des molécules présentes à la surface des LT et des LB permettent leur interaction directe (Dong et al., 2001; Swallow et al., 1999). Ainsi les LB expriment B7H capable d'interagir avec un de ses récepteurs *inducible Tcell costimulator* (ICOS) présent sur les LT activés et régulateurs. Les souris déficientes en molécules ICOS développent une EAE très forte et bloquer l'ICOS pendant la phase d'induction de l'EAE accentue la maladie. Cette interaction est cruciale pour le développement de LT producteurs d'IL10 et pour le fonctionnement optimal de LT_{reg} CD4⁺CD25⁺ (Herman et al., 2004).

❖ CD73 et CD39

En 2014, il a été montré qu'une nouvelle population de LB est capable de réguler le développement de colites de manière indépendante de la production d'IL10 mais dépendante de l'expression de CD39 et CD73 (Kaku et al., 2014). Dans un modèle murin de colites induites par le dextran sulfate sodium, le transfert de cellule LB B1 CD73⁺ producteurs d'adénosine confère une résistance aux souris CD73^{-/-} susceptibles de développer des colites. De plus, après activation, les LB humains augmentent leur expression de CD39 et acquièrent la capacité à inhiber la prolifération des LT CD4⁺ ou CD8⁺ autologues (Saze et al., 2013). Ils montrent que le 5'-AMP et peut-être l'adénosine (ADO) produits par les LB activés sont potentiellement responsables de cette activité inhibitrice. Non seulement ADO supprime la prolifération des LT mais aussi celle des LB. Ces résultats suggèrent un mécanisme immunosuppresseur autocrine médié par la voie CD39/ADO.

❖ CD80-CD86 / CTLA4-CD28

L'expression de CD80 et CD86 par les LB_{reg} est importante dans l'inhibition de la réponse inflammatoire Th1 (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013), grâce à une liaison cellule-cellule par la liaison du CTLA-4 et du CD28. L'expression de ces molécules par les LB est essentielle à la rémission de l'EAE et de colites expérimentales (Mann et al., 2007; Mizoguchi et al., 2000). De plus, dans un modèle d'EAE, l'expression de CD80 et CD86 à la surface de LB est très importante pour le recrutement de LT_{reg} FoxP3⁺ dans la moelle épinière au cours de l'inflammation (Mann et al., 2007). La capacité des LB_{reg} T2-MZP à générer des LT capables de réguler l'inflammation par la production d'IL-10 (LT_{reg} de type 1) *in vitro* repose sur leur interaction via CD80-CD86 et CTLA-4 ou CD28 à la surface des LT, en association avec la production d'IL10 par les LB.

D'autre part, une étude conduite au sein de notre laboratoire a permis de démontrer que l'inhibition de la prolifération des LT n'est pas nécessairement dépendante de l'IL10, mais peut nécessiter un contact cellulaire notamment *via* l'interaction entre CD80-CD86 des LB et CD28 des LT (Lemoine et al., 2011).

❖ CD1d

Le CD1d est une glycoprotéine transmembranaire également appelés CMH non classique et capable de présenter des antigènes. L'étude de son implication dans l'induction des LB_{reg} est marginale mais quelques travaux ont mis en avant son intérêt. En effet, il a été montré que le transfert de cellules de la rate enrichies en LB T2 et LB_{ZM} améliore l'AIC et les colites ulcéraives. Or, le CD1d est un marqueur trouvé à la surface des LB T2 et des LB_{ZM} (Amano et al., 1998; Loder et al., 1999).

Bialecki *et al.* montrent en 2009 qu'après une stimulation par les TLR, les LB_{ZM} CD1d^{hi} prolifèrent, mûrissent et parviennent à activer indirectement les iNKT, une population de cellules au potentiel immunorégulateur, en présence de DC, grâce à la présentation de l'antigène lipidique α -galactosylceramide (α -GalCer) par le CD1d. Cela est confirmé par une délétion des LB où l'activation des iNKT est bien moindre (Bialecki et al., 2009; Sonoda and Stein-Streilein, 2002).

D'autre part, il est intéressant de noter que dans un modèle murin d'EAE où le gène codant pour le CD1d est déplété (CD1d^{-/-}) que la pathologie est exacerbée, avec un nombre diminué de NKT dans le sang périphérique. On notera d'autre part que chez les souris

déficientes en LB, une augmentation du pourcentage de NK GrB⁺ est observée, suggérant ainsi que les LB_{reg} peuvent supprimer la fonction cytotoxique des cellules NK (Bankoti et al., 2012).

En 2012, le rôle de présentation des antigènes lipidiques par les LB_{reg} transitionnels CD24⁺CD38⁺IL10⁺CD1d^{hi} dans le maintien du nombre et de la fonction des iNKT est rappelé (Bosma et al., 2012). Chez des patients atteints de LES, un défaut intrinsèque du recyclage et de l'expression du CD1d conduit à un défaut de la présentation antigénique de lipide par les LB, et en conséquence à un défaut de maintien des iNKT. Or, le nombre et la fonction des iNKT reviennent à la normale chez les patients répondeurs au rituximab, un Ac monoclonal chimérique anti-CD20 responsable d'une déplétion en LB, après la repopulation par des LB immatures qui expriment normalement le CD1d.

Enfin, Mizoguchi *et al.* ont démontré que les souris KO pour la chaîne α du récepteur des cellules T (TCR α ^{-/-}) et celle de l'IL10 (IL10^{-/-}) développent spontanément une inflammation intestinale chronique. Or il a été observé à la surface des LB issus des ganglions lymphatiques mésentériques de l'intestin des souris IL10^{-/-} une expression fortement diminuée de la glycoprotéine CD1d par rapport à leur homologue TCR^{-/-} (Mizoguchi et al., 2002).

❖ Les marqueurs de mort : *Programmed death 1 (PD1) -Programmed death-ligand 1(PDL1)* et Fas - FasL

Les LB PD-L1⁺ jouent un rôle suppresseur de l'inflammation par interaction avec PD-1 en induisant la conduction de signaux inhibiteurs dans les LT CD8⁺ PD-1⁺ effecteurs, inhibant ainsi leur prolifération et leur fonctions effectrices, dans un cas d'infection à *Salmonella sp* (Lopez-Medina et al., 2015) et dans un cas de cancer (Shalapour et al., 2015). D'autres études appuient ce propos et montrent que la régulation de la réponse immunitaire par les LB peut passer par la promotion de l'apoptose par FasL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) et PD-L1 et PD-L2 (Alderson and Lynch, 1998; Anel et al., 2007; Lundy, 2009; Sharpe et al., 2007).

TLR, IMMUNITE INNEE & ADAPTATIVE

Le SI des vertébrés est composé de deux pendants complémentaires : le système inné et le système adaptatif. Ils collaborent pour mettre en place à court et long terme une réponse la plus efficace possible contre l'invasion microbienne. Dans la première partie de l'introduction de cette thèse, nous avons abordé le fonctionnement du SI adaptatif à travers la participation des LB, notamment par la régulation de l'inflammation. Dans cette partie, nous allons voir comment l'immunité innée, commune à tous les animaux, participe à l'initiation et à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative (Pasare and Medzhitov, 2005).

LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE

Le SI inné consiste en un ensemble de défenses contre les infections dont les barrières physiques (peau, membranes des muqueuses, etc) et chimiques (acidité des composants de l'estomac et molécules anti-microbiennes) en sont les premières. Il est activé immédiatement après l'invasion par un organisme pathogène. La composante cellulaire du SI comprend des cellules dotées de récepteurs capables de reconnaître directement une série limitée de produits microbiens aux motifs moléculaires conservés et uniques à la fois. A la reconnaissance de leurs cibles, ces récepteurs déclenchent une réponse rapide et relativement spécifique contre les pathogènes cibles.

Parmi ces récepteurs de l'immunité innée, nous retrouvons les familles suivantes : les récepteurs du complément, les lectines de type C et les lectines liant le mannose (*Mannose binding lectins* – MBL), les protéines C-réactives (*C reactiv proteins* - CRP), les récepteurs scavengers (SR), les récepteurs *nucleotide oligomerization domain* et les récepteurs TLR. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs TLR, et au TLR9 plus précisément.

PRR	Localisation	Ligands	Source des ligands
TLR <i>Toll-like receptors</i>	Membranes plasmique ou endosomale	Lipoprotéines, ADN, ARN, endotoxine, signaux endogènes de danger	Bactéries, virus, parasites, autoantigènes
NLR <i>NOD-like receptors</i>	Cytoplasme	Signaux de danger endogènes, dipeptides muramyl	Autoantigènes, bactéries
CLR <i>C-type lectin receptors</i>	Membrane plasmique	Bêta-glucans	Champignons
RLR <i>Retinoic acid-inducible gene-1 like receptors</i>	Cytoplasme	ARN double-brin	ARN viral

Tableau 3 : Propriétés des Pattern Recognition Receptors (PRR)

(d'après medecineflammarion.com)

LES TOLL-LIKE RECEPTORS

Generalites sur les TLR

Histoire de la découverte des TLR

L'histoire de la découverte des TLR démarre dans les années 1980s où trois études capitales ont permis d'en comprendre la fonction et l'importance pour l'immunité innée (O'Neill et al., 2013) (figure 5).

En 1996, Jules Hoffman et Bruno Lemaitre étudient la protéine Toll. Il s'agit d'un récepteur de signalisation transmembranaire impliqué dans l'apparition de l'axe dorso-ventral au cours du développement de la drosophile. Ils observent que des mutations dans cette protéine rendent les mouches très sensibles à des infections létales par *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996).

La seconde découverte a été réalisée par Charles Janeway et Ruslan Medzhitov en 1997 (Medzhitov et al., 1997). Ils découvrent une protéine humaine au domaine cytoplasmique homologue à celui de la protéine Toll et à celui du récepteur humain à IL-1. Ils appellent cette protéine *Toll-Like Receptor 4* ou TLR4. Ce TLR4 induit une signalisation par la voie NFκB et

la transcription de gènes nécessaires à l'activation des LT naïfs (*il1*, *il6* et *il8* et *B7.1*). Cette découverte a permis de mettre en évidence le rôle clé joué par les TLR dans l'induction et l'orientation de réponses immunitaires adaptatives.

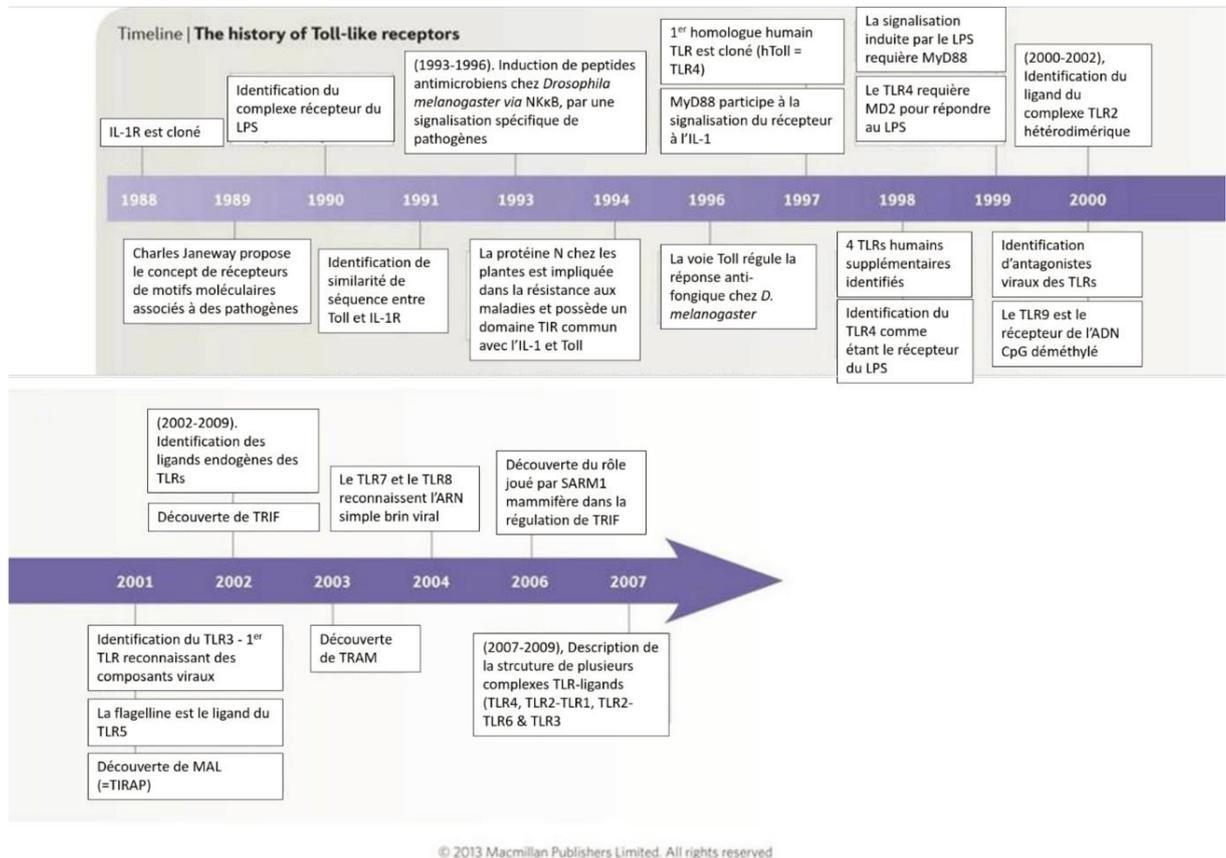


Figure 5 : Historique de la découverte des TLR

(d'après O'Neill et al., 2013)

La dernière découverte remonte à 1998. L'équipe de Bruce Beutler qui apporte la preuve que le TLR4 est un élément essentiel à la reconnaissance du LPS. Il utilise une souche de souris C3H/HeJ et C57BL/10ScCr portant une mutation faux-sens (proline > histidine) dans l'exon 3 à la position 712 sur un locus du gène *lps*, codant pour une protéine proche du TLR4. Par clonage positionnel, il identifie le locus responsable de l'hyposensibilité au LPS de ces souris. La mutation perte de fonction de ce locus abolit la signalisation par le TLR4 qui rend les animaux résistants au lipopolysaccharide (LPS) accumulé au cours d'infection. Bruce Beutler

confirme alors l'importance des TLR dans le développement des réactions immunes (Beutler, 2002; Poltorak et al., 1998).

Structure, fonction et activation des TLR

Par recherche d'homologie avec la protéine Toll rencontrée chez la drosophile, 10 membres de la famille des récepteurs *Toll-like* ont été identifiés chez l'Homme. Il s'agit de protéines transmembranaires de type 1 formées d'une région extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire *Toll/Il-1 receptor* (TIR).

La région extracellulaire des TLR est le lieu de reconnaissance des ligands. Elle est composée de plusieurs séquences de 24 à 29 acides aminés riches en leucine appelées *leucine rich repeat* (LRR) et sa longueur varie pour chaque TLR. Elle est suivie d'une partie transmembranaire et d'un domaine intra-cytoplasmique. Ce dernier domaine est hautement conservé dans l'évolution depuis la drosophile jusqu'à l'Homme, et est également retrouvé chez les plantes qui possèdent un gène de résistance à l'infection par la mosaïque du tabac (gène R) (Whitham et al., 1994). De par son homologie avec le domaine intra-cytoplasmique de la famille des récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R), il a été baptisé TIR. C'est un domaine long de 150 acides aminés environ qui permet la conduction du signal grâce à son interaction avec plusieurs protéines cytoplasmiques.

Chacun des TLR est spécifique d'un répertoire de ligands appelé « motif moléculaire associé à des pathogènes » (PAMP). Afin d'identifier les ligands capables d'activer les TLR, des modèles murins ont été utilisés déficients pour chacun des TLR ont été générés. Les principaux ligands identifiés sont présentés sur la figure ci-dessous (Akira, 2003) (figure 6).

Les TLR sont capables de reconnaître des PAMP multiples dont des sucres, des protéines et des acides nucléiques. Le TLR2 est spécifique des lipoprotéines et acides lipoteichoïques bactériens, le TLR3 reconnaît de l'ARN double brin, le TLR4 reconnaît spécifiquement les lipopolysaccharides (LPS), le TLR5 reconnaît la flagelline, le TLR7 détecte l'ARN viral simple brin et enfin, le TLR9 reconnaît spécifiquement les répétitions du dinucléotide CpG non méthylés souvent d'origine bactérienne ou chez certains virus (figure 6).

Les ligands des TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont des produits typiquement bactériens faciles à distinguer des éléments chimiques créés par l'hôte. En revanche, les TLR3, 7, 8 et 9, localisés dans des compartiments intracellulaires, sont spécialisés dans la détection de structures chimiques non uniques au monde microbien et sont potentiellement capables d'induire une réponse contre l'acide désoxyribonucléique (ADN) de l'hôte (Gay et al., 2014). En effet, dans

certaines conditions anormales, un défaut d'élimination des corps apoptotiques peut être à l'origine de l'endocytose des acides nucléiques de l'hôte retrouvés dans un complexe ADN/acide ribonucléique (ARN) -protéines. La rencontre dans les endosomes de ces ligands avec des TLR peut alors conduire à une rupture de la tolérance et à l'auto-immunité (Chan et al., 2015; Pawaria et al., 2015). L'importance de l'internalisation du CpG a été démontrée dans une étude où les auteurs ont associé physiquement le CpG-ODN à une bille, ce qui conduisait à l'inhibition de la réponse par le LB (Manzel and Macfarlane, 1999).

Certains TLR se dimérisent afin d'étendre le spectre des cibles reconnues. L'hétérodimère TLR1-TLR2 peut reconnaître des lipopeptides triacylés alors que la reconnaissance de lipopeptides diacylés nécessite le couple TLR2-TLR6. Il existe aussi des associations de TLR en homodimères (ex : le TLR9 dans les endosomes) qui requiert la participation de molécules accessoires pour permettre une signalisation optimale. Ainsi, le TLR4 s'associe avec le facteur MD2 pour atteindre la membrane plasmique et interagir avec le LPS. Son corécepteur CD14 est lui aussi associé au complexe de reconnaissance du LPS. Il existe également des polymorphismes dans les gènes codant pour certains TLR qui produisent des récepteurs peu ou non actifs et parfois associés à une sensibilité accrue de différents types d'agents infectieux (figure 6).

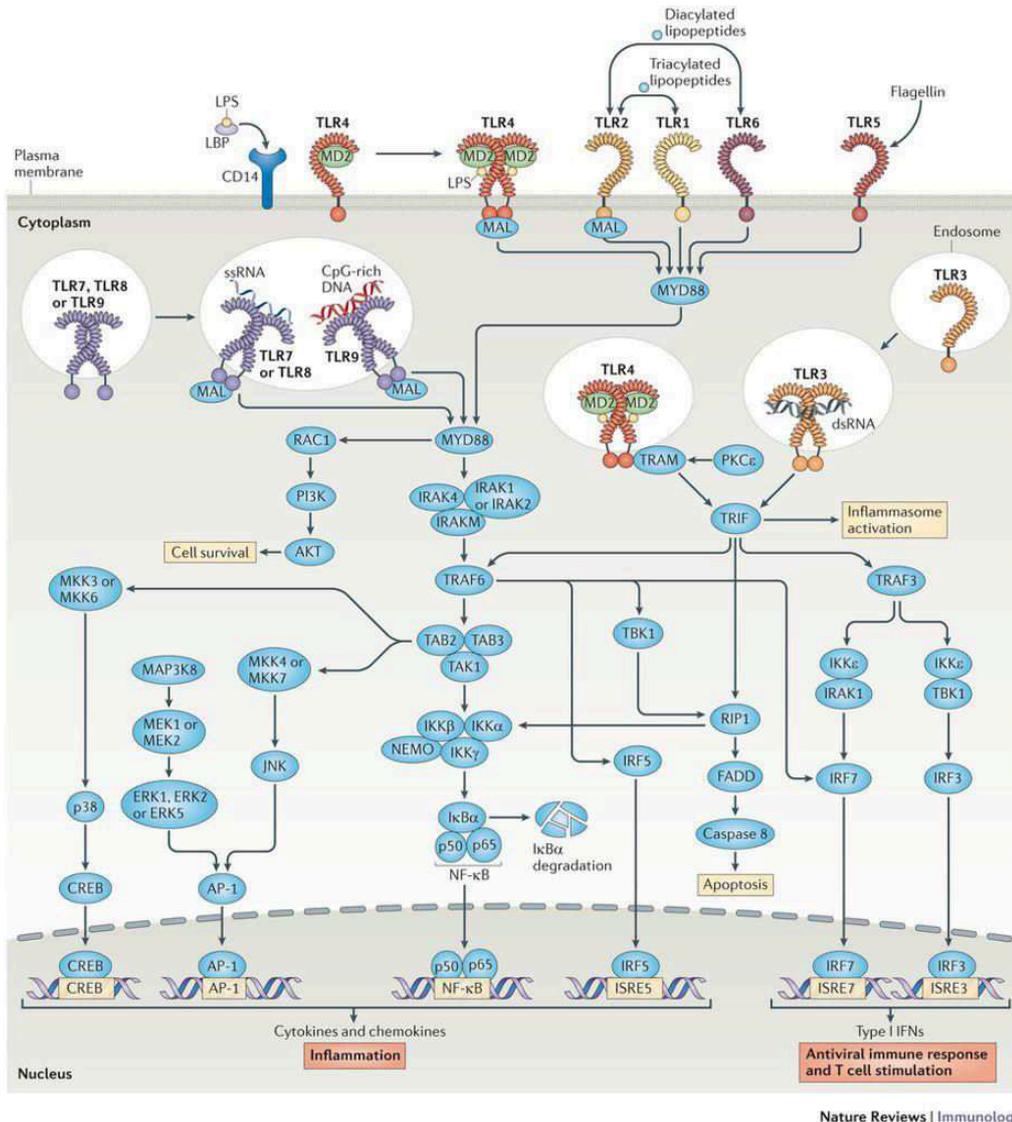


Figure 6 : Aperçu des voies de signalisation et ligands des TLR

Les TLR sont localisés à la surface des cellules et dans les endosomes. Après stimulation, ils induisent deux voies de signalisation qui impliquent la protéine MYD88 ou la protéine TRIF. La signalisation croisée avec d'autres voies permet la régulation de la signalisation en aval des TLR et conduit soit à l'apoptose, soit à la survie cellulaire et à la transcription de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines, et d'IFN de type I.

AP-1, activator protein 1; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; dsDNA, double-stranded DNA; dsRNA, double-stranded RNA; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FADD, FAS-associated death domain; IκBα, inhibitor of NF-κBα; IKK, inhibitor of NF-κB kinase; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, IFN-regulatory factor; ISRE, IFN-stimulated response element; JNK, JUN N-terminal kinase; LBP, LPS-binding protein; LPS, lipopolysaccharide; MAL, MYD88 adaptor-like protein; MAP3K, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8; MD2, myeloid differentiation factor 2; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; MKK, mitogen-activated protein kinase kinase; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nuclear factor-κB; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKCε, protein kinase Cε; RIP1, receptor-interacting protein 1; ssRNA, single-stranded RNA; TAB, TAK1-binding protein; TAK1, TGFβ-activated kinase 1 (= MAP3K7); TBK1, TANK-binding kinase 1; TRAF, tumour necrosis factor receptor-associated factor; TRAM, TRIF-related adaptor molecule (d'après Gay et al., 2014).

Rôle des TLR dans la migration cellulaire

Un des traits caractéristiques du SI est la capacité des cellules qui en font partie à migrer pour surveiller, attaquer, contenir et éliminer les pathogènes envahissants. Il existe deux types de migration cellulaire : inductible et innée.

La migration innée a déjà été abordée dans la première partie de cette introduction. Elle consiste en la migration des lymphocytes naïfs entre les organes lymphoïdes secondaires *via* le sang et la lymphe dans le but de rencontrer des pathogènes, de mûrir et de se préparer ainsi à initier des réponses. Ce processus de migration ne requiert pas la participation des TLR.

La migration cellulaire inductible a quant à elle la fonction de conduire les cellules immunitaires vers le site d'infection pour augmenter la réponse contre les pathogènes infectants. Cette migration cellulaire implique une séquence très contrôlée d'événements médiés par les facteurs chimiotactiques et les molécules d'adhésion de surface. L'activation par les TLR permet l'expression de sélectines, de chimiokines et de récepteurs aux chimiokines qui régulent cette migration cellulaire aux sites de l'inflammation (Huang et al., 2001).

Dans cette partie, nous verrons comment les TLR participent à la migration cellulaire inductible. La reconnaissance directe par les TLR de leur ligand ou, indirectement, la détection d'un produit de leur activation par les macrophages résidents au site de l'infection (par exemple le $TNF\alpha$), permet d'induire la migration des cellules immunitaires au site d'infection. Les TLR permettent la production de chimiokines (IL8, *growth-related oncogene- α* (GRO- α), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, *macrophage inflammatory protein 1 α* (MIP-1 α), MIP-1 β et *regulation on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES)) qui se lient à l'endothélium vasculaire et déclenche des changements conformationnels des intégrines à la surface des leucocytes. L'endothélium vasculaire exprime de son côté les ligands de ces intégrines suite à une stimulation directe ou indirecte par les TLR. Cette expression est due, soit à une stimulation directe par les TLR, soit grâce à une stimulation indirecte. Cela permet une adhésion ferme de ces leucocytes à l'endothélium vasculaire.

Rôle des TLR dans l'activation des cellules de l'immunité innée

Une inflammation chronique nécessite la participation de plusieurs types cellulaires dont des cellules de l'immunité innée telles que les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les cellules NK ainsi qu'à des cellules dendritiques, mastocytes et macrophages résidents des tissus infectés. Les neutrophiles et les cellules NK sont essentiels

puisque'ils permettent la mort directe des pathogènes et des cellules infectées respectivement. Les TLR sont exprimés par les cellules de l'immunité innée mais aussi par les cellules de l'immunité acquise. Ils sont impliqués dans de nombreux processus de la réponse inflammatoire.

Activation des leucocytes de l'immunité innée

Par le passé, des études ont tenté de suivre l'expression des TLR par les leucocytes innés mais plusieurs éléments ont rendu difficile l'obtention de conclusions sûres :

- les contradictions entre l'expression des ARN messagers et la capacité des cellules à répondre aux agonistes de TLR
- le manque d'Ac fiables pour les TLR
- les différences d'expression entre espèces
- la régulation positive ou négative de l'expression de certains TLR dans différents types cellulaires

Cependant, les résultats de l'expression de l'ARN messager des TLR a quand même permis d'obtenir quelques informations intéressantes. Chez l'Homme, les neutrophiles expriment les ARN messagers des TLR1 à TLR10, sauf le TLR3, et répondent au LPS (agoniste du TLR4), zymosan (agoniste synthétique du TLR2) et R848 (agoniste du TLR7). En revanche, ils ne répondent pas à une stimulation par le CpG du TLR9 (Neufert et al., 2001). De la même manière, les cellules NK expriment l'ARN messager du TLR9 mais ne répondent pas à sa stimulation par le CpG (Hornung et al., 2002). Malgré leur expression constitutive d'ARN messagers TLR1, 4, 7, 9 et 10, les éosinophiles ne répondent qu'à la stimulation par le R848 *via* le TLR7, permettant ainsi leur activation et leur survie prolongée. Les mastocytes expriment les TLR1, 2, 4 et 6 et répondent aux agonistes des TLR2 et TLR4. Les monocytes expriment une quantité de TLR qui induit leur activation. Une fois activés, les monocytes peuvent se différencier en macrophages ou DC et contribuer au développement d'une réponse adaptative dans les tissus inflammés.

La signalisation par les TLR ne permet pas uniquement de réguler l'émission de chimiokines et de leurs récepteurs, mais ils contrôlent également l'expression de ces récepteurs aux chimiokines à la surface des cellules stromales en inhibant la désensibilisation de ces récepteurs. Ainsi, les neutrophiles activés par le TLR4 inhibent l'expression des kinases couplées aux protéines G, ce qui permet à ces cellules de continuer à répondre aux chimiokines plus longtemps.

Activation des cellules dendritiques

Les DC sont à la charnière entre le SI inné, et le SI adaptatif. Ces cellules présentatrices d'antigènes sont notamment nécessaires à l'activation et à la différenciation des LTh1, des LTh2 et des LT cytotoxiques (LTc) et expriment de nombreux types de *Pattern Recognition Receptor* (PRR), y compris des lectines de type C, des récepteurs au mannose et des TLR.

Activées après la capture d'antigènes, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques les plus proches pour présenter les peptides antigéniques aux LT naïfs *via* le CMH-II. Pour réaliser cette présentation, plusieurs processus doivent avoir lieu et sont influencés par une stimulation *via* les TLR. Il est nécessaire de phagocyter le pathogène, d'augmenter l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation (CD80, CD86), ainsi que de sécréter des cytokines et des chimiokines.

La stimulation des DC immatures *via* des ligands de TLR conduit à l'inhibition de CCR6 et à l'augmentation de l'expression de CCR7 (Sallusto et al., 1998). Cela améliore la capacité des DC à migrer des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques. Ils sont dépendants de l'environnement et de la reconnaissance d'un PAMP par un PRR. Certaines réponses conduites par les TLR sont particulièrement importantes à l'établissement de réponses Th1 (Schnare et al., 2001) et cytotoxiques (Palliser et al., 2004).

Des sous-groupes de DC naturellement répartis dans différentes niches anatomiques sont capables de répondre à certains types de pathogènes grâce à l'expression de différents TLR. Chez la souris, toutes les DC de la rate expriment les TLR1, 2, 4, 6, 8 et 9 (Edwards et al., 2003) mais leurs pDC n'expriment pas le TLR3, comme leurs DC CD8 α^+ n'expriment pas le TLR5 ou le TLR7. Il est intéressant de noter que les pDC semblent spécialisées dans la détection des infections virales parce qu'elles induisent une réponse très efficace après stimulation *via* le TLR9 et le TLR7. D'autres différences existent dans la capacité de réponse de certaines DC fraîchement isolées après stimulation *via* les TLR. Les DC de la rate fraîchement isolées expriment le TLR4 mais ne sont pas capables de répondre à une stimulation par le LPS, seuls les monocytes et les DC différenciés *in vitro* le peuvent. A l'instar des macrophages murins, les DC CD11c $^+$ CD11b $^+$ différenciés à partir des précurseurs de la moelle osseuse en présence de *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) ont quant à eux une haute expression du TLR4 et répondent fortement au LPS (Boonstra et al., 2003).

Activation des cellules stromales

Comme évoqué précédemment, l'épithélium constitue une première ligne de défense du SI inné. Une forte expression de TLR dans les cellules de l'épithélium de l'intestin en découle, ainsi que dans les tractus respiratoire et urogénital. La reconnaissance de pathogènes par ces cellules *via* les TLR conduit à la production de cytokines, de peptides anti-microbiens et de chimiokines, ce qui influence la migration cellulaire comme vu précédemment. Une étude publiée en 2003 utilise un modèle de choc septique pour démontrer que la stimulation par le TLR4 sur les cellules stromales est à l'origine d'une rapide concentration de neutrophiles dans les poumons (Andonegui et al., 2003).

Rôle des TLR dans l'activation des cellules de l'immunité adaptative

Grâce à une étude publiée en 2001, il a été montré que l'immunité innée et l'immunité acquise sont intimement liées. Dans cet article utilisant un modèle murin *myd88*^{-/-} stimulé par l'injection d'un Ag, Schnare *et al.* mettent en évidence un défaut de la réponse Th1 mais pas de la réponse Th2. Cela suggère que les voies de signalisation par les TLR sont nécessaires à l'induction et l'orientation de réponses adaptatives à l'antigène injecté dans les souris (Schnare et al., 2001). D'autres études ont affiné cette hypothèse en précisant que, dans un modèle de co-stimulation, la quantité de PAMP utilisée pour déclencher l'immunité innée en parallèle à l'exposition à l'antigène joue un rôle dans l'orientation entre réponse Th1 ou Th2. En effet, une étude consacrée à l'asthme allergique caractérisé par une réponse Th2 montre que lorsque la dose de LPS inhalée est faible, la réponse induite est préférentiellement de type Th2 alors qu'une forte exposition au LPS conduit à l'induction d'une réponse Th1. Dans une autre étude, il a été remarqué que la voie des TLR permet une réponse adaptative à l'infection en induisant la production d'IL6 et l'inhibition de l'action régulatrice par les LT_{reg}.

Contrôle de l'activation des LT par les DC stimulés via les TLR

Une fois dans les ganglions lymphatiques, les DC activées migrent dans les zones T et cherchent un LT spécifique de leur Ag pour induire son activation et sa différenciation en cellule effectrice. Les TLR sont nécessaires à l'activation et à la maturation des DC, qui vont exprimer les molécules de CMH et les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) nécessaires pour réaliser la présentation antigénique ainsi que l'activation des LT (Medzhitov, 2001). En fonction de la quantité de peptide présenté, des types de molécules de co-stimulation exprimées et des molécules sécrétées par les DC, les LT CD4⁺ naïfs se différencieront préférentiellement

en LTh1 ou en LTh2. La première activation des LT CD8⁺ requiert les mêmes signaux de la part des DC, alors que l'établissement d'une réponse par les LT mémoires CD8⁺ nécessite l'aide des LT CD4⁺.

Une population donnée de DC ne peut répondre qu'à un type de pathogène donné en fonction des TLR qu'elle exprime et, inversement, la stimulation par un ligand de TLR donné va donner des réponses différentes en fonction de la DC qui l'exprime (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Par exemple, la stimulation de pDC humains et de DC myéloïdes (mDC) avec un ligand synthétique du TLR7 ou certains oligonucléotides synthétiques contenant des motifs CpG induisent la sécrétion d'IFN α et d'IL12 respectivement (Ito et al., 2002) (figure 7).

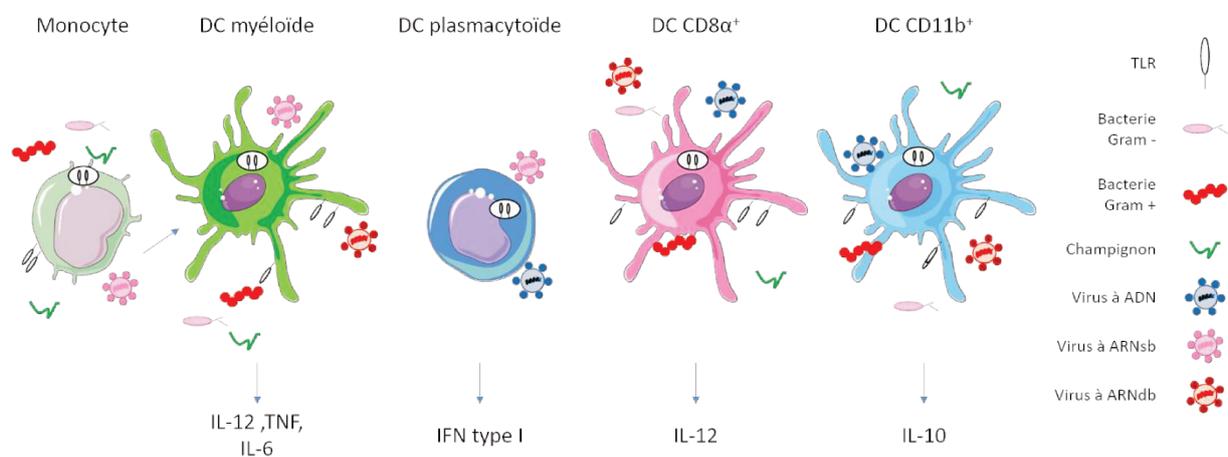


Figure 7 : Les populations de DC expriment différents TLRs

Les DC du sang périphérique et les monocytes expriment différents TLR à leur surface et dans le compartiment endolysosomal. Cela leur permet de reconnaître les bactéries, les champignons et les virus présents dans l'environnement. En réponse, ils sécrètent des cytokines proinflammatoires et des interférons de type I (d'après Iwasaki & Medzhitov, 2004).

La sécrétion d'IL12 est capable d'influencer la différenciation des LT CD4⁺ activés vers un profil LTh1 (Trinchieri, 2003). Cela a été confirmé par une étude conduite chez la souris. Si la souris sauvage, stimulée par une forte quantité d'adjuvant de Freund et de ligands de TLR (LPS, CpG) produit une réponse Th1, les souris déplétées pour le gène de *myd88* en aval de la signalisation par les TLR induit une réponse Th2 (Kaisho et al., 2002), ce qui permet de

conclure que l'activation des DC *via* les TLR avec une forte dose de ligand permet de favoriser le développement d'une réponse Th1. Il est intéressant de noter que si une forte activation des DC par du LPS en grande quantité induit une réponse Th1, une faible quantité induira préférentiellement une réponse Th2 comme en cas d'asthme (Eisenbarth et al., 2002). L'activation des DC *via* les TLR leur permet également d'influer sur la balance entre inflammation et régulation. En effet, après stimulation par les TLR, les DC produisent de l'IL6, cytokine pro-inflammatoire qui va bloquer la régulation des LT effecteurs par les LT_{reg} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Pasare and Medzhitov, 2003). Cette suppression de la fonction régulatrice médiée par les DC est également observable *in vivo*, et les autres modes d'activation des DC ne produisent pas d'effet équivalent (Yang et al., 2004).

Contrôle de la production d'interférons par les TLR

Une étude publiée en 1999 montre qu'une stimulation *via* les ligands de TLR poly(D)poly(C), LPS, CpG et Imiquimod résulte en une forte production d'IFN- β et d'IFN- α par plusieurs types cellulaires (Tough et al., 1999). Après une infection virale, ces interférons sécrétés induisent une boucle de rétrocontrôle positif en se liant à leurs récepteurs IFN- α/β R et induisent l'expression de plus de gènes de la famille de l'IFN- α , alors qu'une stimulation type bactérienne avec du LPS conduit à une sécrétion principale d'IFN β sans induction d'IFN α . Il est intéressant de noter que les TLR ont une spécificité dans l'induction de certains IFN. Si les TLR3, 4, 7 et 9 peuvent tous induire les IFN- α/β , mais *via* des voies de signalisation différentes, les TLR1, 2, 5 et 6 ne le peuvent pas.

Originellement associées à la défense antivirale, ces cytokines ont d'autres effets dans le développement de l'immunité adaptative. Les TLR exercent donc encore une fois une influence sur l'immunité adaptative par l'intermédiaire des interférons. Les IFN de type I peuvent activer directement STAT4 et induire la production d'IFN γ par les LT CD8⁺ chez la souris (Nguyen et al., 2002) et les LT CD4⁺ chez l'Homme (Rogge et al., 1998). De plus, la *cross-presentation* des antigènes viraux a lieu grâce à un mécanisme dépendant des interférons de type I, indépendant de l'aide des LT CD4⁺ mais dépendant de l'interaction avec des DC stimulés (Le Bon et al., 2003). Les IFN α/β permettent aussi aux LB de réaliser leur commutation isotypique et leur différenciation en plasmocytes *via* l'activation des DC (Le Bon et al., 2001). Ils sont indispensables également à l'activation des cellules NK (Biron et al., 1999).

Contrôle de l'activation des LB et de leur production d'Ac par les TLR

Les LB ont la particularité d'être en mesure d'exprimer un BCR, récepteur à l'antigène conçu à partir de réarrangements génétiques des gènes d'immunoglobulines qui le rendent unique et spécifique d'un antigène donné. Ils expriment en même temps des PRR, et principalement des TLR qui lui permettent d'être réceptif à plusieurs autres molécules associées à des pathogènes. Les LB humains expriment en effet les TLR1, 6, 7, 9 et 10 et le TLR2 à un plus faible niveau. (Bourke et al., 2003). Comme évoqué plus haut, les LB humains diffèrent des LB murins qui expriment le TLR4 et peuvent donc être stimulés par le LPS.

Une stimulation des LB *via* les TLR conduit à une activation polyclonale ainsi qu'à la production d'Ac IgM de faible affinité. Les LB B1 de la cavité péritonéale et les LB_{ZM} sont particulièrement sensibles aux ligands de TLR et participent à une réponse rapide en produisant des Ac de manière LT indépendante, souvent dirigés contre des composants bactériens tels que la phosphatidylcholine (Martin and Kearney, 2002). Une étude publiée récemment a montré que la signalisation par le TLR9 est capable de bloquer la capacité des LB à capturer, apprêter et présenter les Ag pour lesquels ils sont spécifiques. Cela aboutit à une inhibition de l'activation des LTh *in vitro*. Ils montrent enfin dans un modèle murin *in vivo* et dans un essai clinique chez l'Homme que le CpG-ODN potentialise la réponse Ac à une protéine vaccinale mais ne permet pas la maturation d'affinité. La signalisation par le TLR9 est donc en mesure d'augmenter le titre en Ac mais non les événements typiquement réalisés par les LB dans les OLS (Akkaya et al., 2018).

Comme vu précédemment, dans des cas exceptionnels, les LB peuvent produire des Ac auto-réactifs après reconnaissance d'ADN endogène (Green and Marshak-Rothstein, 2011; Marshak-Rothstein, 2006) mais il existe des mécanismes qui permettent d'inhiber cette production. Un de ces mécanismes est l'envoi d'un signal tolérogénique par les LB autoréactifs *via* les TLR qui inhibe leur activation (Rui et al., 2003). Un modèle de souris Nba2 Yaa (locus *Y chromosome-linked autoimmune accelerating*) enclin à développer une autoimmunité et *Tlr9*^{-/-} a permis de démontrer que le TLR7 induit une pathologie autoimmune de manière accélérée et la survie des souris en était compromise. En effet, ces souris surexpriment des ARN messagers du TLR7 qui produit une meilleure réponse au ligand du TLR7 par rapport aux LB *Tlr9*^{+/+} provenant de la même souche (Santiago-Raber et al., 2010). D'autres études ont montré que la délétion du gène du TLR7 a un effet bénéfique sur la pathologie, réduisant l'inflammation et la sévérité de la pathologie (Christensen et al., 2006; Nickerson et al., 2010). De son côté, une délétion en TLR9 a un rôle contraire sur l'inflammation. Elle induit en effet

une augmentation de l'activation de l'inflammation et de la mortalité (Bossaller et al., 2016; Gies et al., 2018; Wu and Peng, 2006; Yu et al., 2006).

Les LB mémoires humains stimulés *via* les TLR7 et TLR9 sont plus répondeurs que les LB naïfs et produisent des Ac après une stimulation par le CpG (Bernasconi et al., 2002). Il semble donc que la stimulation par les TLR permette d'induire une réponse rapide par les LB ainsi que la tolérance du soi.

LE TLR9 HUMAIN ET LYMPHOCYTE B

Structure et ligand

Le 9^{ème} membre de la famille des TLR (ou CD289) est principalement exprimé par les cellules du SI, et en particulier par les LB (Bourke et al., 2003) et pDC chez l'Homme (Hornung et al., 2002). Sa séquence ADN, sur le chromosome 3 chez l'Homme, est long de 5,08kb et possède deux exons. Certains polymorphismes (*single nucleotide* polymorphism, SNP) ont été découverts mais malheureusement, leur impact sur la structure et la fonction du TLR9 n'ont pas été étudié systématiquement. Chez l'Homme, il existe 5 isoformes du TLR9 issus d'un épissage alternatif des transcrits du gène. Ils sont appelés TLR9-A, TLR9-B, TLR9-C, TLR9-D et TLR9-E. Quelques légères variations de taille les distinguent les uns des autres, mais une région de 975 acides aminés leur est commune. L'expression de ces différentes isoformes varie en fonction du type cellulaire, de leur état de maturation ou encore du degré d'inflammation systémique. Le TLR9-A est la forme la plus décrite et c'est de cette forme dont nous allons traiter dans ce travail (figure 8).

Le TLR9 est une protéine transmembranaire de type I longue de 1032 acides aminés et de localisation intracellulaire. La structure tri-dimensionnelle de la partie C-terminale de son homologue murin a été obtenue par cristallographie (Ohto et al., 2015; Park et al., 2008). Ses domaines LRR se regroupent sous forme de fer à cheval et une boucle Z (*Z-loop*) se trouve au milieu de l'ectodomaine (entre les séquences LRR 14 et 15) (figure 8).

De par la littérature, on sait que le TLR9 interagit avec son ligand, le CpG-ODN, au niveau de sa partie extracellulaire au niveau des séquences d'a.a 7-51 ; a.a 72-77 ; a.a 95-109 ; a.a 132 ; a.a 179-181 ; a.a 208. Elle a un domaine transmembranaire correspondant aux acides aminés 819-839. Son domaine TIR est limité par les acides aminés 868 et 1016. Enfin son domaine cytoplasmique correspond aux acides aminés a.a 840-1032. La protéine a 8 ponts disulfures qui

lui confèrent sa structure tridimensionnelle. Elle peut enfin être glycosylée par des N-glycosylations qui touchent les sites suivants : 64 ; 129 ; 200 ; 210 ; 242 ; 300 ; 340 ; 469 ; 513 ; 567 ; 694 ; 731.

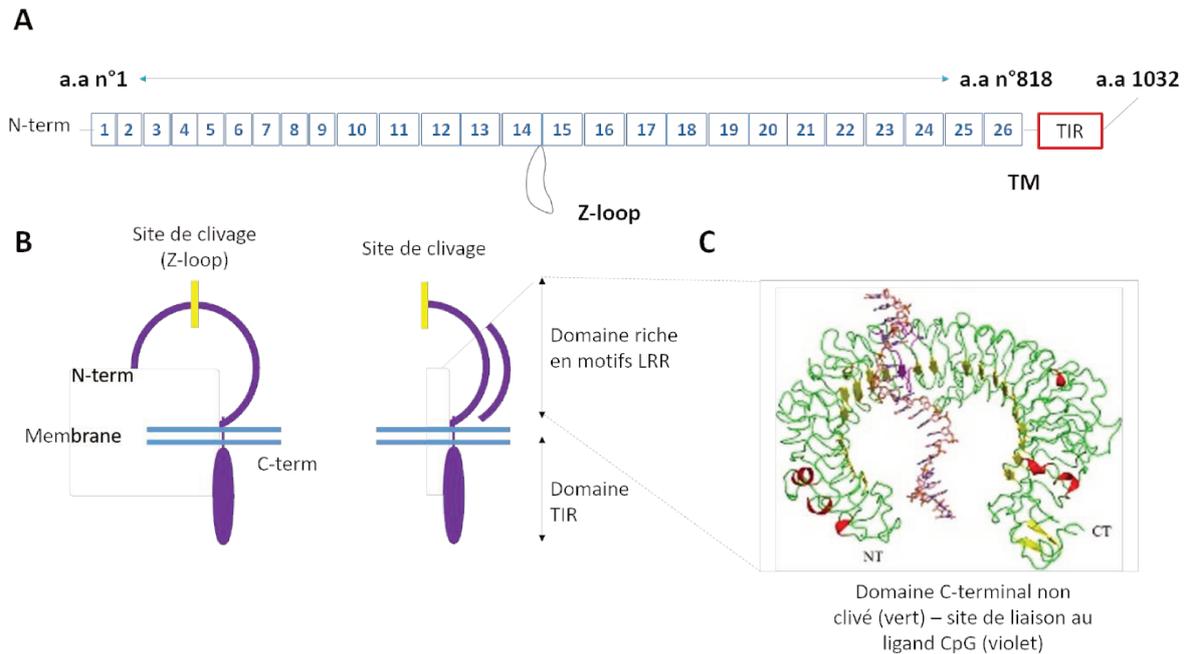


Figure 8 : Structure du TLR9 humain entier

A : Le TLR9 humain est composé de 26 domaines LRR et d'une boucle Z (*Z-loop*). Il est également composé d'un domaine transmembranaire et d'un domaine TIR. **B** : Le TLR9 subit clivage protéolytique au niveau de la boucle Z par les cathepsines et endopeptidases à pH acide. Le fragment N-terminal généré se rattache au reste du TLR9 et joue un rôle important dans sa signalisation. **C** : Le domaine riche en LRR est le site de liaison du ligand CpG-ODN. Ici, le ligand apparaît en violet.

a.a = acide aminés, TM = domaine TransMembranaire, N-term = domaine N-terminal, C-term = domaine C-terminal, LRR = *Leucine Rich Repeat* (d'après Ohto *et al.*, 2015 et uniprot.org)

Le TLR9 reconnaît préférentiellement l'ADN n'ayant pas de méthylation sur le carbone 5 des cytosines dans un contexte particulier de motifs répétés C-G (CpG) (Barton, 2007; Hemmi *et al.*, 2000). Ces motifs répétés varient entre les espèces et sont globalement moins fréquents dans l'ADN eucaryote (Krieg, 2002). On en trouve principalement dans le milieu environnant après endocytose ou phagocytose de virus ou de bactéries qui, après dégradation, ont vu leurs acides nucléiques relargués (Lee and Barton, 2014). Chez l'Homme, ces répétitions de CpG existent sous forme d'hexamères : 5'-GTCGTT-3' mais elles activent très peu le TLR9. Cependant, à

cause d'importants dommages cellulaires ou tissulaires, des acides nucléiques endogènes associés à des protéines ou contenus dans des complexes immuns souvent piégés dans la matrice extracellulaire ou *Neutrophils extracellular traps* NETs peuvent faire réagir le TLR9 (Brinkmann et al., 2004; Pelka et al., 2016). Après capture par le BCR, le récepteur Fc, le LL37 ou encore *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), ces autoAg peuvent être endocytés et atteindre les endolysosomes où ils activent le TLR9 (Yanai et al., 2009) (figure 9).

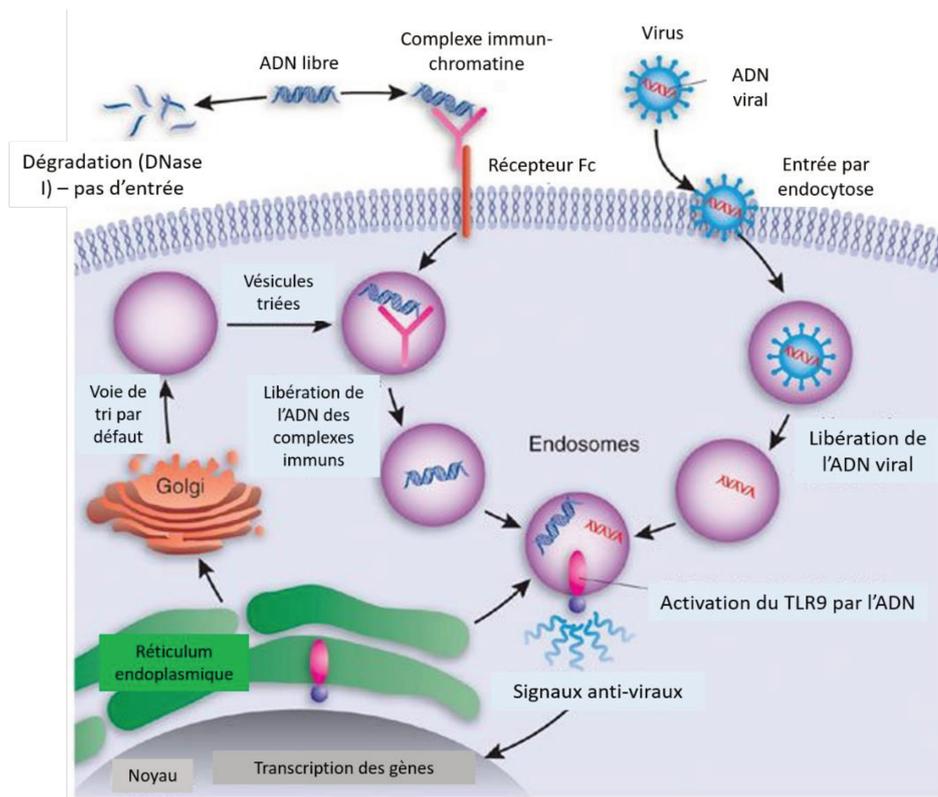


Figure 9 : Entrée du ligand du TLR9 dans la cellule et trafic vers les endosomes où ils se rencontrent

En 2008, une étude confirme d'ailleurs que le BCR peut être internalisé avec un Ag dans des compartiments autophagosomes-like où il co-localise avec le TLR9 et p38, un marqueur de l'autophagie (Chaturvedi et al., 2008). Cela suggère que le BCR est en mesure d'organiser la relocalisation des compartiments cellulaires pour améliorer la rencontre entre le TLR9 et son ligand. Dans les pDC, un système analogue de livraison d'antigène existe, le CD32 (ou FcγRIIa), un récepteur de faible affinité pour les IgG2a (Means et al., 2005).

Pour l'étude du TLR9, des ligands synthétiques ont été produits afin de le stimuler de manière optimale. Des ODN possédant des motifs CpG non méthylés ont été synthétisés. Il en existe plusieurs formes qui diffèrent par de légères variations dans la structure (figure 10).

- Le CpG-A contient une séquence palindromique centrale de CpG-PO (phosphodiester) et une queue 3'poly-G modifiée. Sa structure hautement stable peut être endocytée efficacement pour rejoindre le TLR9 et induire une forte stimulation et maturation des DC et pDC, en particulier et une production de grandes quantités d'IFN α , de cytokines pro-inflammatoires et encourager la prolifération des LT effecteurs et donc une réponse pro-inflammatoire.
- A contrario, le CpG-B consiste en une séquence de 18-28mer d'oligodeoxynucleotides linéaires contenant un motif 6mer CpG (GTCGTT chez l'Homme ; GACGTT chez la souris) qui active efficacement les LB par la voie *Nuclear Factor kappa B* (NF κ B) mais ne permet qu'une faible production d'IFN α (Gürsel et al., 2002; Krieg, 2002; Verthelyi and Zeuner, 2003).
- La dernière catégorie de CpG est de type C. Elle combine les caractéristiques des CpG-A et CpG-B, et sont capables d'induire une forte production d'IFN α par les pDC ainsi qu'une forte stimulation des LB, mais dans une moindre mesure que le CpG-B (figure 10).

La fixation du CpG-ODN permet le rapprochement allostérique des domaines TIR, le recrutement de MyD88 et la transduction du signal. Ce signal peut induire la production de cytokines proinflammatoires et d'IFN de type I surtout par les pDC. Il induit également l'activation polyclonale des LB.

Types de CpG-ODN

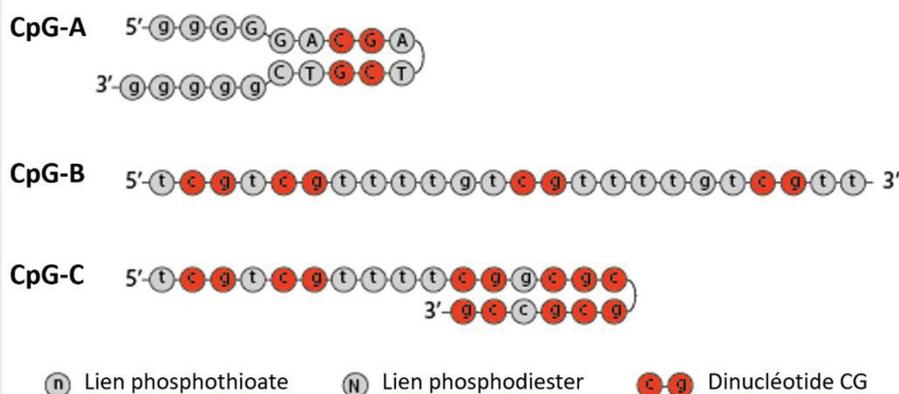


Figure 10 : Les trois classes de CpG-ODN synthétiques, agonistes du TLR9

Le TLR9 est un récepteur reconnaissant spécifiquement l'ADN bactérien riche en motifs CpG hypométhylé. Il existe 3 classes de ligands synthétiques du TLR9, le CpG-A, le CpG-B et le CpG-C (d'après le site www.invivogen.com).

[Le trafic intracellulaire du TLR9](#)

Un premier niveau régulant la reconnaissance des antigènes du soi est la localisation du TLR9 dans les endolysosomes qui limite la rencontre avec des Ag (Latz et al., 2004). Une étude démontre dans un modèle artificiel de TLR9 muté dans sa partie transmembranaire (TLR9^{TM-MUT}), qu'une localisation aberrante du TLR9 à la membrane plasmique force la rencontre avec des autoAg et induit une inflammation létale chez la souris (Mouchess et al., 2011).

Pour retrouver ses ligands endocytés, le TLR9 doit se déplacer du RE où il réside à son état inactif jusqu'aux endosomes précoces puis tardifs ainsi que dans les organelles associées au lysosome où il agit. Cette migration est engagée suite à l'endocytose du ligand CpG-ODN. Ce trafic requiert la participation de nombreux partenaires moléculaires qui jouent le rôle de chaperones de ce trafic. Parmi ces chaperones, la protéine UNC93B1 s'associe au TLR9 et est essentielle à son adressage du RE vers l'appareil de Golgi. En 2011, il a été montré que la production d'IL-10 par les LB_{reg} est contrôlée par les senseurs calciques intracellulaires STIM-1 et STIM-2 (Fukui et al., 2011a). Or, en 2017, l'équipe de Bénédicte Manoury a montré que la protéine UNC93B1 interagit avec STIM-1 afin de permettre l'oligomérisation et l'activation de STIM-1, ce qui conduit à l'acidification endosomale, la dégradation de l'antigène, l'export de l'antigène dans le cytosol et une cross-présentation efficace (Maschalidi et al., 2017).

Pour rejoindre ensuite les endosomes, le TLR9 associé à UNC93B1 met en jeu des protéines adaptatrices (*adaptor protein complex*, AP). Grâce à son interaction avec le complexe protéique AP-1, le TLR9 se rapproche de manière transitoire de la membrane plasmique où il recrute le complexe protéique AP-2 qui lui permet de se rediriger vers les endosomes (figure 11).

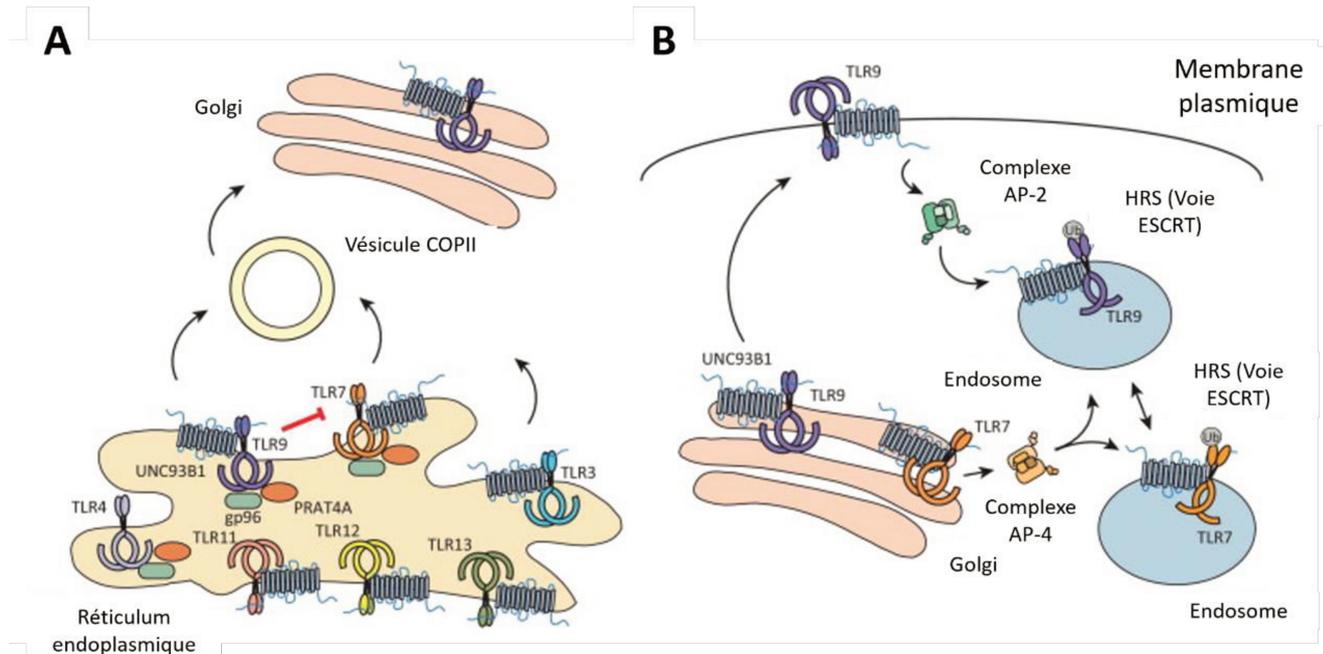


Figure 11 : Trafic intracellulaire des TLRs

A : Les TLRs sont produits dans le réticulum endoplasmique. Pour le quitter, le TLR9 et le TLR7 homodimérisés rejoignent les vésicules COPII grâce à la protéine chaperonne UNC92B1, ce qui leur permet de rejoindre l'appareil de Golgi. **B :** Le TLR9 rejoint la membrane plasmique (*supposition*) grâce à la protéine chaperonne UNC93B1 pour y recruter le complexe protéique AP-2 qui lui permet de rejoindre dans un 2^{ème} temps les endosomes précoces. Le TLR7 s'associe quant à lui avec le complexe AP-4 directement depuis l'appareil de Golgi pour rejoindre les endosomes (d'après Bettina Lee, 2014). COPII = *coat protein complex II*, PRAT4A = *Protein associated with TLR4 A*, UNC93B1 = *Unc-93 homolog B1*, AP = *adaptor complex*, TLR = *Toll-like receptor*, HRS = *HGF-regulated tyrosine kinase substrate*, ESCRT = *endosomal sorting complexes required for transport*, gp = glycoprotéine

Dans les endosomes, environnement acide, l'homodimère TLR9 subira un clivage protéolytique au niveau de la Z-loop par des endopeptidases et les cathepsines actives à pH acide.

Se libèrera alors le fragment N-terminal du TLR9 qui restera accroché à la partie C-terminale et sera utile à la signalisation induite par le récepteur.

Enfin, nous allons voir comment la localisation finale du TLR9 peut conditionner la nature de la réponse qu'il induit et des molécules antimicrobiennes alors produites. Le contrôle du trafic intracellulaire du TLR9 est donc clé dans la régulation de sa signalisation.

A son état inactif, le TLR9 est localisé dans le réticulum endoplasmique. Suite à l'endocytose de son ligand, il migre vers les endosomes où il rencontrera ce ligand.

Trafic depuis le réticulum endoplasmique

Comme le TLR7 et le TLR8, le TLR9 est formé dans le réticulum endoplasmique (RE) qu'il quitte *via* les vésicules COPII. Ces vésicules transportent des cargos protéiques pour qu'ils rejoignent l'appareil de Golgi, et finalement le large réseau de vésicules endosomales (Chockalingam et al., 2009; Lee et al., 2013). Ce trafic à l'intérieur des cellules est réalisé grâce à un ensemble de protéines chaperonnes qui permettent notamment l'étape initiale de l'export du RE, étape critique à la livraison d'un nombre suffisant de TLR fonctionnels dans les endolysosomes (figure 11).

La protéine chaperonne UNC93B1 (*protein unc-93 homolog B1*) en est une importante (Kim et al., 2008; Latz et al., 2004; Pelka et al., 2016) et contrôle principalement le trafic des TLR endosomaux (Tabeta et al., 2006). Afin de prendre en charge ces TLR, UNC93B1 doit interagir directement avec eux à plusieurs sites précis identifiés. Le site H412R sur UNC93B1 en est un exemple. Lorsqu'il est muté, le TLR9 ne quitte pas le RE (Brinkmann et al., 2007; Lee et al., 2013). De même, les sites D812 et E813 adjacents à la partie transmembranaire des TLR sont capitaux (Kim et al., 2013). Il a également été montré que la partie cytosolique du TLR9 est importante pour son trafic (Leifer et al., 2006). Un dernier site clé a été identifié sur la partie N-terminale la protéine UNC93B1. Il s'agit de la position D34 qui, lorsqu'elle est mutée en D34A, potentialise la réponse TLR7 en supprimant la réponse TLR9. Il a été montré que cette position est impliquée dans le recrutement du TLR9. En compétition avec le TLR9 pour le recrutement de UNC93B1, le TLR7 est alors davantage capable de fixer sa chaperonne. Les niveaux de TLR7 présents dans les endosomes sont plus importants, ce qui conduit à une inflammation léthale chez la souris (Fukui et al., 2009, 2011b; Kim et al., 2008).

D'autres protéines sont importantes pour la sortie des TLR du RE mais elles fonctionnent principalement comme partenaires du repliement tridimensionnel des TLR (Lee et al., 2012). Notons ainsi gp96, un paralogue de l'*Heat Shock Protein 90* (HSP90) qui agit en partenariat avec la 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase 43 (CNP43) (Liu et al., 2010) et la protéine *Protein Associated with Toll-like receptor 4* (PRAT4A) (Takahashi et al., 2007).

Et au-delà !

Même après la sortie du RE, UNC93B1 reste associé aux TLR endosomaux. Il s'associe, *via* la position Y539, avec le complexe protéique adaptateur AP-2 chargé de faciliter l'endocytose des récepteurs depuis la surface cellulaire. Lorsque cette position est mutée (Y539A), le TLR9 ne parvient pas à rejoindre les endosomes et s'accumule à la membrane plasmique (Lee et al., 2013).

Le facteur *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (HRS), appartenant à la voie ESCRT, est un autre élément clé du trafic du TLR7 et du TLR9. La voie canonique ESCRT est impliquée dans l'inhibition des récepteurs de la membrane plasmique et leur trafic vers le lysosome pour dégradation. Cependant, le TLR9 semble utiliser une voie ESCRT non canonique utilisée pour assurer le recyclage des récepteurs plutôt que leur dégradation (Chiang et al., 2012). Le TLR9 est ubiquitinylé par une ubiquitine E3 non identifiée, dans un compartiment cellulaire localisé après le RE. Cette ubiquitinylation permet la reconnaissance du TLR9 par HRS et le maintien de son trafic vers les endolysosomes où il doit résider.

Une découverte majeure a été réalisée lorsque l'équipe de Taniguchi a mis en évidence que l'induction de la production des cytokines proinflammatoires ou d'IFN de type I, deux classes différentes de gènes, dépend de la nature de l'endosome d'où la transduction du signal démarre (Honda et al., 2005). D'autres études menées à la même époque ont montré que différents CpG-ODN induisent différentes voies de signalisation dans les pDC (Guiducci et al., 2006; Kerkmann et al., 2003; Vollmer et al., 2004). En effet, le CpG-A permettait une forte production d'IFN de type I alors que le CpG-B permettait la production de cytokines proinflammatoires (TNF α , IL6 et IL12p40). Or, ces différents types de CpG migrent vers des vésicules différentes dans la cellule d'où le TLR9 peut induire des voies de signalisation et des facteurs de transcription différents. En pratique, le CpG-A est principalement localisé dans les endosomes précoces d'où le TLR9 peut favoriser la production d'IFN-I en recrutant *interferon regulatory factor 7* (IRF7). Le CpG-B quant à lui est principalement localisé dans les endosomes tardifs d'où le TLR9 peut favoriser la production de cytokines proinflammatoires en recrutant NF κ B.

Cette différence de localisation des CpG a précédemment été associée à leur structure tridimensionnelle (Honda et al., 2005) (figure 11).

L'*Adaptor Protein 3* (AP-3), comme AP-2, est un complexe protéique qui facilite le trafic du TLR9 depuis les endosomes précoces *Vesicle-Associated Membrane Protein 3* (VAMP3)⁺ vers les organelles associées aux lysosomes *Lysosome-associated membrane glycoprotein 3* (LAMP2)⁺ où AP3 peut se lier avec IRF7 et *TNF receptor associated factor 3* (TRAF3). (Blasius et al., 2010; Sasai et al., 2010). Dans des souris AP-3^{-/-}, une stimulation par le TLR9 ne permet pas d'induire la production d'IFN-I.

Pour terminer, il a également été montré qu'une voie non canonique de l'autophagie, appelée *LC3 associated phagocytosis* (LAP) joue également sur la réponse IFN-I après stimulation par le TLR9 dans les pDC. Après l'intégration des complexes immuns, le TLR9 s'associe à UNC93B1 et migre vers les endosomes où il est recruté. La nature des endosomes où il est recruté est influencée par la voie LAP. Chez des pDC murins *Atg7*^{-/-}, les complexes immuns sont localisés dans les compartiments VAMP3⁺ et non dans les compartiments LAMP1/LAMP2⁺, et ne parviennent pas à induire de production d'IFN α . Or les pDC *Atg7*^{-/-} et *Atg5*^{-/-} voient leur production d'IFN α diminuer après liaison du TLR9 avec son ligand (Henault et al., 2012).

[La signalisation par le TLR9](#)

Une fois les endolysosomes rejoints, le TLR9 subit d'autres étapes-clé qui permettent l'induction d'une signalisation contrôlée. Dans cette partie nous allons voir comment le clivage de son domaine N-terminal, la reconnaissance du ligand et la dimérisation du TLR9 sont essentiels à sa signalisation (Ewald et al., 2008).

Clivage de la partie N-terminale du TLR9

Si l'importance du clivage de la partie N-terminale du TLR9 pour la liaison de son ligand est discutée, on sait en revanche qu'il est indispensable à la transduction de son signal (Ewald et al., 2008). Ce clivage est réalisé par les cathepsines et asparagines endopeptidases actives seulement à pH acide (Ewald et al., 2008; Park et al., 2008; Sepulveda et al., 2009). Cette importance de l'acidité du pH a été relevée par deux études qui montrent que, lorsque l'on corrige cette acidité en utilisant de la chloroquine ou de la bafilomycine A1, on inhibe également l'activation médiée par le TLR9 (Rutz et al., 2004; Yi et al., 1998). Une autre étude a montré que le fragment libre généré par le clivage demeure indispensable à la signalisation

par le TLR9. Une mutation d'un nucléotide dans cette partie N-terminale du TLR9 suffit à induire un défaut de sa signalisation (Peter et al., 2009). D'autres études menées sur les TLR3 et TLR8, deux autres TLR endosomaux, montrent que ce fragment N-terminal clivé se rattache au reste du TLR et joue un rôle capital dans la liaison du ligand (Ewald et al., 2008; Park et al., 2008; Onji et al., 2013; Bauer, 2013; Peter et al., 2009) (figure 6).

Reconnaissance du ligand et dimérisation

Le TLR9 connaît plusieurs ligands : des agonistes d'origine naturelle du type ADN contenu dans des complexes immuns (IC-DNA) ou synthétique (CpG-ODN) ainsi que des antagonistes (ADN interférent : iDNA) (Duramad et al., 2005) qu'il rencontre dans les endolysosomes acides (figure 8). L'importance de la liaison du ligand pour l'homodimérisation du TLR9 est controversée et la participation éventuelle d'une chaperonne à la formation de l'homodimère n'est pas exclue (Latz et al., 2007; Ohto et al., 2015). Cependant, il a été démontré par une étude cristallographique du TLR9 que deux molécules de CpG-ODN peuvent se lier de manière symétrique à deux molécules protomères dans l'homodimère du TLR9 (Ohto et al., 2015). Dans cette étude, iDNA, antagoniste du TLR9, ne forme qu'un monomère avec le récepteur dont la signalisation est bloquée par des changements de conformation de son ectodomaine.

Dans une autre étude, il existe pour les auteurs deux conformations de l'homodimère de TLR9. Une conformation inactive où les domaines cytoplasmiques TIR sont éloignés ce qui ne permet pas de recrutement de la molécule adaptatrice MYD88, nécessaire à la transduction du signal. Et une conformation active où la liaison du ligand permet un changement allostérique dans la conformation du TLR9 ce qui force le rapprochement des domaines TIR et permet la transduction du signal (Latz et al., 2007).

Initiation de la signalisation

En plus de leur spécificité pour une famille de ligands, les TLR varient dans leur niveau d'expression et dans les voies de signalisation qui les activent. L'importance de ces différences biologiques n'est pas connue. Cependant, l'activation de n'importe quel TLR aboutit à la production d'une réponse inflammatoire anti-microbienne. Cette réponse passe par l'activation de facteurs de transcription tels que IRF7, AP-1 et NF κ B qui transloquent dans le noyau où ils régulent l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF α , IL1 ou l'IL6 et des molécules co-stimulatrices comme CD80-CD86. Dans cette partie, nous allons parler des voies

de signalisation engagées par le TLR9 et qui aboutissent, comme vu précédemment, à la production d'IFN de type I ou de cytokines pro-inflammatoires (figure 6).

Après rencontre avec son ligand dans les endosomes acides, le TLR9 est clivé et la transduction de son signal peut démarrer. Elle requiert la participation de molécules partenaires et, comme la plupart des TLR, le TLR9 recrute la protéine adaptatrice MYD88 (Imler and Hoffmann, 2003; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). L'interaction du TLR9 avec MYD88 s'effectue entre leurs domaines TIR respectifs. MYD88 contient également un domaine de mort amino-terminal qui lui permet d'interagir en parallèle avec les protéines de la famille *Interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK). Ces kinases situées plus en aval dans la voie participent à la conduction du signal provenant des TLR. Dans la famille IRAK, le couple IRAK1 et IRAK4 joue un rôle critique (Vollmer et al., 2017). En réponse à l'activation des TLR, ces kinases phosphorylées forment avec MYD88 le myddosome. Il recrute le facteur TRAF6 qui, polyubiquitinylé par les facteurs Uev1a et Ubc13, sera alors capable d'activer *IκB kinase α* (IKKα) et *Transforming growth factor β-activated kinase 1* (TAK1) (Flannery and Bowie, 2010; Suzuki et al., 2002). Ces kinases phosphorylent respectivement *IκB kinase β* (IKKβ) et *Mitogen-activated protein Kinase Kinase* (MKK6) et activent des facteurs de transcription plus en aval dans la voie comme le facteur IRF7, IRF3 et *Nuclear Factor κ B* (NFκB). Ces facteurs de transcription transloquent alors dans le noyau où ils régulent l'expression de molécules de la réponse immunitaire telles que l'IFN de type I et les cytokines pro-inflammatoires (De Nardo, 2015; Honda et al., 2005; Sato et al., 2005). IKKβ active *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor β* (IκB), l'inhibiteur cytoplasmique de NFκB et permet ainsi le relargage du facteur de transcription et sa translocation dans le noyau. Cette translocation de NFκB se fait de manière plus retardée que celle d'IRF7. MKK6 phosphoryle quant à elle la kinase *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), qui active AP-1. Ainsi, la stimulation *via* le TLR9 permet d'induire la translocation dans le noyau de trois facteurs de transcription qui vont agir sur des promoteurs de gènes de l'inflammation pour induire leur transcription (figure 6).

Par ces voies de signalisation, les TLR participent au recrutement des leucocytes aux sites d'infection en activant les cellules stromales, les cellules du SI inné résidentes des tissus infectés et les leucocytes circulants ; une stimulation chez le LB *via* le TLR9 induisant sa prolifération, sa commutation de classe isotypique et sa différenciation en plasmocyte sécréteur d'Ac.

Synergie des voies en aval du TLR9 et du BCR

La capture et l'internalisation du CpG-ODN est un processus cavéoline-indépendant mais qui requière une endocytose médiée par un récepteur (Latz et al., 2004). Chez le LB, le BCR et le récepteur au fragment Fc participent à la capture et à l'internalisation du CpG-ODN (Lanzavecchia and Sallusto, 2007). Mais le rôle du BCR n'est pas simplement d'internaliser et de présenter l'antigène-acide nucléique. Si l'activation par le BCR permet d'augmenter l'expression du TLR9 endosomal et du TLR9 total, elle permet également la relocalisation du TLR9 des endosomes précoces vers les endosomes tardifs où il co-localise avec le BCR et son antigène (Busconi et al., 2007; Chaturvedi et al., 2008; O'Neill et al., 2009).

En dehors de cet effet direct, quelques molécules de la signalisation en aval du BCR interagissent avec les voies de signalisation des TLR afin d'en moduler la réponse (Rawlings et al., 2012, 2017). Les kinases *spleen tyrosine kinase* (Syk) et *Bruton's tyrosine kinase* (Btk) participant à la signalisation par le BCR sont également nécessaires à l'activation du TLR7/TLR9 (Iwata et al., 2015; Nündel et al., 2013). Dans les LB humains, Syk est un régulateur positif des TLR et de la synergie BCR/TLR, puisque que l'inhibition de Syk bloque la réponse TLR (Iwata et al., 2012; Kremlitzka et al., 2015). Son activation a également été associée à l'expression de TRAF6 dans les LB de patients atteints de LES (Iwata et al., 2015). Ces différents éléments suggèrent que, Syk pouvant bloquer la réponse par le TLR9, son rôle pourrait être important dans l'initiation de pathologies autoimmunes. Les protéines TANK (*TRAF associated NF κ B activator*) et TOLLIP (*Toll interacting protein*) ont également été identifiées pour leur rôle inhibiteur de la voie du TLR9 (Clark et al., 2011; Günthner et al., 2013; Piao et al., 2009).

De la même manière, des LB murins déficients en *Lyn* produisent plus d'autoAc anti-acides nucléiques, ainsi que davantage de cytokines, et favorisent le développement d'une pathologie autoimmune ce qui souligne son rôle capital (Nishizumi et al., 1995). Le mécanisme exact de cette régulation négative dans la signalisation par les TLR n'est pas définie mais il est bien établi que la protéine kinase *Lyn* est nécessaire à la phosphorylation et à l'activation du CD22, un régulateur négatif important de la signalisation par le BCR (Xu et al., 2005).

D'autres molécules de la signalisation en aval du BCR peuvent interférer avec la signalisation par les TLR. La protéine *B cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase* (BCAP) est capable de réguler négativement les réponses inflammatoires conduites par les TLR4, 7 et 9 (Matsumura et al. 2006). La protéine *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats* (BANK1) est également

capable d'augmenter la signalisation par le TLR7 et le TLR9 même si les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas encore connus (Wu et al., 2013, 2016). Le point initial de croisement entre les voies du BCR et du TLR semble être la kinase TAK1. Lorsqu'elle est inhibée ou déplétée, l'activation synergique BCR-TLR9 est abrogée (Szili et al., 2014). Jabara *et al.* ont mis en évidence que *dedicator of cytokinesis-8* (DOCK8) constitue un lien entre le TLR9 et STAT3 (Jabara et al., 2012). L'activation du TLR9 par le CpG induit la migration du complexe formé par Myd88, DCOK8 et de la protéine tyrosine kinase 2 β (Pyk2) vers la queue cytoplasmique du TLR9. Cette association induit la phosphorylation de DOCK8 par Pyk2, et permet ainsi la liaison de DOCK8 avec Lyn. Cette liaison conduit à l'activation de Syk et de STAT3, de qui conduit à une forte expression de gènes permettant la survie des LB mémoires et la production d'Ac. L'ensemble de ces éléments suggère que la cinétique d'activation du BCR par rapport à celle du TLR9 est importante. Si, dans un contexte physiologique, le BCR est activé avant que les ligands ne soient présentés au TLR9, DOCK8, Syk et Lyn peuvent tous jouer un rôle d'autant plus important dans l'intégration des signaux BCR/TLR9.

TLR9 et auto-immunité

Dans le premier chapitre de cette introduction, nous avons vu comment les TLR et le TLR9 en particulier sont en mesure d'induire l'activation des LB ainsi que leur prolifération. Ces LB au caractère « régulateur de l'inflammation » sont en mesure d'orienter la réponse T vers une réponse Th1 en sécrétant de l'IL12, d'inhiber la prolifération de ces LT et d'encourager l'apparition de LT_{reg} FoxP3⁺. Dans certains contextes exceptionnels, les LB sont activés de manière aberrante par le TLR9 qui reconnaît des acides nucléiques endogènes libérés de cellules endommagées ou mourantes. En réponse à cette activation, les LB produisent des autoAc et initient une réponse auto-immune. Tout au long de l'introduction, nous avons vu comment des déficiences ou des surexpressions de certaines molécules clé du trafic ou de la signalisation de TLR peuvent conduire au développement de pathologies autoimmunes. Dans cette partie, nous allons ajouter quelques éléments intéressants à prendre en compte.

En plus de la signalisation par le BCR, la balance TLR7/TLR9 est clé dans le développement d'une autoréactivité par les LB. La suppression du TLR7 conduit au développement d'adénopathies ainsi qu'à la baisse des marqueurs de l'activation des lymphocytes et des pDC, corrélée à la réduction de l'atteinte rénale chez les patients lupiques (Christensen et al., 2006). Au contraire, la déficience en TLR9 semble aggraver ces différents paramètres, ce qui conforte dans l'idée qu'il joue un rôle régulateur. Cela est conforté par Nündel *et al.* qui montrent qu'une activation *in vitro* des LB *via* le BCR/TLR9 est en mesure de bloquer partiellement la réponse

BCR/TLR7. Dans un modèle murin d'autoimmunité, la déficience de TLR9 dans les LB est responsable de l'aggravation des symptômes de la maladie (Nündel et al., 2013). De plus, l'activation BCR-TLR7 induit un état pro-inflammatoire et atténue la tolérance par les LB en périphérie (Poovassery et al., 2009). A l'opposé, une synergie BCR-TLR9 induit une tolérance centrale notamment *via* l'expression de l'enzyme spécifique des LB *activation-induced cytidine deaminase* (AID) et la production d'IL10 dans les LB immatures autoréactifs/T1 (Kuraoka et al., 2017). Cet équilibre entre la signalisation par le TLR7 et le TLR9 constitue une balance entre une activation normale et pathologique des LB.

Le rôle du TLR9 semble cependant paradoxal. Il peut en effet être protecteur contre l'auto-immunité et inhiber directement et indirectement la production des autoAc médiée par le TLR7. Mais il a également été rapporté qu'il est capable d'induire la production d'autoAc par des LB mémoires activés *via* leur BCR. Chez les donneurs de LB sains, le double engagement synergique du BCR et des TLR7/TLR9 induit la production de cytokines, d'Ac, et une commutation de classe (Pone et al., 2012; Vanden Bush and Bishop, 2008). Cependant, chez les patients atteints de maladies auto-immunes, l'activation synergique BCR-TLR7/TLR9 conduit à une augmentation de la prolifération des LB et de la production d'autoAc (Lau et al., 2005; Leadbetter et al., 2002; Viglianti et al., 2003).

Le relargage de HMGB1 depuis les cellules nécrotiques, une protéine liant l'ADN, est associée aux réponses inflammatoires dans les maladies auto-immunes et les septicémies (Scaffidi et al., 2002). Il peut également être sécrété activement par les monocytes et les DC. Il peut être facilement reconnu par le récepteur Receptor for Advanced Glycosylation End products (RAGE) et une interaction avec une IgG2a facilite son passage vers les compartiments intracellulaires (Avalos et al., 2010; Tian et al., 2007).

Il est intéressant de noter que les IFN produits sont capables d'induire une boucle de rétrocontrôle positif en se fixant sur leur récepteur *interferon α/β receptor* (IFNAR) qui induit alors une nouvelle production d'IFN. La moitié des patients lupiques montre d'ailleurs une signature-interféron qui corrèle avec la sévérité de la maladie (Hall and Rosen, 2010).

OBJECTIFS DE LA THESE

Tout au long de l'introduction, nous avons montré combien les LB_{reg} et la signalisation par les TLR étaient importants pour l'équilibre entre inflammation et tolérance. Il a été montré que la voie du TLR9 participe activement au maintien de cette tolérance et permet aux LB de devenir régulateurs. De nombreux papiers démontrent qu'une déficience en LB_{reg} ou dans la voie ou le trafic du TLR9 peut conduire au développement d'une hyperinflammation, voire à des pathologies telles que des cancers ou des maladies autoimmunes.

Une localisation aberrante du TLR9 à la membrane plasmique peut être à l'origine d'une réaction contre des antigènes du soi. D'autre part, une étude conduite au sein de notre laboratoire a permis de montrer un marquage à la membrane plasmique d'un Ac monoclonal anti-TLR9 dans des LB de sang périphérique. Ce TLR9 « plasmique » des LB, stimulés en culture *in vitro* par le même Ac monoclonal induisait un changement phénotypique des LB vers un profil LB transitionnels CD24^{hi}CD38^{hi} (Guerrier et al., 2014). Dans la même étude, il a été montré que ce TLR9 ne ciblait pas de CpG-ODN et pouvait se retrouver dans les radeaux lipidiques en présence du BCR.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc souhaité confirmer la présence d'un TLR9 à la membrane plasmique des LB et le caractériser. Dans un deuxième temps, nous avons souhaité identifier ses ligands potentiels et la voie de signalisation qui lui permet d'influer sur le profil phénotypique et fonctionnel des LB. Pour terminer, nous souhaitons identifier les partenaires moléculaires de son trafic vers la membrane plasmique.

En cours de réalisation de nos expérimentations, nous avons constaté un défaut majeur des Ac commerciaux dirigés contre le TLR9. Ce défaut nous a conduits à remettre en question certains résultats précédemment obtenus d'une part, et à réorienter le sujet de thèse d'autre part, la réussite de nos objectifs initiaux ayant fortement été compromise par cette observation.

Dans les parties suivantes, nous traiterons donc principalement de nos travaux qui ont consisté en la caractérisation des Ac monoclonaux et polyclonaux anti-TLR9 que nous avons acquis au laboratoire afin d'en définir les limites d'usage au travers de plusieurs applications expérimentales.

Pour terminer, nous discuterons les points principaux de ce travail. Inspirée de travaux précédents, nous souhaitons rapporter les contrôles indispensables à la validation de travaux nécessitant l'utilisation d'Ac commerciaux. Nous tracerons également un bilan de différentes

techniques alternatives à l'utilisation des Ac commerciaux, recensées dans la littérature, et qui sont à la base des principaux travaux de caractérisation du TLR9 telle que connue aujourd'hui.

MATERIEL ET METHODES

Lignées et culture cellulaire

LIGNEES CELLULAIRES

La lignée lymphocytaire B humaine RA-1 dérivée du lymphome de Burkitt (RAMOS) et la lignée myélomonocytaire U937 sont entretenues dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park memorial Institute) [Sigma Aldrich] enrichi avec 10% de sérum de veau foetal [Eurobio] décomplémenté au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes (SVFdec), 2mM de L-Glutamine [Gibco life Technology], 100µg/mL de pénicilline et 200U/mL de streptomycine [Panpharma]. La lignée cellulaire rénale adhérente *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) issue de cellules épithéliales humaines de rein embryonnaire est entretenue en milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) [Dominique Dutscher] enrichi des mêmes éléments que le milieu RPMI. Pour réaliser le passage des HEK293 à environ 90-95% de confluence, de la Trypsine/ Éthylènediaminetétraacétique (EDTA) [Pan Biotech] est utilisée pour décoller les cellules. Elles sont ensuite reprises dans 10mL de SVFdec, quantité suffisante pour (qsp) 50mL de PBS1X puis centrifugées à 1200 rotations par minutes (RPM) pendant 10 minutes. Diluée en milieu DMEM, une fraction de cellules est réensemencée dans une flasque 75cm³. Tous les types cellulaires sont cultivés à 37°C en présence de 5% de CO₂.

CELLULES PRIMAIRES ET PURIFICATION CELLULAIRES

L'isolement des cellules mononuclées du sang (PBMC) est réalisé à partir d'échantillons de sang. Le sang collecté est préalablement déplaqué, puis dilué au demi dans du tampon phosphate salin (PBS) avant d'être déposé sur un gradient de Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, France). Après centrifugation, l'anneau cellulaire contenant les PBMC est récupéré, lavé dans du PBS puis les cellules sont comptabilisées sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

L'isolement des cellules mononuclées d'amygdales (*Tonsil Mononuclear Cells*, TMC) est réalisé à partir d'amygdales hypertrophiques d'enfants âgés de 2 à 15 ans. Elles sont disséquées et broyées mécaniquement dans du tampon phosphate salin (*Phosphate buffered saline*, PBS) puis le broyat est filtré au travers d'un tamis de 70µm [BD Biosciences]. La suspension cellulaire ainsi obtenue est diluée dans du PBS puis séparée sur un gradient de Ficoll-Hypaque [Eurobio] en respectant le ratio 1/3 de Ficoll pour 2/3 de suspension cellulaire. La séparation se

fait le temps d'une centrifugation à 1800 RPM pendant 30 minutes sans frein et à température ambiante. L'anneau formé entre les deux phases est prélevé et lavé 2 fois en PBS. Il contient les TMC. Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez en présence de bleu de trypan [Sigma Aldrich] avant d'être déplétées en LT par la technique des rosettes.

Pour la préparation des rosettes : 5mL de suspension de globules rouges de mouton (GRM) [Dr Merck] lavés au PBS sont incubés dans une solution d'Alsever (pour 1L d'H₂O : 20,5g Dextrose (114mm[°], 7,9g citrate de sodium (27mM), 4,2g NaCl (71mM), pH=6,1), puis à nouveau lavés dans du PBS. De la neuraminidase [Sigma Aldrich] est ensuite ajoutée à raison de 1U/mL de culot cellulaire et le mélange est incubé à 37°C pendant 75 minutes. Elle va permettre de découvrir les récepteurs LFA-3 à la surface des GRM, permettant ainsi les interactions avec le récepteur CD2 des LT. Quatre lavages au PBS (2000 RPM, 7 minutes, 4°C) sont alors réalisés et les cellules sont reprises dans du milieu RPMI complet.

Les TMC remises en suspension à raison de 10⁸/10mL de SVFdec sont mélangées à un volume identique de GRM prétraités à la neuraminidase, centrifugées à 800RPM, 5 minutes puis incubées 1h30 sur glace. Les LT vont former des complexes avec les GRM, permettant de les isoler de la fraction LB-monocytes sur gradient de Ficoll-Hypaque. L'anneau cellulaire et les culots sont récupérés et lavés dans du PBS. Afin d'éliminer les GRM, les deux fractions sont incubées dans une solution de lyse Ammonium/Chloride/Potassium (ACK) (pour 1 litre d'H₂O = 8,2g NH₄Cl (0,15M), 1g KHCO₃ (10mM), 37,2mg Na₂EDTA (0,1mM), pH=7.4) pendant 4 minutes sur glace, puis lavées dans du PBS. La pureté des cellules est alors évaluée par cytométrie de flux [Navios, Beckman Coulter]. La technique des rosettes permet d'obtenir une population de LB pure à plus de 95%. Concernant les LT, un enrichissement supplémentaire est nécessaire afin d'éliminer le restant de LB.

Cet enrichissement est effectué grâce à l'utilisation d'un kit *CD19⁺ Microbeads, human* [Miltenyi Biotec] selon les recommandations du fabricant. Les LB marqués par les billes magnétiques recouvertes d'un Ac anti-CD19 sont retenus dans la colonne grâce à l'utilisation d'un aimant alors que les LT sont élués. La population de LT est ainsi pure à plus de 95%.

COCULTURES LB-LT ISSUS D'AMYGDALES

[Analyse de la prolifération des LT](#)

Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans des plaques 96 puits en milieu RPMI 1640 complet. Des IgG F(ab')₂ anti-Ig de souris [Jackson Immunoresearch] sont fixées préalablement dans chaque puit à la concentration de 10µg/mL. Afin d'induire la

prolifération des LT, 4.10^4 cellules sont stimulées par deux Ac anti-CD3 (0,2 µg/mL, clone OKT3, Biolegend) et anti-CD28 (0,2 µg/mL, clone CD28.2) [Beckman Coulter]. Les LT et LB sont cultivés à un ratio 1:1 pendant 4 jours. Les LB sont stimulés ou non avec du CpG-ODN 2006 (0,25µM) [InvivoGen] afin d'induire leur fonction régulatrice. Pour suivre la prolifération par cytométrie de flux, les LT sont préalablement marqués avec un agent intercalant de l'ADN, le *Cell Trace Violet* (CTV) [ThermoFisher] avant la mise en culture à raison de 1µL de marqueur pour 10^6 cellules/mL. L'inhibition de la prolifération induite par les LB est évaluée par le logiciel FlowJo.

[Analyse de la différenciation des sous-populations de LB](#)

Afin d'évaluer la différenciation des sous-populations de LB d'amygdales à l'issue de la co-culture LT-LB, nous avons évalué l'expression de plusieurs marqueurs par cytométrie en flux : CD19, CD25, CD27, IgD/IgM, *Human Leukocyte Antigen* (HLA) DR, CD5.

Analyse quantitative de l'expression d'ARNm

L'EXTRACTION D'ARN TOTAUX

L'extraction d'ARN totaux est réalisée à l'aide du kit RNeasy Plus MicroKit [Qiagen] selon les recommandations du fabricant. La mesure de leur qualité ainsi que le dosage ont été réalisés avec le Nanodrop 2000C.

LA RETROTRANSCRIPTION

Pour la rétrotranscription des ARN messagers en ADN complémentaire, 1µg d'ARN totaux sont placés dans un tube 0,5µL. De l'H₂O est ajouté qsp 10µL ainsi que 150ng de random primers et 1µL à 0,5mM de dNTPs. Le mélange est incubé à 65°C pendant 5 minutes puis refroidit 1 minute sur glace. On ajoute 2µL à 10mM de dithiothréitol (DTT) et 4µL de tampon de réaction (5x). Après centrifugation à la centrifugeuse de paillasse, le tube est laissé à température ambiante 2 minutes supplémentaires. Enfin, 50U de transcriptase inverse SupertranscriptII sont ajoutées. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les tubes sont placés au thermocycleur où ils subissent le programme suivant : 50 minutes à 42°C puis 10 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. Le mélange d'ADN complémentaire est conservé à -20°C.

Pour vérifier la non-contamination de l'ADN complémentaire par de l'ADN génomique, une PCR est réalisée en présence de 1µL d'ADN complémentaire, de 5µL de tampon de réaction

(5X), de 1,5µL de MgCl₂ (25mM), de 1µM de dNTP (10µM), de 1µL d'amorces (5µM) ciblant la partie charnière entre deux exons codant pour le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Le produit de cette PCR est déposé sur gel d'agarose 2% et séparé à 150 volts pendant 50 minutes. Le résultat de l'électrophorèse est analysé sous UV. La présence d'une bande unique à 100pb indique que l'ADN complémentaire n'est pas contaminé par de l'ADN génomique.

LA PCR QUANTITATIVE

La *polymerase chain reaction* (PCR) quantitative en temps réel est réalisée à l'aide du système QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System [Applied Biosystem] avec le kit SYBR® Green PCR Master Mix & RT-PCR Reagents kit [Life Technologies] dans les tubes MicroAmp [Applied Biosystems]. Chaque réaction est préparée en double et un tube d'H₂O sert de contrôle négatif. La réaction a lieu dans un volume total de 20µL avec 5µM d'oligonucléotide sens et anti-sens, 50ng d'ADN complémentaire et 10µL de MasterMix qsp 20µL avec de l'H₂O. Le programme comprend une première étape *Hold stage* (50°C pendant 2 minutes, puis 95°C pendant 10 minutes) puis une étape *PCR Stage* (40 cycles avec 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C) et se termine par une étape de dissociation des fragments amplifiés permettant d'obtenir la courbe de dissociation (Melt curve) qui reflète la pureté du fragment amplifié.

Clonage du TLR9 tagué avec une hémagglutinine

POUR LA REALISATION DE LA PROTEINE DE FUSION TLR9-HEMAGGLUTININE (HA) EN C-TERMINAL :

[Pour obtenir la séquence d'ADN complémentaire de l'ARNm du TLR9 humain \[NM_017442\]](#) :

Après purification à partir d'amygdales humaines, les ARNm de 10⁷ LB ont été extraits. Leur qualité et quantité ont été évaluées au bioanalyseur 2100 (RIN=9,90), une transcription inverse en ADN complémentaire.

Pour vérifier le succès de cette rétrotranscription, une PCR a été réalisée pour confirmer l'expression de trois gènes de ménages. Le programme de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C initiale suivie de 20 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C et

terminée par 5 minutes à 72°C. Le thermocycleur utilisé provient de la société *Applied biosystems*.

Afin de sélectionner le cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame*, ORF) du TLR9 humain, une PCR d'amplification a été réalisée à l'aide de la Platinum Super Fi DNA polymerase [ThermoFisher Scientific] et des amorces *TLR9 clonage 1 sens* et *TLR9 clonage 1 reverse*. La séquence à amplifier contient 62,5% de nucléotide G et C. Les réactifs ajoutés à l'ADN complémentaire pour cette PCR sont du 5X *SuperFI Buffer*, des dNTP à 0,2mM finaux, 0,5µM finaux de chacune des amorces, et 2 unités d'ADN polymérase. Le produit de cette PCR, d'une taille attendue à 3263 pb, est vérifié sur gel d'agarose 1% puis purifié à l'aide du *PureLink PCR purification kit* [ThermoFisher Scientific]. Le programme du thermocycleur commence par une étape de dénaturation à 98°C pendant 30 secondes, suivie de 30 cycles de 10 secondes à 98°C puis 10 secondes à 63°C et 1 minute et 30 secondes à 72°C. La PCR s'est terminée par une phase de 5 minutes à 72°C.

L'insert TLR9 ainsi produit a été sous-cloné dans le vecteur pCR BLUNT II TOPO grâce à l'utilisation du kit *Zero Blunt TOPO PCR cloning kit* [ThermoFisher S.] selon les recommandations du fabricant.

Le produit de ce sous-clonage a alors été amplifié par transformation de cellules One Shot TOP10 chemically competent [ThermoFisher S.] après 10 minutes dans la glace suivies de 30 secondes à 42°C par une nouvelle incubation de 1 minute dans la glace en présence de 250 µL de milieu *Super Optimal* broth complétement avec du glucose (SOC). Le mélange est incubé 1 heure à 37°C sous agitation horizontale à 200 RPM. Les cellules ainsi transformées ont été déposées et cultivées sur boîte de milieu LB contenant 10µg/mL de kanamycine afin de réaliser la sélection des clones effectivement transformés. Au bout de 24 heures à 37°C, les clones ayant poussé ont été criblés. Une taille de 1505 pb est attendue pour le plasmide pCR Blunt-II TOPO contenant l'insert. La PCR de criblage est réalisée en utilisant la GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase [Promega] et le couple d'amorces *TLR9 seq 3* et *M13R* en utilisant le programme suivant au thermocycleur *Techne* : une étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C suivie de 25 cycles d'amplification commençant par 30 secondes à 94°C, puis 30 secondes à 55°C et se terminant par 3 minutes à 72°C. La PCR se termine par 10 minutes à 72°C.

Après sélection des clones contenant l'ORF du TLR9 inséré en sens, le plasmide a été purifié à partir de deux clones grâce au *Qiagen Plasmid Mini Kit* [Qiagen]. Sa concentration et sa pureté ont été vérifiées au nanodrop.

Pour cloner une hémagglutinine en 3' du cDNA du TLR9 :

Pour l'insertion des sites de restriction EcoRI et XhoI de part et d'autre de l'ORF du TLR9, une PCR a été réalisée avec la polymérase *Platinum Super Fi DNA polymerase* [ThermoFisher Scientific] et les amorces TLR9-EcoRI et TLR9-XhoI (cf. tableau récapitulatif). L'emplacement des sites de fixation de ces oligonucléotides sur le plasmide pCR Blunt-II TOPO TLR9 est indiqué sur la figure 32. La nature et la quantité des réactifs utilisés pour cette PCR sont les suivantes : 20µL de tampon 5X Super FI, 0,2mM de dNTP, 0,5µM d'amorce sens et d'amorce anti-sens, 2 unités d'ADN polymérase, 1µL de l'échantillon d'ADN à 10ng/µL et une quantité suffisante d'H₂O pour 100µL (qsp) de volume final. Le programme de la PCR a été le suivant : une dénaturation de 30 secondes à 98°C, suivie de 30 cycles d'amplification de 10 secondes à 98°C puis 10 secondes à 50°C et enfin 1 minute 30 secondes à 72°C. La PCR se termine par 15 minutes à 72°C.

TLR9 seq 3 sens	5'- CTCAGCGGCAATGCACTGG -3'
pcDNA3.1 BGH rev	5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG -3'
M13 forward	5'- CAGGAAACAGCTATGAC - 3'
M13 reverse	5'- GTAAAACGACGGCCAG- 3'
TLR9-EcoRI sens	5'- GTACGAATTCCAGCATGGGTTTCTGCCGC -3'
TLR9-XhoI rev	5'- GTACCTCGAGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTCGGCCGTGG GTCC -3'
TLR9 clonage 1 sens	5' – CCTGTAGCTGCTGTCCAGTC -3'
TLR9 clonage 1 rev	5'- CTGTGTCAGGTGTGGGGTG -3'
pcDNA3.1 T7 sens	5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
pcDNA3.1 BGH rev	5' – TAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'

Tableau 4 : Récapitulatif de l'ensemble des oligonucléotides utilisés

Le produit de la PCR a été analysé après migration 1 heure 30 à 150 volts sur gel d'agarose 1%. D'une taille de 3150 pb, il a été purifié sur gel par découpe puis utilisation du *High pure PCR product purification kit* [Roche Life Science]. Sa quantité et pureté ont été évaluées au nanodrop.

Compte tenu de sa faible quantité, nous avons sous-cloné l'insert purifié dans le pCR Blunt II-TOPO par PCR à l'aide des amorces *TLR9-EcoRI* et *TLR9-XhoI*. De la même manière que précédemment, des cellules *One Shot chemically competent* avant d'être cultivées et sélectionnées sur boîte de milieu LB contenant de la kanamycine. Les clones obtenus ont été criblés à l'aide des oligonucléotides TLR9 seq 3 sens et M13R ; le programme de la PCR consiste en une dénaturation de 10 minutes à 94°C initiale suivie de 25 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 3 minutes d'élongation à 72°C. La PCR se termine par 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont migré sur gel d'acrylamide 1%. Les clones validés ont été cultivés 16 heures à 37°C dans 100 mL de milieu LB liquide contenant de la kanamycine et le plasmide a été purifié à partir d'un clone grâce au kit Qiagen Plasmid Midi Kit [Qiagen].

La bonne insertion du tag hémagglutinine a été vérifiée par séquençage, sur le principe de Sanger. Nous avons utilisé pour cela le kit Big Dye[®] Terminator [Applied Biosystems], à l'aide d'une ou plusieurs amorces en fonction de la longueur de la zone à séquencer souhaitée. Après une dénaturation de 10 minutes à 95°C initiale, 25 cycles comprenant 10 secondes de dénaturation à 95°C, 5 secondes d'hybridation à 50°C et 4 minutes d'élongation à 60°C ont permis la synthèse des produits de séquençage. Une précipitation à l'éthanol est nécessaire afin d'éliminer les nucléotides non incorporés qui pourraient gêner la lecture de la séquence obtenue, lecture réalisée au laboratoire de génétique (U1078).

[Pour obtenir un plasmide pcDNA3.1/Zeo\(+\)-TLR9-HA :](#)

Le TLR9-HA a été transféré du pCR Blunt-II TOPO vers le pcDNA3.1/Zeo(+) par double digestion *XhoI* et *EcoRI* à l'aide des enzymes *Anza 8 XhoI* [ThermoFisher S.] et *Anza 11 EcoRI* [ThermoFisher S.]. Après 15 minutes à 37°C, la réaction est stoppée par inactivation à 80°C pendant 20 minutes. Les contrôles de la ligation du vecteur et de l'insert TLR9 *XhoI-EcoRI* ont été réalisés, c'est-à-dire le vecteur seul coupé ou non, en présence ou non de la ligase et l'insert seul en présence de ligase. Une partie du produit de digestion a été traité à la phosphatase alcaline, puis une étape de ligation a suivie et les produits ont été purifiés par le kit PureLink PCR purification kit [ThermoFisher S.] et le produit de la ligation a été transformé dans des bactéries NovaBlue [Millipore].

Après 1 nuit de culture des bactéries transformées sur boîte de milieu LB, les clones ont été sélectionnés et la vérification du produit de ligation a été réalisée par PCR grâce à l'enzyme GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase [Promega] et aux oligonucléotides TLR9 seq 3 et

pcDNA3.1 BGH reverse. Le programme de cette PCR consiste en une étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C, suivie de 25 cycles d'amplification de 30 secondes à 94°C, puis 30 secondes à 55°C et 1 minute 30 secondes à 72°C. Elle se termine par une phase de 10 minutes à 72°C. La taille attendue est de 1437 pb et le résultat de la PCR analysé sur gel d'agarose 1% apparaît ci-dessous. Les clones validés ont ensuite été cultivés 16 heures à 37°C dans 100mL de milieu LB liquide contenant de l'amoxicilline et le plasmide a été purifié grâce au kit Qiagen Plasmid Midi Kit [Qiagen, 12143], sa quantité a été évaluée au nanodrop et il a été conservé à -80°C. Il est prêt à être utilisé pour transfection transitoire dans des cellules eucaryotes.

POUR L'ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DE FUSION TLR9-HA :

1.33x10⁶ cellules de la lignée HEK293 sontensemencées dans des plaques 6 puits 24 heures avant la transfection. Le jour de la transfection, les cellules entre 70-90% de confluence sont transfectées avec 2,5µg d'ADN par puit à l'aide du kit Lipofectamine[®]3000 [Invitrogen Life Technologies] selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont ensuite incubées pendant 72 heures à 37°C, 5% CO₂. Elles sont enfin récoltées et mises sur glace avant d'être lysées pour en extraire les protéines.

POUR L'ÉTUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DU TLR9-HA PAR MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE :

Les prémonocytes U937 ont été cultivés puis électroporés à l'aide du kit Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit C [Lonza] à partir de 15µg de plasmide dans 200 µL de PBS contenant 10µM de tampon Hepes en utilisant un électroporateur à 250kV, 900µF. Après 36-48 heures de culture après transfection, les cellules ont été utilisées pour l'étude de l'expression et de la localisation du TLR9 par immunofluorescence et Western Blot.

Cytométrie en flux

Pour évaluer la capacité des Ac (Tableau N°x) à cibler de manière spécifique le TLR9 endosomal, des RAMOS et HEK293 ont été récoltées puis marquées selon la procédure standard. La détection du TLR9 endosomal nécessitant une perméabilisation, les cellules sont, dans un premier temps, lavées en PBS puis fixées dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) froid pendant 15 minutes. Les cellules sont à nouveau lavées avec 2mL de tampon de perméabilisation froid contenant du PBS 1X, de l'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*, BSA) 1%, saponine 0.1% et azide 0.01% et reprises dans 50µL ce même tampon pour

réaliser le marquage avec les anticorps fluorescents. Le marquage est réalisé sur glace pendant 30 minutes avec des anticorps en condition saturante, puis les cellules sont lavées au tampon de perméabilisation puis reprises dans 300µL de PBS et analysées au cytomètre.

Pour évaluer la spécificité de nos anticorps anti-TLR9 à marquer leur cible sur des RAMOS, nous avons réalisé une compétition entre chacun de ces anticorps avec 5µM de CpG-B-FITC [Invivogen], ligand activateur du TLR9. Cette compétition est réalisée au moment du pic d'incorporation du CpG-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) mesuré par cinétique. Pour réaliser cette cinétique, les cellules RAMOS sont d'abord lavées 2 fois au PBS puis préincubées 15 minutes à 37°C ou 4°C. 2×10^5 cellules sont ensuite marquées en présence de 3µM de CpG-FITC durant 0, 1, 2, 5, 10, 30 minutes et 1 heure à 4°C ou à 37°C. La fixation du CpG-FITC est bloquée par l'ajout de 1mL de PFA 10% froid sur les cellules qui sont alors placées sur la glace pendant 10 minutes puis lavées au PBS 1X froid. Reprises dans 400µL de PBS, elles sont ensuite analysées au cytomètre Navios [Beckman Coulter].

Microscopie à fluorescence

Pour visualiser la localisation du TLR9-HA, le plasmide est électroporé dans une lignée de prémonocytes U937 exprimant naturellement le TLR9 et donc pourvue des protéines chaperonnes nécessaires à son transit dans la cellule. Après 48 heures de culture post transfection, les cellules U937 sont fixées avec 10µL de PFA10% pendant 10 minutes puis perméabilisées selon le même protocole de marquage intracellulaire que celui utilisé en cytométrie de flux. Lavées après le marquage, elles sont ensuite cytopspinées (1500 RPM pendant 1 minute) sur lame de microscopie, montées entre lame et lamelle avec une goutte de liquide de montage anti-fading Vectashield [Vector laboratories].

Western Blot, fractionnement cellulaire et immunoprécipitations

PREPARATION DES ECHANTILLONS PROTEIQUES ET DES GELS DE POLYACRYLAMIDE

Avant leur lyse, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid. Pour la lyse, un tampon de lyse froid (cf. composition Tableau n°X) fraîchement enrichi par un cocktail d'inhibiteurs de protéases [Sigma Aldrich] est utilisé à raison de 70µL pour 10^6 cellules HEK293, 10µL pour 10^6 cellules RAMOS et XµL pour 10^6 cellules U937, pendant 1h sur la roue en chambre froide.

Détergents ioniques détergent fort : détruit les ponts non-covalents	Détergent non-ioniques Détergent doux : parfait pour les protéines de membrane	Détergent Zwitterionique Adapté à l'électrophorèse bidimensionnelle
Tampon RIPA	Tampon Brij96	Tampon CHAPS
50mM TrisHCl pH=8,0	25mM TrisHCl	<i>Non utilisé</i>
150mM NaCl	150mM NaCl	
1% NP40/0,1% TritonX100	0,5%(w/v) Brij96	
	Tampon Triton X100	
	20mM TrisHCl pH=7,5	
	150mM NaCl	
	1mM EDTA	
	1mM EGTA	
	1% TritonX100	
	2,5mM Na+pyrophosphate	
	1mM glycerophosphate	
	1mM Na+orthovanadate	
	Tampon NP40	
	50mM TrisHCl pH=8,0	
	150mM NaCl	
	1% NP40/0,1% TritonX100	
	antiprotéases cocktail	
	Tampon N-Dodecyl	
	0,1% N-dodecyl	

Tableau 5 : Récapitulatif et composition des tampons de lyse utilisés pour l'extraction protéique

Le lysat est ensuite centrifugé à 20 000g pendant 15 minutes à 15°C. Le surnageant est récupéré et dosé grâce au kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit [ThermoFisher] et congelé à -20°C pour conservation pendant maximum 1 mois. En vue d'une migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 10 à 80µg d'échantillons protéiques (selon les expériences) sont dilués dans un tampon de charge 2X (Tris pH 6,8 125mM, SDS 4%, glycérol 10%, bleu de bromophénol), avec du β-mercaptoéthanol pour les expériences de migration en condition réductrice, et 20 à 40µl du mélange est déposé par puit sur le gel de polyacrylamide.

Pour les migrations en gels de polyacrylamide, un gel de concentration et un gel de séparation sont préparés. Le gel de séparation (Tris 1,5M pH 8,8, SDS 10%, APS, 10% acrylamide, Temed) est coulé le premier. Lorsqu'il est polymérisé, 1cm de gel de concentration (Tris 1M pH 6,8, SDS 10%, APS 10%, 4% acrylamide, Temed) est coulé et un peigne de 10 ou 15 puits (1,5mm d'épaisseur) est placé avant sa polymérisation. A la fin de la polymérisation, le gel de polyacrylamide est placé dans la chambre d'électrophorèse [Biorad] en présence de tampon de migration (Tris Glycine 1X, 0,5% SDS), le peigne est délicatement retiré et les échantillons ainsi qu'une échelle de poids moléculaire (*Precision Plus Protein dual color standards*, Biorad) sont chargés dans les puits.

REALISATION DE L'ELECTROPHORESE, DU TRANSFERT SEMI-SEC ET DU MARQUAGE DE LA MEMBRANE

Les échantillons ont subi une électrophorèse selon la technique du *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*, suivie d'un transfert en milieu semi-sec en présence de tampon de transfert (Tris Glycine 1X, 20% méthanol) sur membrane polyvinylidene difluoride (PVDF) 0,45µm [GE Healthcare] dans un appareil *Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell* [Biorad] grâce au passage d'un courant de 20 Volts, à ampérage fixe pendant 1 heure.

Les membranes ont été saturées en *Tris Buffered Saline (TBS)* 1X, Tween 0,1%, lait écrémé ou BSA 5% (selon les anticorps utilisés) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante, puis lavées 3 fois 5 minutes en TBS 1X, Tween 0,1%. Est réalisée ensuite l'hybridation avec les Ac primaires (cf. tableau n°X) en TBS 1X, Tween 0,1% lait écrémé 1% pendant une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes en TBS 1X, Tween 0,1%, puis les Ac secondaires conjugués à l'enzyme *Horse Radish Peroxidase (HRP)* ou à la biotine (nécessitant le cas échéant une dernière étape d'hybridation avec de la streptavidine-HRP) sont hybridés (cf. tableau n°X). La révélation finale est réalisée après 3 fois 5 minutes de lavage en TBS 1X grâce au réactif ECL Advance [GE Healthcare] et les bandes sont analysées avec le logiciel Quantity One [BioRad].

REALISATION DES IMMUNOPRECIPITATIONS

Pour évaluer la capacité des anticorps anti-TLR9 à immunoprécipiter le TLR9, 50µL de billes Dynabeads® Protein G [Invitrogen] sont utilisées. Les billes lavées sont suspendues délicatement dans 200µL de PBS 1X en présence de 5µg d'Ac pour une incubation pendant 10 minutes à température ambiante sur roue. Après trois lavages avec 400µL de PBS 1X, 500µg d'échantillon protéique sont ajoutés dans un volume total ajusté à 500µL avec du PBS 1X. L'hybridation des protéines est réalisée pendant 2 heures sur roue à température ambiante puis 3 lavages sont réalisés avec le tampon utilisé pour la lyse des cellules. Finalement, l'élution des produits de l'immunoprécipitation est réalisée en ajoutant du tampon de charge (cf. composition plus haut) réducteur et en chauffant les tubes au bain-marie à 95°C pendant 5 minutes.

Spectrométrie de masse

Les échantillons analysés par LC MS ont été séparés sur gels de polyacrylamide colorés au Bleu de Coomassie [Merck Millipore] pendant 1 nuit à température ambiante sous agitation puis décolorés pendant plusieurs heures dans un tampon de décoloration (méthanol 30%, acide acétique 7%). Les bandes ainsi révélées et sélectionnées sont découpées, le gel est digéré à la trypsine par un collaborateur (Sébastien Artigaud, Ingénieur IUEM, Plouzané, France) puis envoyé pour analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*liquid chromatography – mass spectrometry*, LC MS) généreusement réalisée sur le site de Plouzané.

RESULTATS

I. Expression du TLR9 à la surface des LB – hypothèse et résultats préliminaires

Comme vu dans l'introduction, plusieurs études ont mis en évidence la nécessité d'une localisation intracellulaire du TLR9 où un pH acide lui permet de réaliser le clivage de sa partie N-terminale, nécessaire à la transduction de son signal. Cela permet de limiter la reconnaissance d'acides nucléiques du soi et le développement d'une réaction auto-immune. Des travaux ont confirmé cette importance en réalisant des mutations de différentes parties du TLR9 afin de modifier son interaction avec certaines protéines chaperonnes et de forcer sa localisation à la membrane plasmique (Ewald et al., 2008; Mouchess et al., 2011).

Cependant, d'autres études ayant eu recours à l'utilisation d'anticorps anti-TLR9 ont montré la fixation de ces anticorps à la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires : cellules épithéliales de l'estomac (Schmausser et al., 2004), cellules épithéliales de l'intestin (Lee et al., 2006), LB du sang périphérique (Baiyee et al.; Dasari et al., 2005), etc. Dans ces articles, aucune caractérisation de ce TLR9 à la membrane plasmique n'a été réalisée et aucune preuve irréfutable de sa fonctionnalité n'a été apportée.

Au sein de notre laboratoire, une thèse soutenue en 2012 par Thomas Guerrier et dirigée par le Dr Christophe Jamin traite en partie de l'expression du TLR9 à la membrane plasmique des LB humains ainsi que de son caractère fonctionnel. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2014 (Guerrier et al., 2014). Dans cette section, je rapporte leurs résultats, à la base du développement de mon propre travail.

Sur la figure 12A, par cytométrie en flux, les auteurs ont montré un décalage entre les moyennes des intensités de fluorescence (*mean fluorescence intensity*, MFI) de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 et de l'isotype contrôle sur des LB du sang périphérique, du sang de cordon et sur des LB d'amygdales, avant et après perméabilisation. Si le marquage intracellulaire semblait confirmer la présence d'un TLR9 à l'intérieur des cellules, le marquage sur cellules non perméabilisées semblait suggérer l'existence d'un TLR9 à la membrane plasmique de ces mêmes cellules. Sur la figure 12B, le même anticorps a été utilisé en western blot sur des protéines totales obtenues à partir de LB d'amygdales ainsi que sur des protéines de la membrane plasmique obtenues sur les mêmes cellules. Ces protéines de la membrane plasmique ont été isolées par biotinylation des LB non perméabilisés et sélection après lyse cellulaire sur colonne de streptavidine. L'expression des protéines contrôles β -actine, CD20 et de la protéine EEA1 localisée dans les endosomes précoces confirme l'enrichissement en

protéines de la membrane plasmique sur la partie droite de l'image. Les poids moléculaires indiquent la présence de bandes aux tailles attendues. Cette figure confirme donc l'existence d'un TLR9 parmi les protéines de surface des LB.

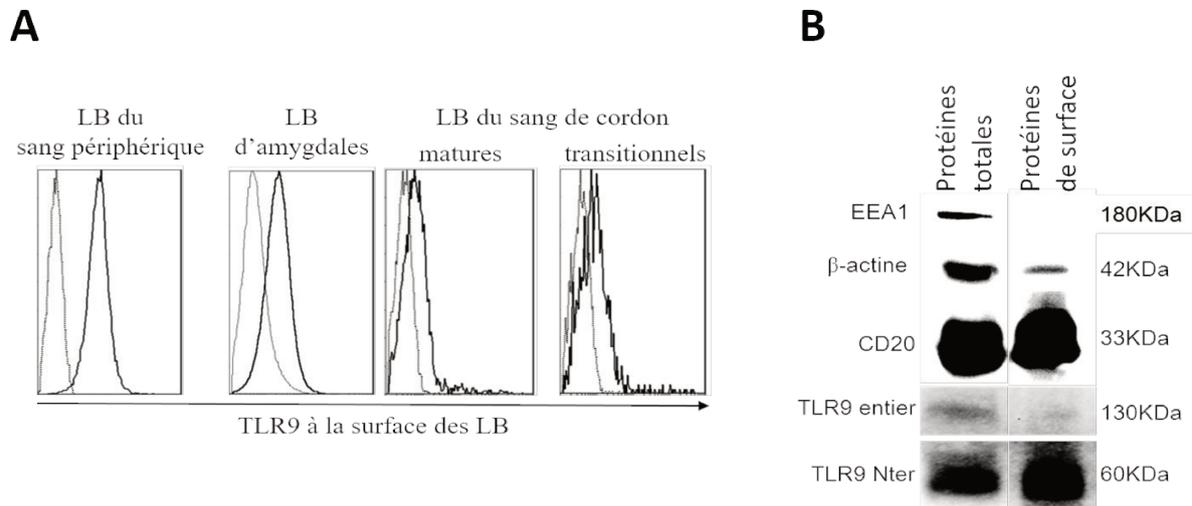


Figure 12 : Expression du TLR9 à la surface des lymphocytes B (LB)

A : Analyse par cytométrie en flux de l'expression du TLR9 à la membrane plasmique des LB du sang périphérique, du sang de cordon et d'amygdales non perméabilisés par l'utilisation de l'anticorps monoclonal de souris 26C593.2. **B** : Etude de l'expression du TLR9 par western blot sur protéines totales et protéines de surface isolées par biotinylation à l'aide du kit *Cell Surface Protein Isolation* (Pierce) (tiré de Guerrier *et al.*, 2014).

Suite à ces observations, des expériences ont été réalisées visant à évaluer le rôle fonctionnel du TLR9 localisé à la membrane plasmique des LB. Dans la littérature, il a été montré que le BCR et le TLR9 sont capables de co-localiser dans des compartiments autophagosome-like, afin de pouvoir réaliser l'hyperactivation des *mitogen-activated protein* (MAP) kinases suite à la stimulation par des Ag contenant des ligands du TLR9 (Chaturvedi *et al.*, 2008). Dans cet article, des anticorps monoclonaux dirigés contre le TLR9 sont utilisés dans des expériences de microscopie à épifluorescence. S'appuyant sur ces informations, Thomas Guerrier a réalisé une isolation des radeaux lipidiques par ultracentrifugation sur gradient de sucrose avant et après stimulation de LB d'amygdales par le BCR, afin de déterminer si le TLR9 de la membrane plasmique et le BCR colocalisent à la surface des LB. Les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans la transduction du signal et permettent une activation efficace des LB en accumulant dans cette zone particulière plusieurs molécules appartenant à des voies de

signalisation (Mañes et al., 2003). La cholératoxine a été utilisée pour sa capacité à se fixer aux radeaux lipidiques *via* le ganglioside GM1. Les résultats de cette expérience sont montrés sur la figure 13A. Dans la fraction 11, enrichie en GM1 et donc en radeaux lipidiques, avant stimulation du BCR, des bandes attendues au poids moléculaire du TLR9 entier et du TLR9 clivé sont obtenus. Après stimulation du BCR, la proportion de la chaîne lourde du BCR a augmenté et la quantité de TLR9 entier y étant retrouvé est elle-même supérieure. Ces résultats sont appuyés d'expériences de microscopie confocale (figure 13B). Utilisant des anticorps dirigés contre l'IgM et le TLR9, associée à de la cholératoxine conjuguée à un fluorochrome, la colocalisation possible du BCR et du TLR9 dans les radeaux lipidiques à la surface des LB d'amygdales est confirmée.

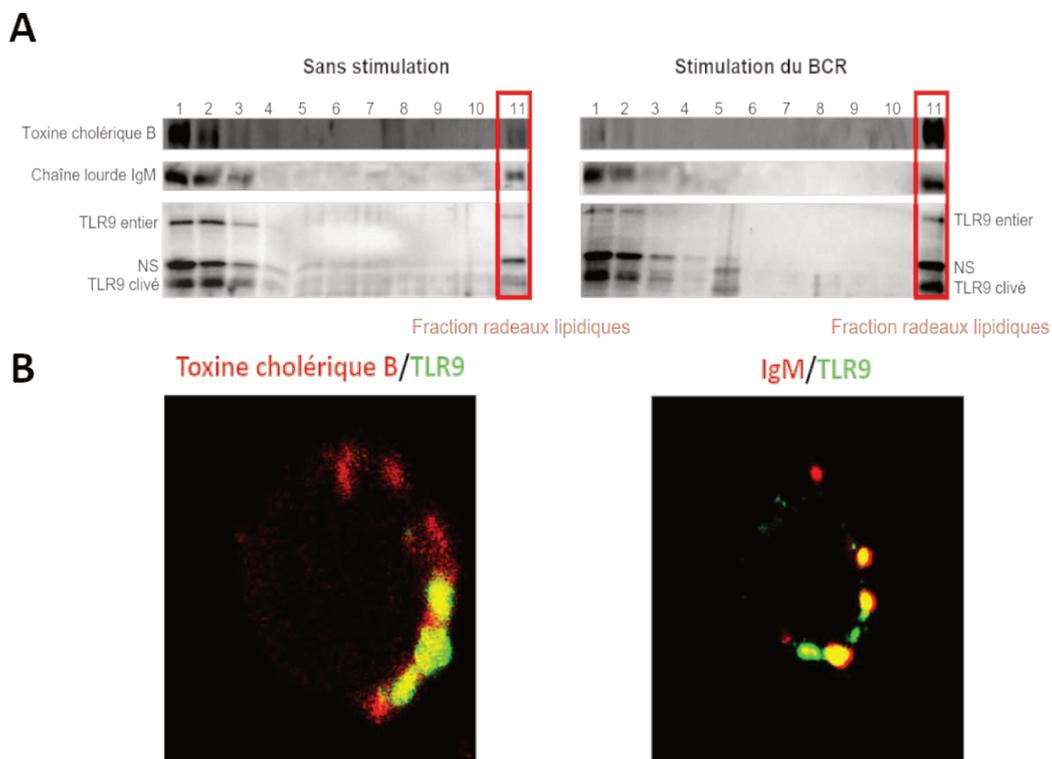


Figure 13 : Mise en évidence d'une colocalisation de la cible de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 et du BCR dans les radeaux lipidiques

A : Des lymphocytes B (LB) d'amygdales ont été stimulés *via* leur IgM de membrane. Les radeaux lipidiques ont ensuite été isolés sur gradients de sucrose et l'expression de TLR9 a été analysée sur les 11 fractions obtenues par Western Blot en utilisant l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2. La présence de ganglioside GM1 révélée par la cholératoxine B permet d'identifier les fractions contenant des radeaux lipidiques. **B** : Sur des LB d'amygdales, des co-marquages anti-TLR9 et toxine cholérique B, puis anti-TLR9 et anti-IgM ont permis de mettre en évidence une colocalisation de la cible de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 et du BCR dans les radeaux lipidiques (tiré de Guerrier *et al.*, 2014).

Les éléments accumulés jusqu'alors indiquent la présence d'un TLR9 à la membrane plasmique des LB susceptible d'induire une signalisation depuis les radeaux lipidiques, en présence du BCR. Reste à savoir si le CpG-ODN, ligand du TLR9 endosomal, est capable ou non de se fixer sur le TLR9 localisé à la membrane plasmique. Pour répondre à cette question, du CpG-FITC a été utilisé dans une expérience de cytométrie de flux qui confirme la fixation de cette molécule à la surface des LB d'amygdales non perméabilisés (Figure 14A).

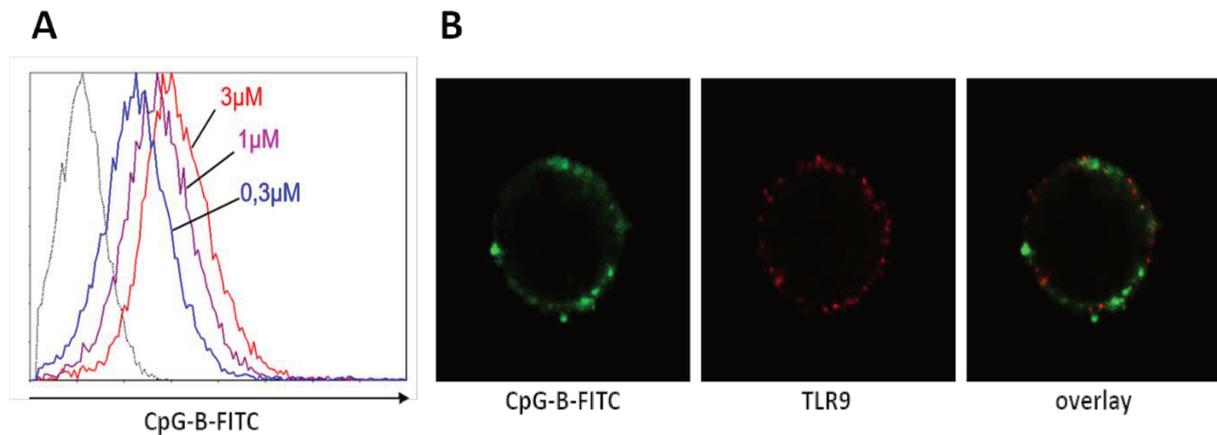


Figure 14 : TLR9 de surface et CpG-ODN de type B

A : Par cytométrie de flux, la capacité des LB d'amygdales à fixer le CpG-ODN de type B à leur surface a été confirmée en utilisant plusieurs doses, dont la dose de 3 μ M qui est saturante. **B :** Sur des LB d'amygdales de cellules non perméabilisées, des co-marquages anti-TLR9 et CpG-ODN de type B ont été réalisés. Il a ainsi été montré que la cible de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris (26C593.2) et le CpG-ODN de type B ne colocalisent pas.

Par microscopie, il a ensuite été montré que le CpG-ODN utilisé ne colocalise pas avec la cible de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 à la membrane plasmique des LB d'amygdales, suggérant ainsi que ce TLR9 n'est pas capable de lier son ligand (Figure 14B). Ce résultat arrive en contradiction avec les résultats de l'article de l'équipe de Grégory Barton (Mouchess et al., 2011). Dans cette étude, la localisation du TLR9 est étudiée grâce à la construction de protéines associées à un tag ainsi que grâce à la génération de mutations dans sa partie transmembranaire de ces protéines taguées. Aucun anticorps anti-TLR9 n'est alors utilisé. Les auteurs montrent que, lorsque la partie transmembranaire du TLR9 est mutée, ce récepteur est bloqué à la membrane plasmique où il reconnaît son ligand et d'où il induit une réponse inflammatoire létale.

Thomas Guerrier a ensuite cherché à savoir si le *crosslink* du TLR9 de surface a un effet sur l'activation des LB d'amygdales en culture *in vitro*. Pour répondre à cette question, il utilise un coating avec des anticorps anti-IgG de souris ou de rat dilués à 10µg/mL dans du tampon carbonate à pH=9 et incubés pendant une nuit à 4°C dans les puits d'une plaque de culture cellulaire à 96 puits. Après lavages, les anticorps anti-TLR9 monoclonaux de souris (26C593.2) ou de rat (eB72-1665) à 10µg/mL sont incubés pendant 1 heure à 37°C. Après des lavages supplémentaires, les LB isolés à partir d'amygdales sont incubés pendant 24 heures en présence ou non de CpG-ODN de type B à 0,25µM dans ces puits.

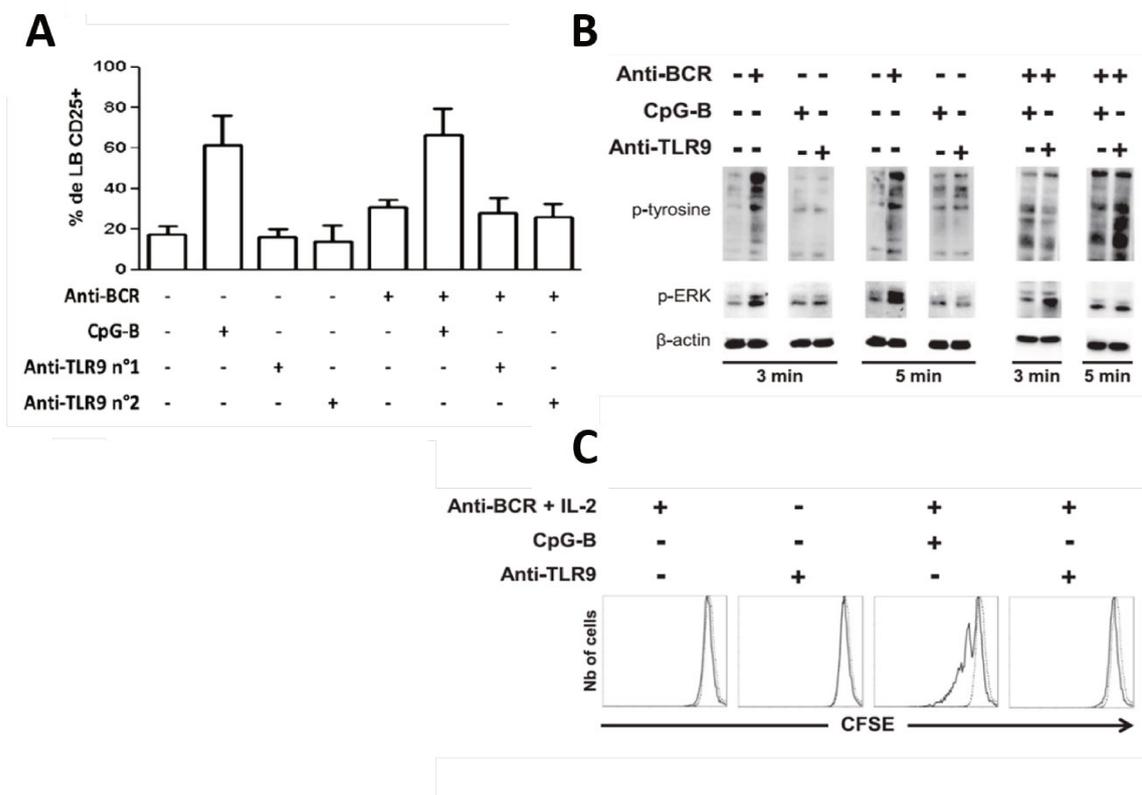


Figure 15 : L'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris n'induit pas les mêmes effets fonctionnels que le CpG-ODN de type B

A : Pourcentage de lymphocytes B (LB) CD25⁺ après stimulation des cellules *in vitro* avec un anticorps anti-BCR et/ou du CpG-ODN, l'anticorps anti-TLR9 26C593.2 ou l'anticorps anti-TLR9 eB72-1665. **B** : Western Blot sur protéines totales extraites de LB stimulés par un anticorps anti-BCR et/ou du CpG-ODN de type B et/ou l'anticorps anti-TLR9 26C593.2, et révélées avec des anticorps anti-phospho-tyrosine, anti-phospho-ERK et anti-Bêta-actine. **C** : Mesure de la prolifération par cytométrie en flux des LB stimulés avec un anticorps anti-BCR en présence d'IL2 et/ou du CpG-ODN de type B et/ou l'anticorps anti-TLR9 26C593.2.

Les résultats présentés figure 15A indiquent que le *crosslink* des deux anticorps monoclonaux n'a pas d'effet sur l'expression du marqueur d'activation CD25 des LB. Il est en revanche intéressant de noter que le *crosslink* des deux anticorps monoclonaux inhibe partiellement l'augmentation du pourcentage de LB CD25⁺ induite par l'addition de CpG-ODN de type B.

Afin de déterminer si le TLR9 à la membrane plasmique joue un rôle de co-récepteur du BCR, le niveau de phosphorylation *d'extracellular signal-regulated kinase* (ERK) et des tyrosines appartenant à la voie de signalisation MAP kinase, en aval du BCR a été évalué. Les résultats sont présentés sur la figure 15B ci-dessus. La co-stimulation pendant 5 minutes du BCR et du TLR9 endosomal avec le CpG-ODN de type B ne permet pas de changement net de la phosphorylation des tyrosines ou de la kinase ERK. Cependant l'ajout de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 permet une augmentation de la phosphorylation des tyrosines mais non de ERK. Les conséquences de cette signalisation sur la réponse proliférative des LB ont été mesurées (Figure 15C ci-dessus). Si la co-stimulation du BCR par un anticorps anti-BCR, de l'IL2 et du TLR9 endosomal *via* le CpG-ODN de type B permet une forte induction de la prolifération des LB *in vitro*, la stimulation du BCR en présence d'IL2 et de l'anticorps anti-TLR9 ne permet pas d'induction de la prolifération.

Pour terminer, l'effet d'une stimulation concomitante du TLR9 endosomal à l'aide de CpG de type B et du TLR9 plasmique à l'aide d'anticorps anti-TLR9 a été étudié en regardant l'activation des LB d'amygdales ainsi que leur prolifération. Les résultats apparaissent sur la figure 16 ci-dessous.

Le CpG-ODN de type B induit une forte augmentation de l'activation des LB (figure 16A). Cette activation est significativement inhibée par l'utilisation de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris (26C593.2). De même, cet anticorps anti-TLR9 26C593.2 inhibe la prolifération des LB stimulés en culture par un anticorps anti-BCR, de l'IL2 et le CpG-ODN de type B (figure 16B et 16C).

C'est à la lumière de l'ensemble de ces informations que l'hypothèse de l'existence d'un TLR9 de surface est née. Bien que le mode de fonctionnement, activateur ou inhibiteur, de cet anticorps ne soit pas connu, il a été suggéré qu'il bloquait l'activation des LB ainsi que leur prolifération induite par la stimulation synergique du BCR et du TLR9 endosomal, en présence d'IL2.

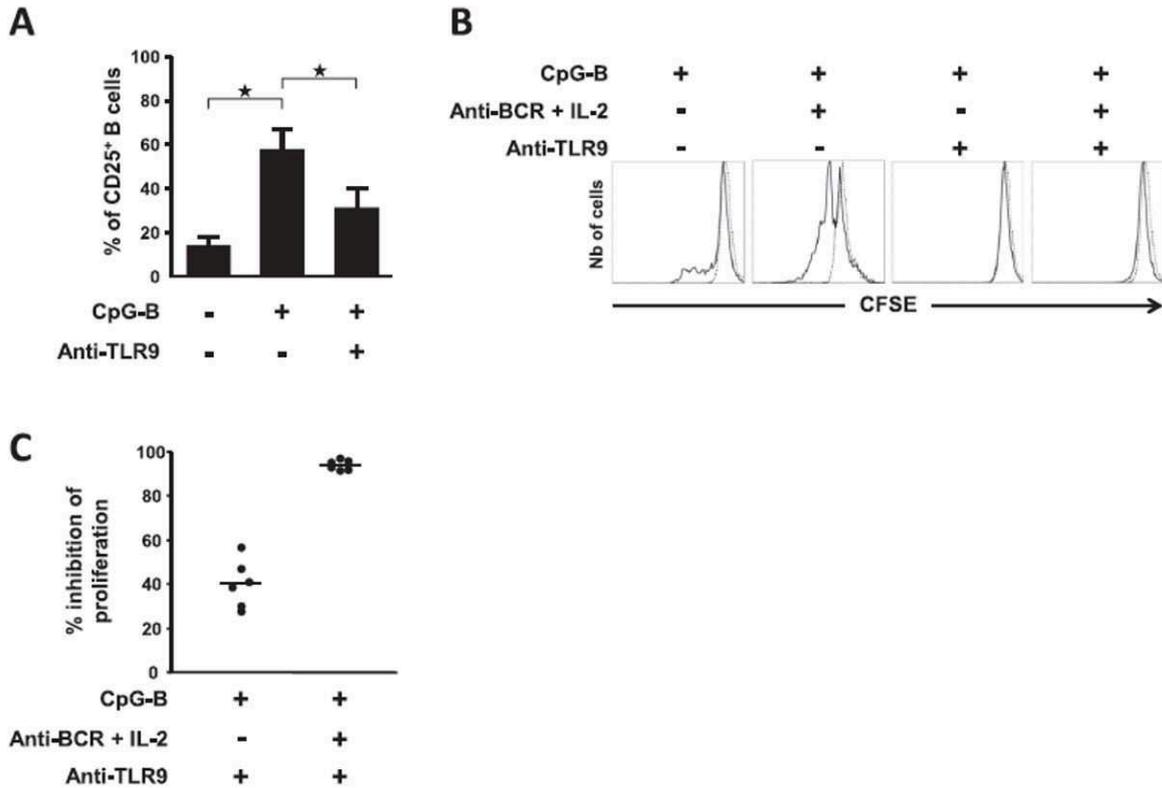


Figure 16 : L'anticorps anti-TLR9 26C593.2 monoclonal de souris bloque l'effet du CpG-ODN de type B sur l'activation des lymphocytes B (LB) d'amygdales

A : Pourcentage de LB CD25⁺ après stimulation *in vitro* par du CpG-ODN de type B et/ou l'anticorps anti-TLR9 26C593.2. **B** : Mesure de la prolifération par cytométrie en flux des LB stimulés avec un anticorps anti-BCR en présence d'IL2 et/ou du CpG-ODN de type B et/ou l'anticorps anti-TLR9 26C593.2. **C** : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LB stimulés par du CpG-ODN de type B en présence d'anticorps anti-TLR9, ou anticorps anti-TLR9 et anticorps anti-BCR et IL2.

De plus, les données de la littérature ayant conforté les observations de notre équipe, à savoir qu'une stimulation des LB par leur BCR et par les TLR est indispensable à l'induction de LB au caractère régulateur (Barr et al., 2007; Harris et al., 2000, 2005; Lampropoulou et al., 2008b), il a été question, au courant de ma thèse, d'étudier le rôle du TLR9 de surface dans le contrôle de l'induction des LB_{reg}. Dans le contexte de maladies auto-immunes telles que le LES où l'induction de LB_{reg} n'est pas possible, cette question est d'autant plus intéressante.

Dans les sections suivantes, je présenterai mes résultats. Ils mettent en évidence les problèmes d'aspécificité des anticorps commerciaux dirigés contre le TLR9. Par soucis de clarté, je présenterai ces résultats dans l'ordre chronologique de leur production.

II. Analyse quantitative de l'expression des ARNm du TLR9

Le *TLR9* est un gène préférentiellement exprimé par les cellules du SI et principalement par les cellules présentatrices d'antigène. Chez l'Homme, on le retrouve dans les pDC mais également dans les LB (figure 17 ; d'après Genevisible.com). A partir de lignées cellulaires humaines et de LB et LT primaires humains, nous avons confirmé son expression préférentielle dans les cellules du système immunitaire. Des analyses quantitatives d'expression du transcrite de TLR9 par RTqPCR (Figure 18) montrent que les cellules monocytaires U937 sont celles qui expriment le plus de transcrite du gène *TLR9*. Les LB RAMOS (négatives pour le virus d'Epstein-Barr) ont la seconde plus forte expression, et les DAUDI la troisième. Les DAUDI correspondent à des préB (stade développemental antérieur aux LB naïfs ou activés retrouvés dans les centres germinatifs) expriment respectivement 2,5 fois plus de transcrits TLR9 que les LB primaires. Les LT produisent des niveaux très bas de transcrits TLR9, environ 9,5 fois moins que les LB. A l'inverse, dans les lignées de cellules rénales HEK293 et de cellules épithéliales HSG, les transcrits de ce récepteur ne sont pas détectables.

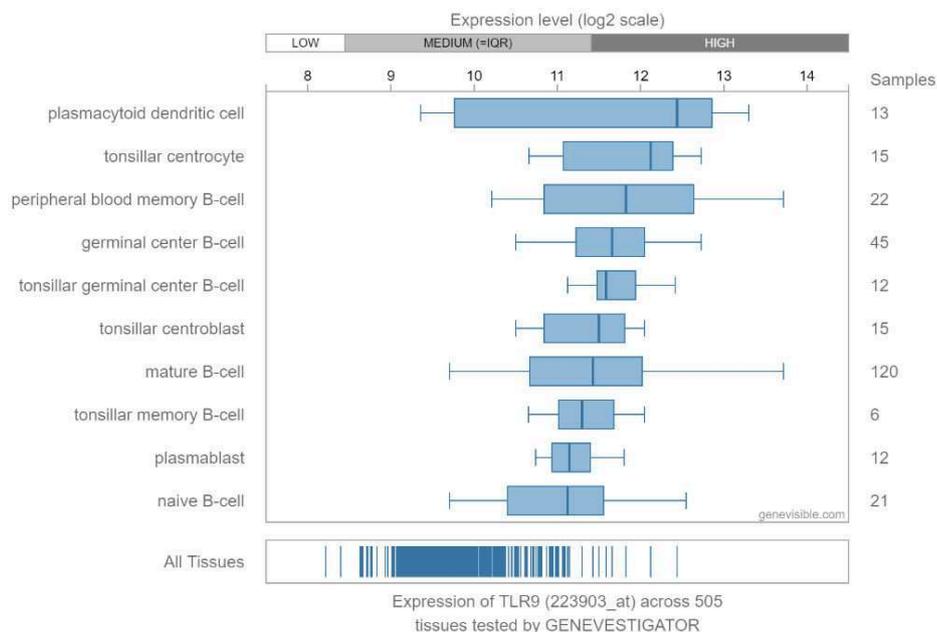


Figure 17 : Niveaux d'expression des ARNm du TLR9 par différents types cellulaires d'après Genevisible.com

Ces cellules serviront de contrôle négatif pour la suite des expériences et la détection de la protéine TLR9.

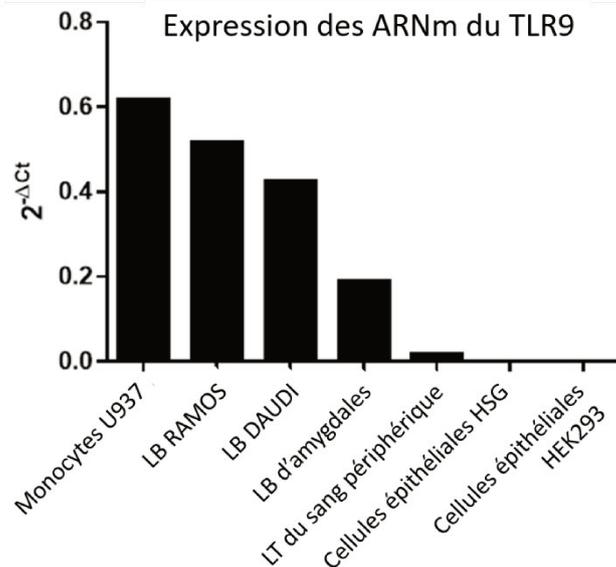


Figure 18 : Analyse quantitative de l'expression des ARNm du TLR9.

Expression des ARNm du TLR9 par les Lymphocytes B (LB) et Lymphocytes T (LT) primaires humains et les lignées cellulaires de LB (RAMOS et DAUDI), HEK293, HSG, et la lignée monocyttaire U937 par rapport au gène RPL13A de référence

III. Cytométrie en flux

Nous avons souhaité mettre au point les marquages de cytométrie en flux en déterminant les quantités optimales d'anticorps anti-TLR9 à utiliser et évaluer le niveau d'expression de TLR9 de surface et de TLR9 total à l'aide de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris (26C593.2) couplé à un fluorochrome FITC.

Ces expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur des TMC, population hétérogène de lymphocytes contenant une majorité de LB et environ 20% de LT. Plusieurs expériences de cytométrie en flux ont été réalisées afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats et selon les recommandations des fournisseurs d'anticorps. Une figure représentative apparaît ci-dessous.

La figure 19 présente un exemple représentatif de résultats de marquages réalisés sans perméabilisation des TMC, et correspondant donc le marquage membranaire (figure 19A), et de marquages réalisés après perméabilisation (figure 19B) représentant donc l'expression totale intracellulaire et membranaire de TLR9.

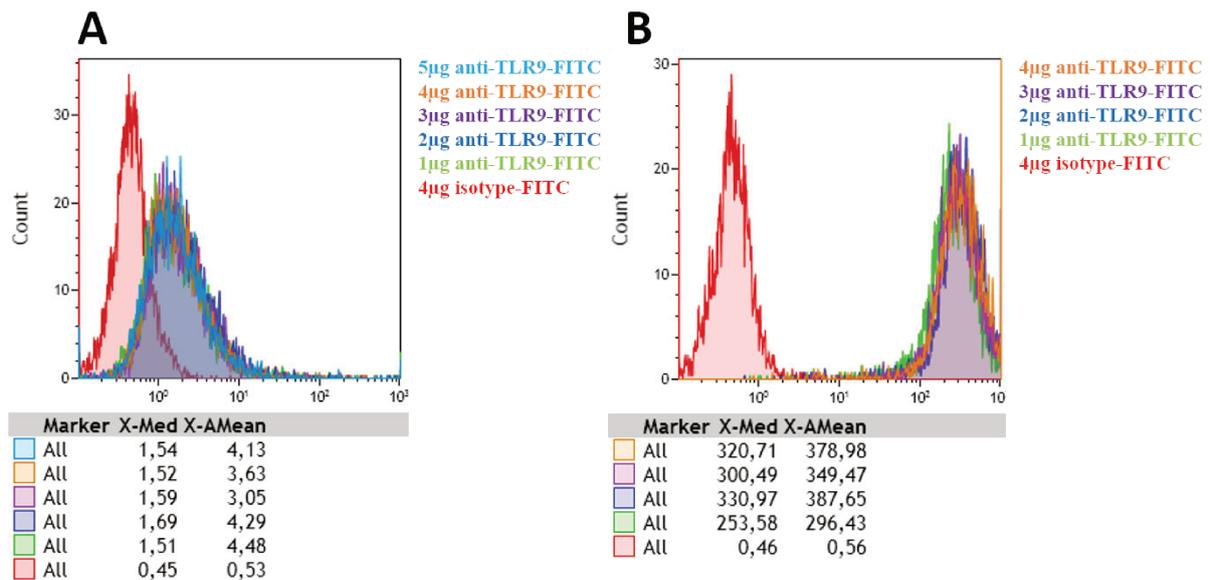


Figure 19 : Analyse par cytométrie de flux d'un marquage de cellules mononuclées d'amygdales par un anticorps anti-TLR9

Après extraction, 1×10^6 cellules mononuclées d'amygdales (*tonsil mononuclear cells*, TMC) ont été utilisées pour chaque condition. **A** : Marquage membranaire sur cellules vivantes non fixées et non perméabilisées, avec l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris (26C593.2) à plusieurs doses. **B** : Les mêmes marquages ont été réalisés sur TMC fixées puis perméabilisées. Les profils rouges correspondent aux marquages réalisés avec l'anticorps isotypique-FITC.

A l'instar des résultats obtenus par Thomas Guerrier, nous constatons un marquage net de l'anticorps qui se dégage de celui de l'isotype sur cellules perméabilisées comme sur cellules non perméabilisées. Cependant, nous avons été surpris de n'observer qu'un seul pic homogène de fluorescence, à la membrane plasmique comme en intracellulaire. Comme vu précédemment, les LT humains n'expriment que très faiblement l'ARNm du TLR9.

En toute logique, nous aurions donc dû obtenir qu'un pic de MFI faible associé à l'expression du TLR9 par les LT, et un pic de MFI plus fort correspondant à l'expression du TLR9 des LB. Ce lot d'anticorps étant concentré à $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, nous avons réalisé des marquages avec plusieurs doses, dans le but de voir si la saturation des cibles de l'anticorps était bien obtenue. Nous observons que l'on obtient cette saturation dès $1 \mu\text{g}$ d'anticorps. Sur les cellules perméabilisées (figure 19B), nous observons une forte augmentation de l'intensité de fluorescence dès $1 \mu\text{g}$ d'anticorps utilisé. De la même manière que pour le marquage membranaire, un seul pic se dégage, indiquant que les LT sont autant ciblés par l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris

(26C593.2) que les LB. Ces résultats suggèrent que les LT expriment la protéine TLR9 malgré la quasi-absence d'ARNm, ou bien mettent en évidence une aspécificité de l'anticorps anti-TLR9.

Les mêmes expériences de cytométrie ont été réalisées sur des cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral Mononuclear Blood Cells*, PBMC) en utilisant un kit commercial de fixation et de perméabilisation, afin de s'assurer que ni la source cellulaire, ni la technique ne sont responsables de ce possible défaut de spécificité. Cette fois, un anticorps anti-TLR9 monoclonal de rat eB72-1665 a été utilisé afin d'optimiser nos chances de détecter un signal spécifique.

Les résultats nous montrent un accrochage de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de rat eB72-1665 équivalent sur chacune des populations cellulaires en surface (figure 20A) et en intracellulaire (figure 20B), indiqué par une fluorescence plus importante que pour l'isotype. La fixation de l'anticorps est équivalente entre les différents types cellulaires. Même si les monocytes semblent davantage ciblés par l'anti-TLR9, ils le sont également par l'isotype. Cela suggère un problème de spécificité de l'anticorps.

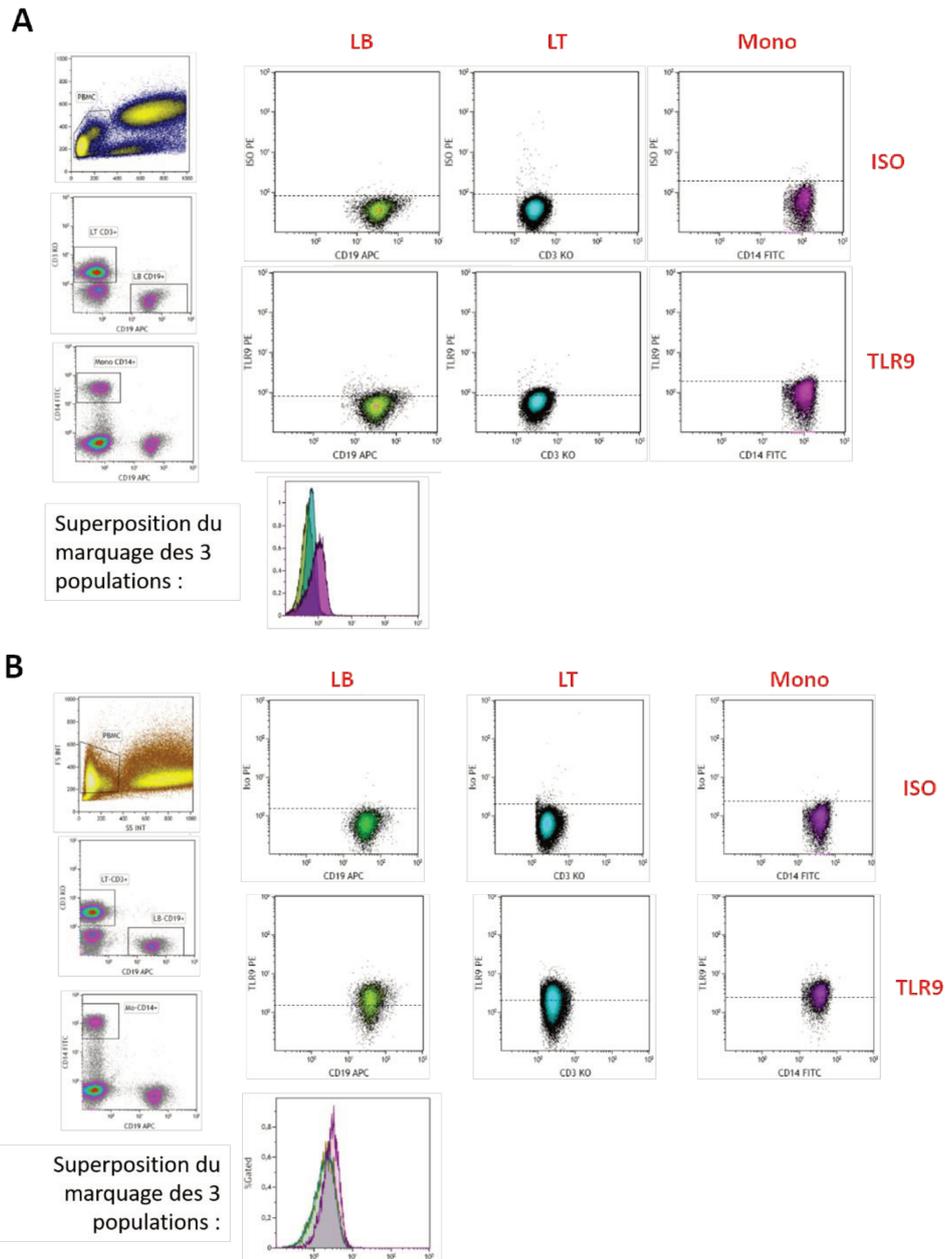


Figure 20 : Evaluation de l'expression totale du TLR9 sur les différentes populations cellulaires du sang périphérique

Après isolement, 1×10^6 cellules mononucléées du sang périphérique ont été marquées avec les anticorps anti-CD19-AlloPhycoCyanine (APC), anti-CD3-Krome Orange (KO) et anti-CD14-Fluoresceine IsoThioCyanate (FITC). La stratégie de gating nous permet d'identifier les lymphocytes B (LB) $CD19^+$, les lymphocytes T (LT) $CD3^+$ et les monocytes (Mono) $CD14^+$. **A** : Sans perméabilisation, un marquage à l'aide de l'anti-TLR9-PE 26C593.2 en conditions saturantes permet d'évaluer l'expression de surface. **B** : Après fixation et perméabilisation, le marquage avec l'anticorps anti-TLR9-PE permet d'évaluer l'expression totale du TLR9 (de surface et intra-cellulaire). Un anticorps isotypique couplé à une PE sert de contrôle négatif de la fixation (une expérience représentative sur 5).

Dans le but d'accroître nos chances de cibler le TLR9 de manière spécifique, nous nous sommes procuré plusieurs autres anticorps anti-TLR9, dont deux anticorps monoclonaux produits chez la souris (clone 1E4) et chez le rat (clone eB72-1665), ainsi que deux anticorps polyclonaux produits chez le lapin et chez le mouton. Nous avons choisi ces anticorps en fonction de la zone antigénique qu'ils reconnaissent sur le TLR9, de manière à couvrir l'ensemble de la protéine. Les informations relatives à ces anticorps apparaissent dans le tableau ci-dessous.

Antigène	Clonalité	Espèce	Companie	Isotype	Référence	Lot	Epitope	Immunisation	Recommandé pour ...
TLR9 humain	polyclonal	Mouton	R&D	IgG	AF3658	Plusieurs lots ont été testés	a.a 64-189	TLR9 recombinant humain produit dans E.coli	Cytométrie en flux ; IHC ; CyTOF-ready
		Lapin	Santa Cruz	IgG	sc-25468		a.a 771-870	?	WB ; IP ; IHC ; ELISA
	monoclonal	souris	Novus Biologicals (clone 26C593.2)	IgG1 kappa	NBP2-24729		a.a 268-300	peptide synthétique correspondant aux a.a 268-300 du TLR9 humain	WB ; ELISA ; Cytométrie en flux ; étude fonctionnelle ; ICC ; IHC ; IP
		rat	eBiosciences /thermofisher (clone eB72-1665)	IgG2 kappa	14-9099-82		a.a 273-288	"avec une portion du TLR9 humain" (a.a 273-288)	cytométrie en flux
		souris	Interchim/Abnova (clone 1E4)	IgG2 kappa	H00054106-M07		a.a 370-473	TLR9 humain recombinant entier avec un tag GST (26kDa seul)	ELISA ; WB-Re

Tableau 6 : Récapitulatif des informations relatives aux anticorps anti-TLR9 utilisés

Les anticorps sont recommandés par les fabricants pour la cytométrie en flux, l'immunohistochimie (IHC), l'immunocytochimie (ICC), l'immunoprécipitation (IP), ou le Western Blot (WB), et sont dirigés contre des séquences d'acides aminés (a.a) précises. Leurs clonalités, leurs isotypes et l'espèce animale par laquelle ils sont produits sont précisés dans le tableau.

Les anticorps monoclonaux de rat eB72-1665 et de souris 26C593.2, et l'anticorps polyclonal de mouton sont produits et conseillés pour une utilisation en cytométrie en flux. Ils sont couplés commercialement à des fluorochromes prévus pour cette utilisation. L'anticorps monoclonal de souris 1E4 et l'anticorps polyclonal de lapin n'étant pas disponibles sous une forme directement couplée, nous avons eu recours à l'utilisation d'un anticorps secondaire dirigés contre eux et directement couplé à des fluorochromes. Pour ces anticorps, un contrôle consistant au marquage par l'anticorps secondaire seul a été réalisé. Il est indiqué par les courbes grises dans les figures ci-dessous. Nous avons réalisé des marquages simples sur des cellules perméabilisées de la

lignée B RAMOS, sur des LT du sang périphérique fraîchement isolés et sur des cellules de la lignée de rein HEK293. Le but était de comparer les différents anticorps quant à leur capacité à distinguer les cellules exprimant fortement le TLR9 total (intracellulaire et de surface) des cellules l'exprimant plus faiblement ou ne l'exprimant pas du tout. Les résultats sont présentés dans la figure 21 et résumés dans le tableau 7. Les protocoles de cytométrie étant différents, il ne faudra prêter attention qu'aux ratios de MFI obtenus.

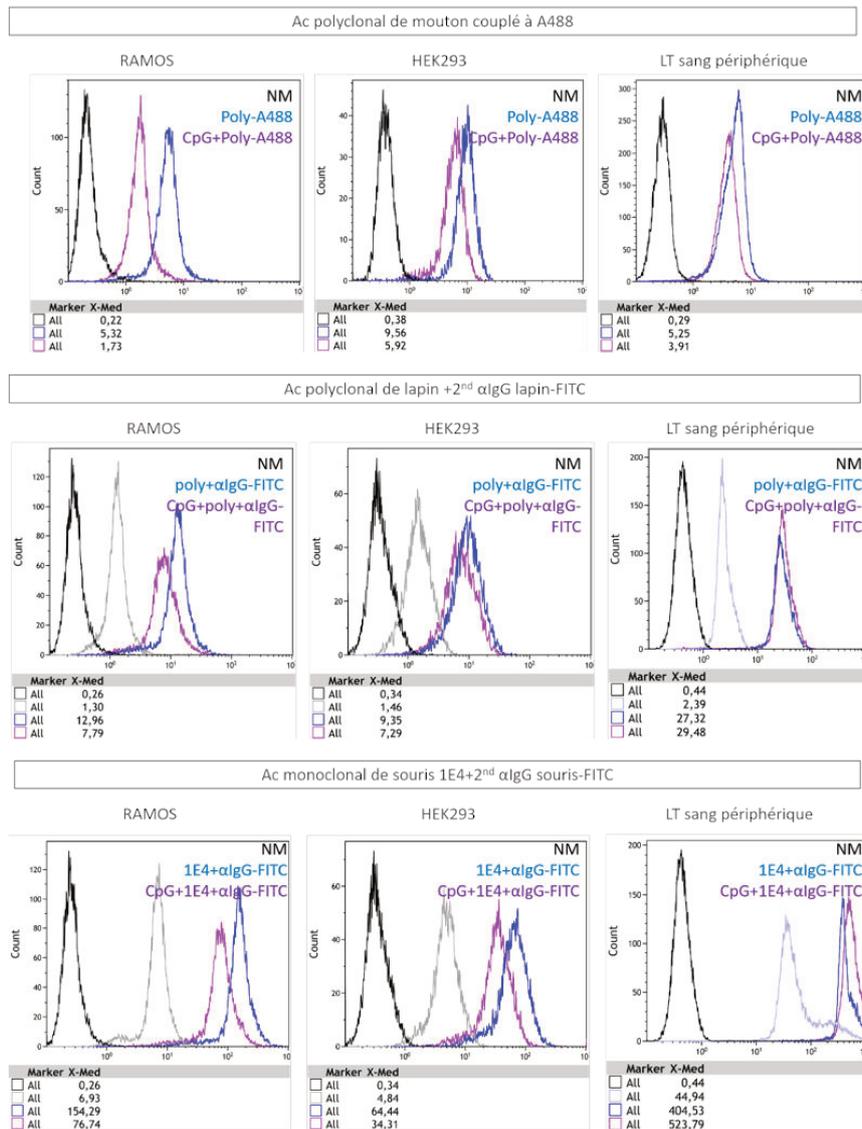


Figure 21 : Marquages intracellulaires simples des cinq anticorps anti-TLR9 en cytométrie en flux sur les lymphocytes B RAMOS, les cellules rénales HEK293 et lymphocytes T (LT) du sang périphérique.

Après lavage au PBS, 1×10^6 cellules ont été fixées à la PFA 4% puis perméabilisées à l'aide d'un tampon contenant 1% de BSA, 0,1% de saponine et 0,01% d'azide. Les anticorps ont été incubés pendant 30 minutes sur glace puis lavés avant passage au cytomètre. **En noir**, la fluorescence de cellules non marquées (NM) par les anticorps (contrôle négatif), **en bleu**, la fluorescence de l'anticorps anti-TLR9 utilisé. **En violet**, la fluorescence lorsque les cellules ont été saturées avec $3 \mu\text{M}$ de CpG avant d'être lavées puis marquées avec l'anticorps anti-TLR9. Profils représentatifs de 5 expériences.

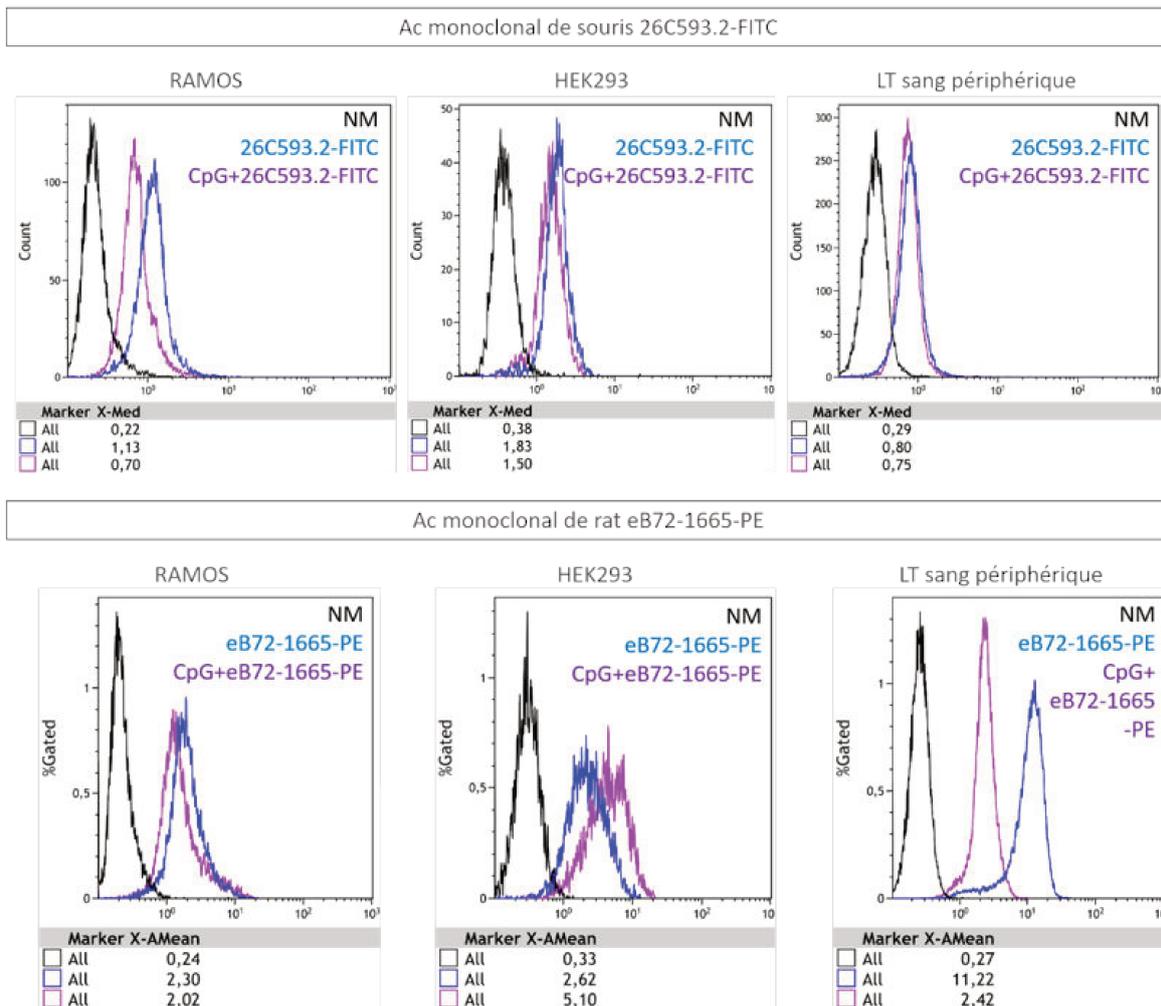


Figure 21 : Marquages intracellulaires simples des cinq anticorps anti-TLR9 en cytométrie en flux sur les lymphocytes B RAMOS, les cellules rénales HEK293 et lymphocytes T (LT) du sang périphérique (suite).

Une fluorescence est détectée avec les cinq anticorps anti-TLR9 sur les trois types cellulaires. Les MFI mesurées indiquent une fixation plus importante de chacun de ces cinq anticorps sur les cellules rénales HEK293, une fixation moindre sur les cellules B RAMOS et enfin une fixation plus faible sur les LT excepté pour l'anticorps eB72-1665 qui se fixe très fortement (Tableau 7). Au regard de l'expression de l'ARN messenger du TLR9, ces résultats suggèrent une fixation non spécifique des cinq anticorps anti-TLR9 dans les cellules HEK293 et dans les LT, et par conséquent ne permettent pas d'affirmer la spécificité des signaux détectés dans les cellules B RAMOS. Globalement, les résultats nous indiquent que l'ensemble des anticorps anti-TLR9 utilisés dans cette expérience, dont certains sont conseillés pour une utilisation en

cytométrie de flux, ne permettent pas de distinguer les cellules n'exprimant pas le TLR9 des cellules exprimant cette protéine. Cela renforce l'idée de leur spécificité.

Souhaitant évaluer la part de fixation spécifique des anticorps dans les cellules RAMOS, nous avons réalisé des expériences de compétition avec du CpG dont la concentration saturante de fixation a été déterminée dans des expériences préalables avec du CpG conjugué à la FITC. Nous avons ainsi fixé et perméabilisé les cellules, puis les avons incubées avec 3µM de CpG non conjugué. Après lavage, les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-TLR9 conjugués à la FITC ou à l'A488 et analysées au cytomètre en flux (Figure 21). La pré-incubation des cellules avec du CpG permet de diminuer la fluorescence dans les cellules RAMOS pour les quatre anticorps anti-TLR9 sans l'empêcher complètement. En revanche, les marquages des LT ne sont pas affectés et restent au même niveau, tandis que ceux des cellules HEK293 sont plus intenses (tableau 7).

Anticorps anti-TLR9	Intensité moyenne de fluorescence (<i>Mean Fluorescence Intensity</i> , MFI)					
	Lignée lymphocytaire B RAMOS		Lymphocytes T		Lignée HEK293	
	- Saturation CpG	+Saturation CpG	- Saturation CpG	+Saturation CpG	- Saturation CpG	+Saturation CpG
Monoclonal souris 26C593.2	1.13	0.7	1.83	1.5	0.8	0.75
Monoclonal souris 1E4	154.29	76.74	64.44	34.31	404.53	523.79
Polyclonal mouton	5.32	1.73	9.56	5.92	5.25	3.9
Monoclonal rat eB72-1665	2.3	2.02	2.62	5.1	11.22	2.42
Polyclonal lapin	12.96	7.79	9.35	7.29	27.32	29.48

Tableau 7 : Intensité moyenne de fluorescence des anticorps anti-TLR9 avec ou sans saturation des cellules par 3µM de CpG.

Ces résultats nous invitent à penser que la fixation des anticorps anti-TLR9 dans les cellules B RAMOS est sensible au TLR9, mais non spécifique puisque les anticorps reconnaissent au moins partiellement également une autre cible. En revanche, la persistance d'une fixation indépendante de la présence de la protéine TLR9 dans les LT et dans les cellules HEK293, confirme une reconnaissance non spécifique des anticorps anti-TLR9. L'ensemble des informations collectées en cytométrie de flux ont été récapitulées dans le tableau ci-dessous.

IV. Western Blot – Extraits protéiques totaux

S'agissant d'une protéine transmembranaire faiblement exprimée et principalement localisée dans des endosomes intracellulaires, isoler le TLR9 peut constituer un défi particulier. Sa caractérisation à la membrane plasmique, ainsi que l'identification des molécules de sa voie de signalisation nécessitent cependant son isolation et son étude par des techniques de protéomique telles que le Western Blot et l'immunoprécipitation. Dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer le poids moléculaire des cibles des anticorps anti-TLR9 et le comparer à celui attendu de la protéine TLR9. De par la littérature et d'après sa séquence, une bande à 160 kDa correspondant à une forme complète glycosylée du TLR9 est susceptible d'être identifiée. La forme complète non glycosylée devrait générer une bande vers 113 kDa, tandis que la forme clivée devrait être détectée à la taille de 60 kDa.

Nous avons réalisé des expériences de Western Blot en utilisant différents tampons de lyse aux propriétés chimiques variées. Ces propriétés intrinsèques varient en fonction de la température et du pH, c'est pourquoi la composition des tampons de lyse est adaptée en fonction du détergent choisi. En biologie, les détergents sont communément utilisés pour rompre la membrane plasmique de nature lipidique en formant des micelles dans un milieu aqueux (émulsion), et permettent ainsi la libération de protéines solubles ou liées à des membranes, de nature lipidiques. Le détergent doit être choisi en fonction de l'utilisation que l'on souhaite en faire. Il existe quatre grandes familles de détergents définies en fonction de la forme de leur groupe hydrophilique.

- Anioniques : détergents forts, qui modifient la structure de la protéine en réduisant les ponts non-covalents
 - Tampon « RIPA »
 - 1% Triton X100 ou 0,1% NP-40
 - 50mM de TrisHCl à pH=8,0
 - 150mM NaCl
- Cationiques : propriétés similaires aux détergents anioniques
- Non-ioniques : détergents doux qui dénaturent moins les protéines. Ils ne détruisent pas les ponts protéine-protéine, et sont donc particulièrement adaptés à l'étude de la structure native des protéines ainsi que de leur fonctionnalité (enzymes). On les utilise notamment pour la réalisation d'immunoprécipitations et de co-immunoprécipitations
 - Tampon Brij96

- Tampon Triton X100
- Tampon NP40
- Tampon N-dodecyl
- Zwitterioniques : ils ont des caractéristiques ioniques et non-ioniques à la fois. Ils sont moins dénaturants que les détergents ioniques et ont une charge neutre, similaire aux détergents non ioniques. Ils sont plus efficaces pour rompre les ponts protéine-protéine et réduire l'agrégation. Ils sont souvent utilisés pour les techniques de chromatographie, de spectrométrie de masse ou encore d'électrophorèse bi-dimensionnelle.
 - Ex : tampon CHAPS

La composition des différents tampons de lyse que nous avons utilisés apparaît dans la partie Matériel et Méthodes de la thèse (tableau 5).

Les lysats obtenus des cellules B RAMOS et des cellules rénales HEK293 ont été centrifugés à haute vitesse (10 000g) et les surnageants récoltés puis dosés par colorimétrie à l'aide d'un kit BCA. La même quantité protéique (40µg) a été déposée sur chaque piste du gel de polyacrylamide. Après transfert, les membranes de PVDF ont été incubées avec chacun des 5 anticorps anti-TLR9 testés. Les résultats sont présentés figure 22 et sont résumés dans le tableau 8. Nos expériences de Western Blot ont été mises au point en faisant varier les quantités de protéines déposées sur les gels, la nature dénaturante ou non des gels, le type de saturation des membranes PVDF, la concentration des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la révélation ainsi que les temps d'exposition pour la révélation par chimioluminescence.

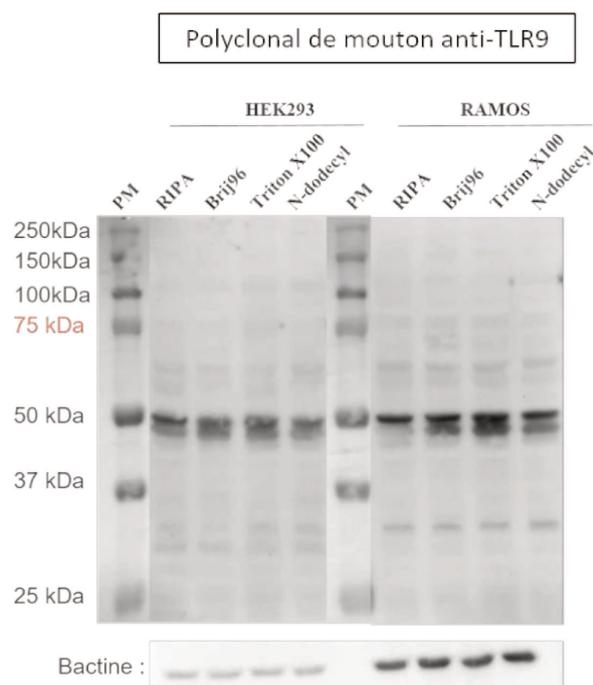


Figure 22 : Western Blot sur extraits protéiques totaux de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293

Des cellules de la lignée B RAMOS et de la lignée rénale HEK293 ont été lysées à l'aide de plusieurs tampons de lyse aux propriétés détergentes différentes. 40µg de protéines ont été déposés sur chaque piste. Les anticorps anti-TLR9 monoclonaux de souris, de rat, polyclonaux de mouton et de lapin, révélés par des anti-IgG couplés à de l'HRP ont été utilisés. La détection de la protéine bêta actine a également été réalisée après ReBlot des membranes.

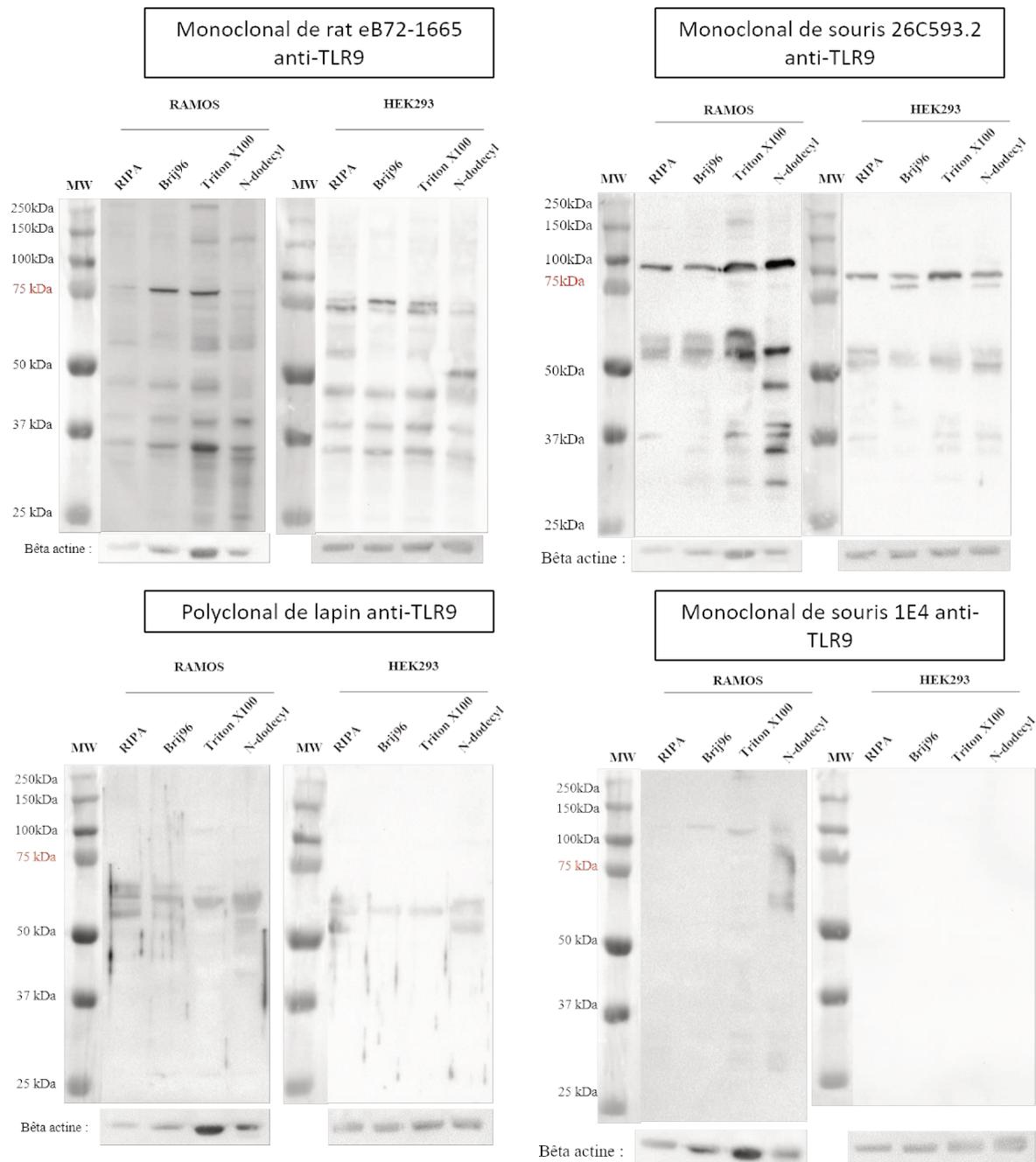


Figure 22 : Western Blot sur extraits protéiques totaux de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293 (suite).

Des protéines de poids moléculaires identiques et donc non spécifiques de la protéine TLR9 sont détectées dans les lysats protéiques des cellules RAMOS et des cellules HEK293 avec tous les anticorps excepté l'anticorps monoclonal de souris 1E4. L'anticorps monoclonal de souris 1E4 (épitope 370-473) détecte spécifiquement une bande à 60 kDa dans les cellules B RAMOS

lorsque les protéines sont extraites avec le tampon N-dodecyl, une bande à 110 kDa lorsque les protéines sont extraites avec les tampons Brij96, Triton X100 et N-dodecyl, mais ne détecte pas de forme à 160 kDa quel que soit le tampon de lyse utilisé. L'anticorps monoclonal de souris 26C593.2 (épitope 268-300) détecte seulement une bande à 160 kDa lorsque les protéines sont extraites avec le tampon Triton X100. L'anticorps monoclonal de rat eB72-1665 (épitope 273-288) détecte une faible bande à 110 kDa et une bande nette à 145 kDa dans le lysat de protéines extraites avec les tampons Triton X100 et N-dodecyl. L'anticorps polyclonal de lapin (épitope 771-870) détecte spécifiquement dans les cellules B RAMOS une bande à 60 kDa lorsque les protéines sont extraites avec le tampon Brij96, et plus faiblement avec les autres tampons.

L'ensemble des résultats sont résumés dans le tableau 8.

Anticorps anti-TLR9	Protéines non spécifiques				Forme clivée du TLR9 60 kDa			
	Tampon RIPA	Tampon Brij 96	Tampon Triton X100	Tampon N Dodecyl	Tampon RIPA	Tampon Brij 96	Tampon Triton X100	Tampon N Dodecyl
Monoclonal souris 1E4	non	non	non	non	non	non	non	OUI
Monoclonal souris 26C593.2	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non
Monoclonal rat eB72-1665	oui	oui	oui	oui	non	non	oui	OUI
Polyclonal de lapin	oui	oui	oui	oui	OUI	oui	oui	oui
Polyclonal de mouton	oui	oui	oui	oui	non	non	non	non

Anticorps anti-TLR9	TLR9 entier 110 kDa				TLR9 glycosylé 160 kDa			
	Tampon RIPA	Tampon Brij 96	Tampon Triton X100	Tampon N Dodecyl	Tampon RIPA	Tampon Brij 96	Tampon Triton X100	Tampon N Dodecyl
Monoclonal souris 1E4	non	OUI	OUI	OUI	non	non	non	non
Monoclonal souris 26C593.2	non	non	non	non	non	non	OUI	non
Monoclonal rat eB72-1665	non	non	oui	non	oui	oui	non	non
Polyclonal de lapin	non	non	non	non	non	non	non	non
Polyclonal de mouton	non	non	non	non	non	non	non	non

Tableau 8 : Récapitulatif des bandes détectées par Western Blot à l'aide des différents anticorps anti-TLR9 par comparaison des extraits de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293.

Etant donnée la difficulté à obtenir une bande correspondant au TLR9 complet, nous avons réalisé un western blot avec un dépôt de 100µg, 150µg et 200µg de protéines par piste, afin de vérifier si la bande d'intérêt apparaît en utilisant une très forte quantité de protéine à partir de protéines totales extraites de cellules de lignée B RAMOS lysées à l'aide du tampon de lyse Triton X-100. Les résultats sont présentés sur la figure 23 ci-dessous.

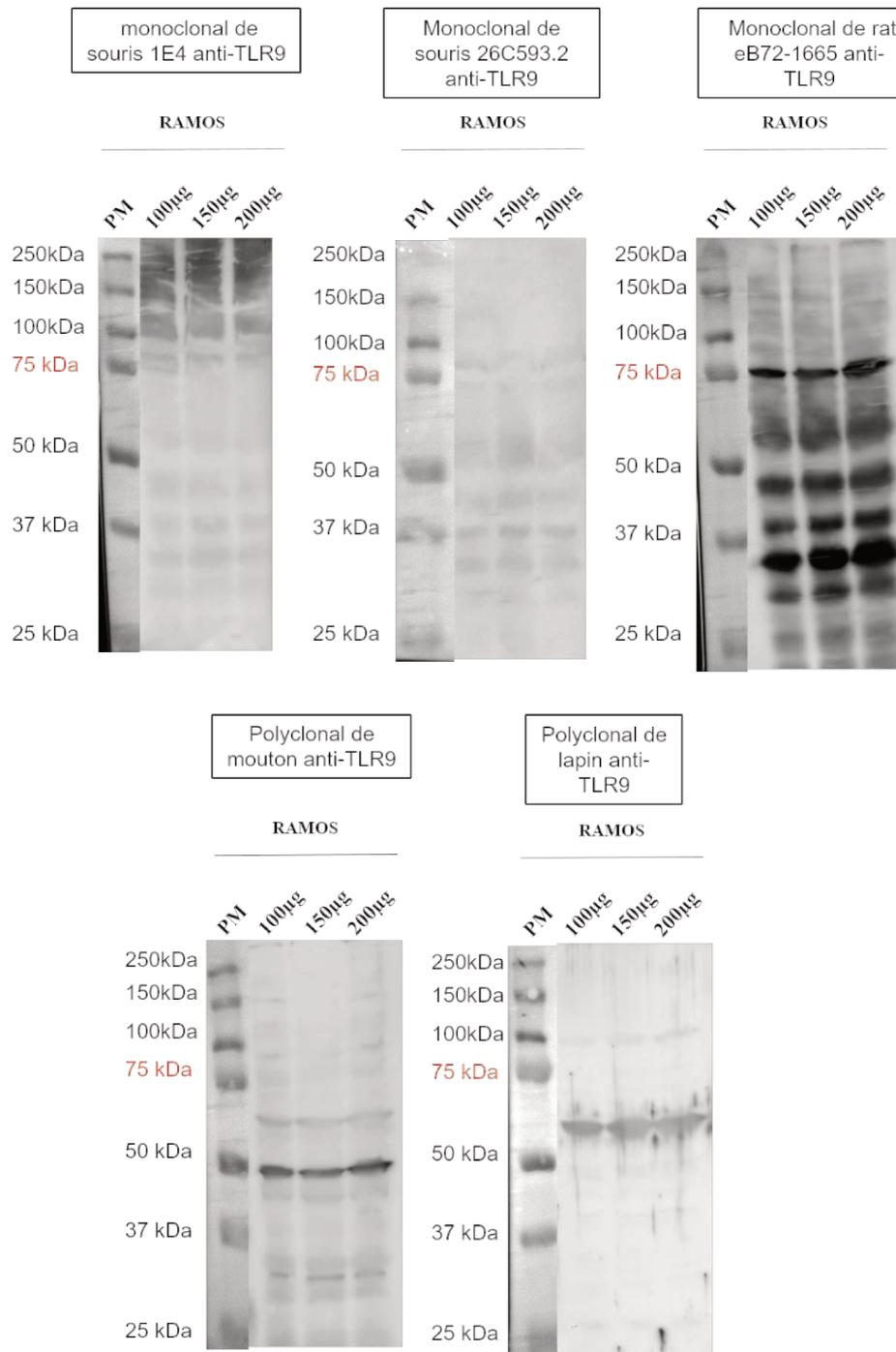


Figure 23 : Western Blot sur 100µg, 150µg et 200µg d'extraits protéiques totaux sur cellules B RAMOS (n=1)

Les résultats nous montrent que, bien que la quantité de protéine déposée sur le gel soit très importante, aucune bande correspondant à celle du TLR9 n'est obtenue.

V. WB – Fractions protéiques

Après avoir mis en évidence une fixation des anticorps anti-TLR9 sur la membrane plasmique des LB, suggérant la présence du TLR9 à la surface de ces cellules (Guerrier et al., J Autoimmun, 2014), nous avons également observé que la fixation du CpG à la surface des LB est indépendante de la cible reconnue par les anticorps anti-TLR9.

Afin de caractériser cette cible et de vérifier s'il s'agit bien de la présence de TLR9 à la surface des LB, nous avons séparé en fonction de leur localisation les extraits protéiques des cellules de la lignée B RAMOS grâce à l'utilisation d'un kit de fractionnement cellulaire. Les contrôles confirment l'enrichissement attendu dans chaque fraction à l'issue du fractionnement (Figure 24). La GAPDH est détectée dans la fraction F1 enrichie en protéines du cytosol mais pas dans la fraction F2 enrichie en protéines de membranes. La fraction F3 contient bien les protéines nucléaires histone H3, qui ne sont pas détectées dans la fraction F4 enrichie en protéines du cytosquelette. Deux bandes équivalentes révélées par un anticorps anti-CD20 sont détectées dans l'extrait de protéines totales et dans la fraction F2 confirmant l'enrichissement en protéine membranaire dans cette fraction (Figure 24).

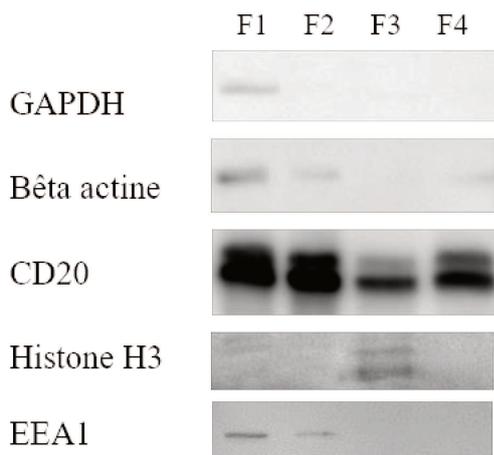


Figure 24 : Vérification de l'enrichissement dans chaque fraction cellulaire

Enrichissement en protéines cytosoliques dans la fraction F1 (présence de GAPDH), en protéines membranaires dans la fraction F2 (présence de CD20), en protéines nucléaires dans la fraction F3 (présence d'histone H3) et en protéines du cytosquelette dans la fraction F4 (pas de présence de GAPDH, CD20 ou histone H3).

L'objectif de cette expérience est donc de chercher à détecter la présence du TLR9 dans la fraction F2. Les protéines des extraits totaux et les protéines de la fraction F2 ont été transférées sur membranes de PVDF après migration et incubées en présence des clones anti-TLR9 26C593.2 et eB72-1665 ainsi qu'avec les anticorps polyclonaux de lapin et de mouton (Figure 25).

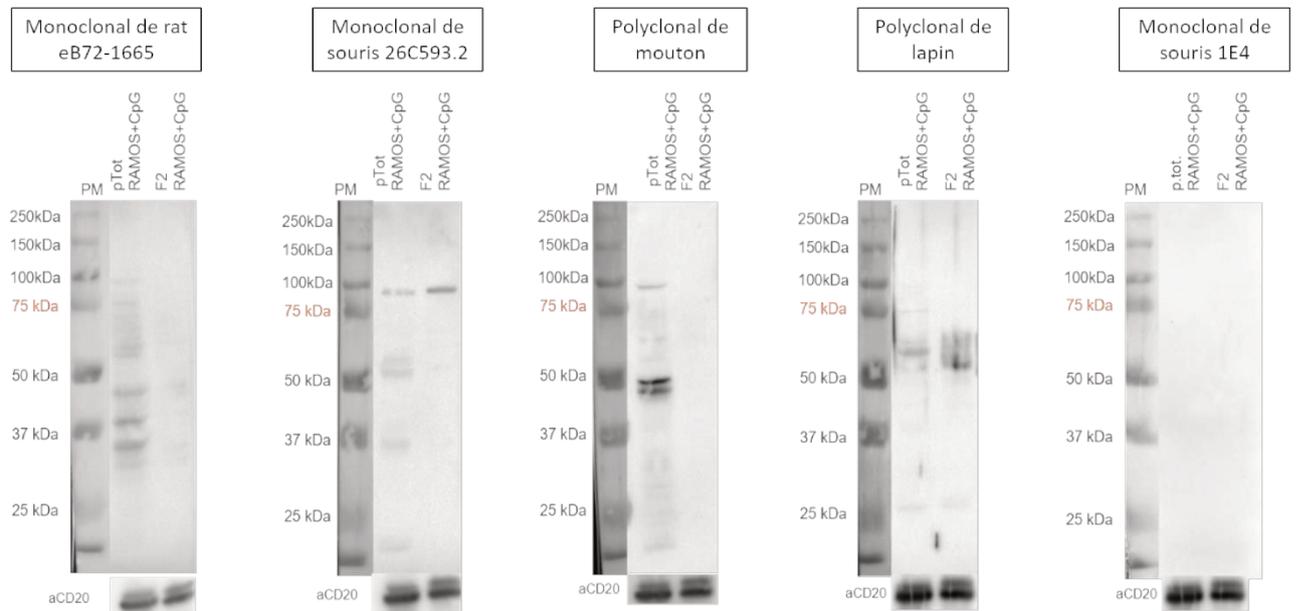


Figure 25 : Présence de la protéine TLR9 dans la membrane plasmique des lymphocytes B.

Des cellules de la lignée B RAMOS ont été lysées à l'aide d'un tampon NP40 et les extraits protéiques fractionnés à l'aide d'un kit de fractionnement commercial. La détection de la protéine TLR9 dans les extraits protéiques totaux et la fraction F2 a été réalisée à l'aide de différents anticorps anti-TLR9 révélés par des anti-IgG couplés à de l'HRP. La détection de la protéine CD20 sert de contrôle positif.

Le clone de souris 26C593.2 détecte une protéine unique d'environ 100 kDa, de même taille que celle détectée dans l'extrait de protéines totales. Le clone de rat eB72-1665 détecte faiblement cette protéine dans l'extrait de protéines totales mais pas dans la fraction F2. L'anticorps polyclonal de lapin ne détecte cette protéine ni dans l'extrait total ni dans la fraction F2, tandis que le clone de souris 1E4 ne détecte rien. Enfin, l'anticorps polyclonal de mouton la détecte dans l'extrait de protéines total mais pas dans la fraction F2. Bien que le poids moléculaire soit légèrement plus faible que celui attendu, ces résultats suggèrent que la protéine TLR9 complète non glycosylée est présente à la membrane des cellules B RAMOS. Cependant, sa reconnaissance ne semble possible qu'avec l'anticorps monoclonal 26C593.2 (figure 25).

VI. Immunoprécipitations totales et membranaires

Le Western Blot est une technique nécessitant l'extraction des protéines et leur migration, dans notre cas, en condition dénaturante. Bien que nous ayons utilisé plusieurs clones d'anticorps afin de maximiser nos chances de reconnaissance en ciblant des antigènes différents sur le TLR9, cette technique influe sur la structure tridimensionnelle des protéines. Linéarisées, celles-ci deviennent alors potentiellement moins reconnaissables requérant un repliement particulier pour la reconnaissance par les anticorps.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à savoir si les clones d'anticorps anti-TLR9 sont capables de reconnaître la protéine par immunoprécipitation (figure 26). Pour cela, nous avons procédé à partir de LB d'amygdale sur lesquels nous avons réalisé une immunoprécipitation sur protéines totales. Dans cette expérience, les protéines ne sont pas en conditions dénaturantes.

Nous avons également réalisé une immunoprécipitation à partir d'une extraction des protéines totales de cellules B RAMOS et de cellules rénales HEK293 à l'aide du tampon de lyse Brij96 (Tableau 2). Comme vu précédemment, le tampon de lyse Brij96 est doux et particulièrement conseillé pour l'extraction de protéines de membrane. Ces protéines ont ensuite été immunoprécipitées avec 5µg de chacun des différents anticorps anti-TLR9 couplés par une préincubation à des billes magnétiques auxquels ils se fixent *via* une interaction avec une protéine G. Les protéines retenues par les anticorps anti-TLR9 ont été éluées puis séparées en fonction de leurs poids moléculaires sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante et réductrice, puis révélées au Bleu de Coomassie. Les résultats sont présentés sur la figure 26 ci-dessous.

D'après la séquence d'acides aminés de la protéine TLR9, des bandes aux tailles de 113-160kDa pour les formes complète et glycosylée sont attendues, tandis que la présence du fragment clivé N terminal de la protéine TLR9 correspond à une bande à la taille de 60 kDa (Guerrier T, J Autoimmunity, 2014 ; Park B, Nat Immunol, 2008 ; Ewald SE, Nature 2008). Des bandes de différents poids moléculaire ne correspondant pas aux tailles attendues sont observés dans les immunoprécipitats de cellules B RAMOS et dans ceux des cellules HEK293 avec tous les anticorps. Parmi les tailles attendues révélées spécifiquement dans les immunoprécipitats de cellules B RAMOS, l'anticorps 1E4 (épitope 370-473) et, plus faiblement, l'anticorps 26C593.2 (épitope 268-300) immunoprécipitent une bande à 160 kDa et une bande à 110 kDa (figure 26).

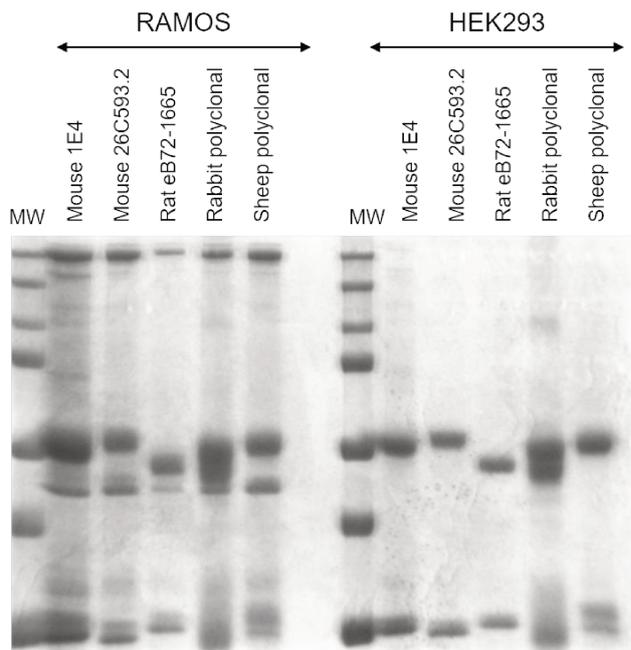


Figure 26 : Immunoprécipitation par les anticorps anti-TLR9.

Des cellules de la lignée B RAMOS et de la lignée rénale HEK293 ont été lysées à l'aide du tampon Brij96. Les protéines ont été immunoprécipitées avec les différents anticorps anti-TLR9 à l'aide de billes de protéines G. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées sur un gel de polyacrylamide et révélées au Bleu de Coomassie. Exemple représentatif de 4 expériences.

L'anticorps eB72-1665 (épitope 273-288) n'immunoprécipite aucune bande spécifique. Une faible bande à 160 kDa est immunoprécipitée avec le polyclonal de lapin (épitope 771-870). Le polyclonal de mouton (épitope 64-189) immunoprécipite une faible bande à 160 kDa et une autre à 110 kDa. Ces bandes pourraient correspondre aux formes complète et glycosylée, alors que le fragment clivé N terminal de la protéine TLR9 ne semble pas être immunoprécipité.

Par spectrométrie de masse, nous avons pu analyser les bandes immunoprécipitées par l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 pour lequel un effet activateur sur les LB en culture a été constaté. Bien qu'un bruit de fond ait masqué la présence des protéines les plus faiblement immunoprécipitées, il a été constaté que l'anticorps fixe très fortement de l'actine, ainsi que les histones H1.3 et H1.5. Il immunoprécipite également la protéine Grp78 (ou Hsp5). Aucune trace du TLR9 n'a été détectée.

VII. Clonage moléculaire – réalisation de la protéine de fusion TLR9-hémagglutinine (HA) en C-terminal

Afin de disposer d'un contrôle positif alternatif pour nos expériences, nous avons créé une protéine de fusion TLR9 taguée par une hémagglutinine (HA). Pour cela, la séquence d'un tag

HA a été clonée en C-terminal de l'ORF du gène du TLR9 humain dans un plasmide pcDNA3.1 Zeo(+). Les étapes de la réalisation de cette protéine taguée sont présentées ci-dessous.

POUR OBTENIR LA SEQUENCE D'ADN COMPLEMENTAIRE DE L'ARNM DU TLR9 HUMAIN [NM_017442] :

10^7 LB d'amygdales humains ont été isolés puis purifiés. Les résultats de la purification de ces cellules apparaissent sur la figure 27 ci-dessous.

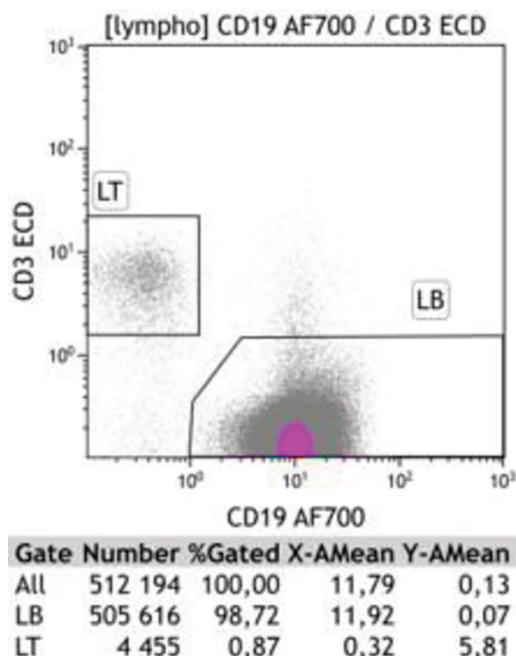


Figure 27 : Evaluation de la pureté des lymphocytes B (LB) d'amygdales humains par cytométrie en flux

Les lymphocytes B d'amygdales humains sont purs à 98,72%. Seuls 0,87% de lymphocytes T sont contaminants.

Les ARN totaux de ces LB ont été extraits et analysés au bioanalyseur 2100 (RIN=9,90). Les résultats apparaissent sur la figure 28 ci-dessous. La concentration obtenue est de 252ng/ μ L.

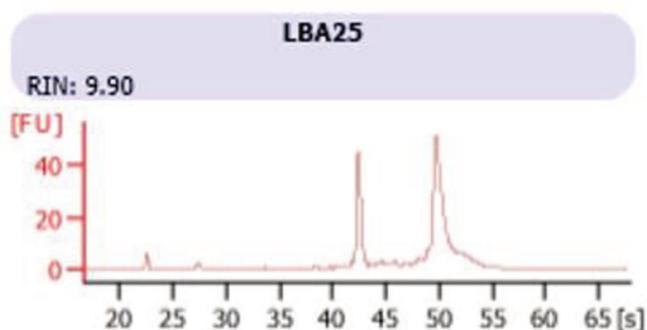


Figure 28 : Evaluation au bioanalyseur de la qualité et de la quantité d'ARN messagers extraits de LB d'amygdales

Une transcription inverse en ADN complémentaire a été réalisée à l'aide de la superscript III RT à partir de 2 µg d'ARN totaux.

Le succès de cette rétrotranscription a été vérifié par PCR (figure 29).

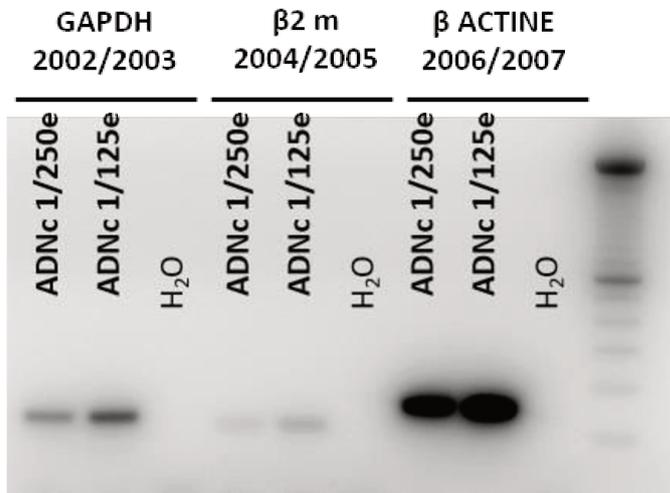


Figure 29 : Produits de PCR réalisée pour vérifier la présence des gènes de la GAPDH, de la $\beta 2$ microglobuline ou de la β actine dans l'ADN complémentaire obtenu après rétrotranscription des ARNm de LB d'amygdales humaines.

La sélection de l'ORF du TLR9 humain a été réalisée grâce à une PCR d'amplification.

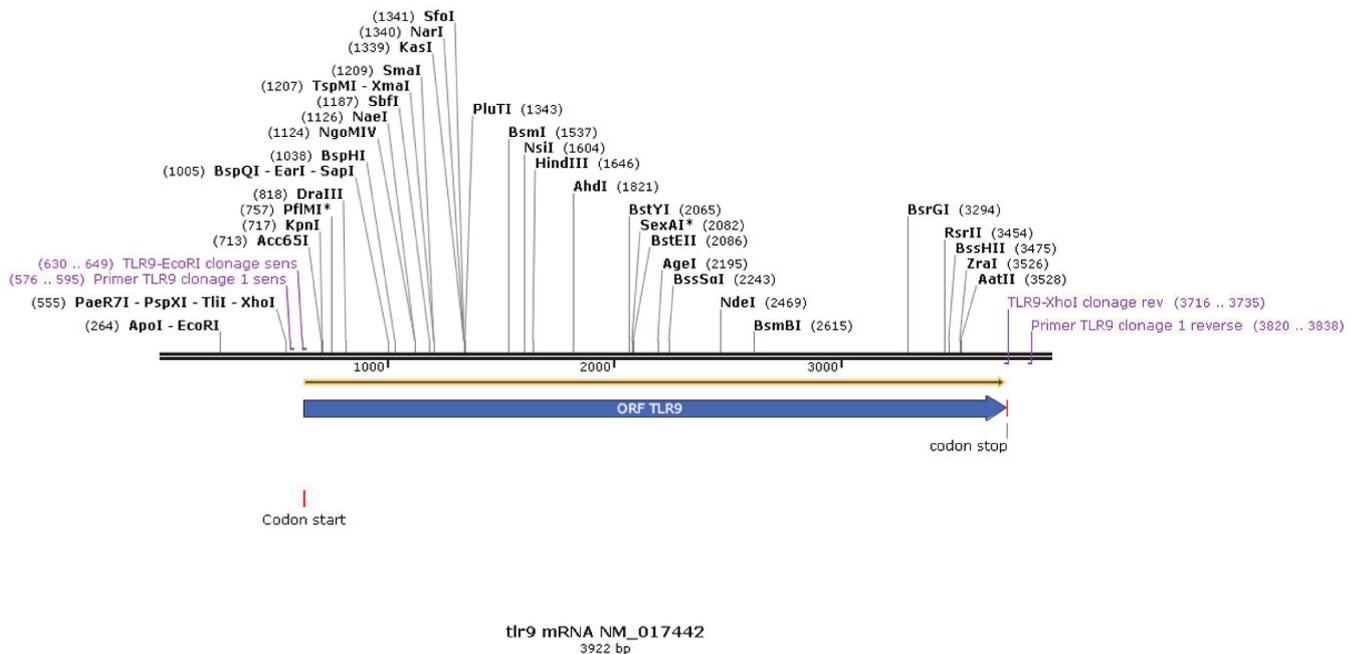


Figure 30 : Carte génétique de l'ARN messager du TLR9.

Long de 3922 paires de base, l'ARN messager du TLR9 contient un ORF riche à 62,5% de nucléotides G-C. Les zones de fixation des oligonucléotides utilisés pour son amplification par réaction de polymérisation en chaîne (*TLR9 clonage 1 sens* et *TLR9 clonage 1 reverse*) sont indiquées en violet. Apparaissent également les sites de fixation des oligonucléotides *TLR9-EcoRI clonage sens* et *TLR9-XhoI clonage rev* utilisés plus tard pour l'insertion des sites de restrictions.

La carte génétique de l'ARN messager du TLR9 apparaît sur la figure 30 ci-dessus.

Le produit de cette PCR a été vérifié sur gel d'agarose (figure 31). D'une taille attendue à 3263 pb, il a été purifié. La quantification au nanodrop indique une quantité de 175ng à une concentration de 3,5 ng/μL.

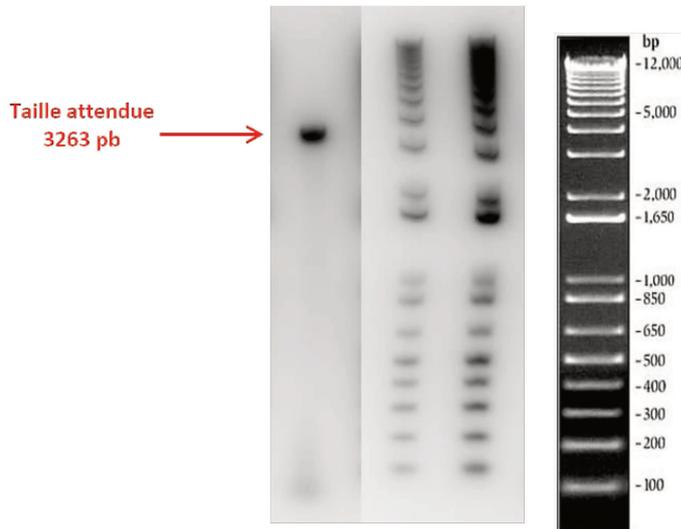


Figure 31 : Produit de la PCR d'amplification de l'ORF du TLR9

L'insert TLR9 ainsi produit a été sous-cloné dans le vecteur pCR BLUNT II TOPO. La carte du plasmide pCR-BluntII-TOPO-TLR9 ainsi obtenue apparaît figure 32.

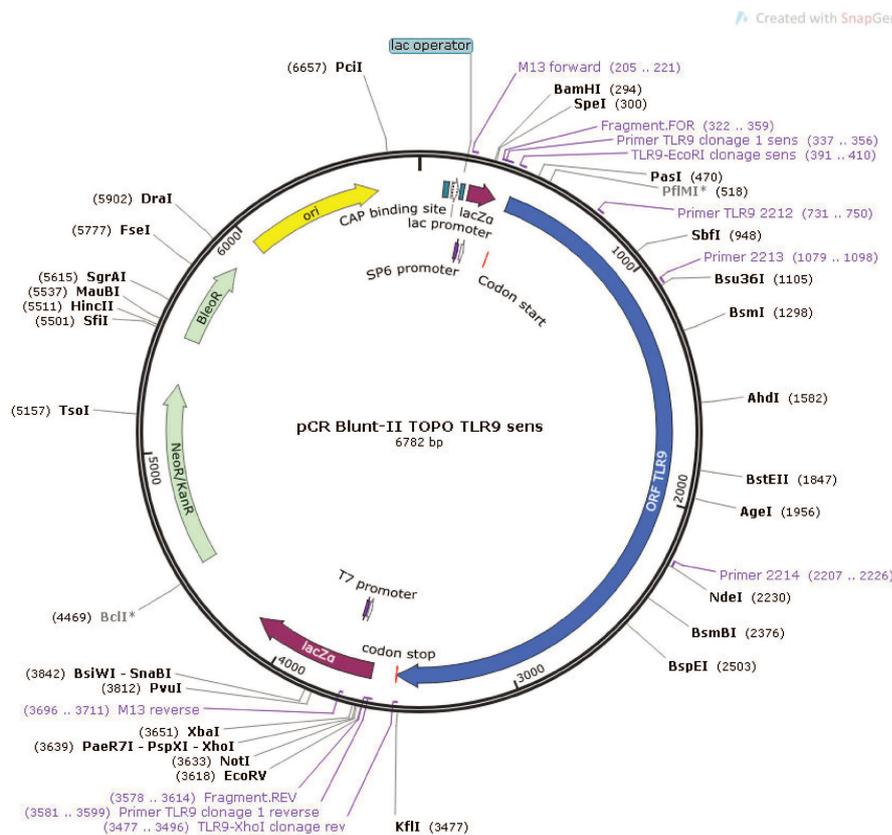


Figure 32 : Carte du plasmide pCR Blunt-II TOPO contenant l'ORF du TLR9 inséré en sens. Les positions des sites de fixation des différents oligonucléotides utilisés sont indiquées en violet.

Le produit de ce sous-clonage a alors été amplifié par transformation de cellules *One Shot TOP10 chemically competent*. Les clones transformés ont été sélectionnés et criblés. Une taille de 1505 pb est attendue pour le plasmide pCR Blunt-II TOPO contenant l'insert. Le résultat de la PCR, analysé sur gel, apparaît ci-dessous (figure 33).

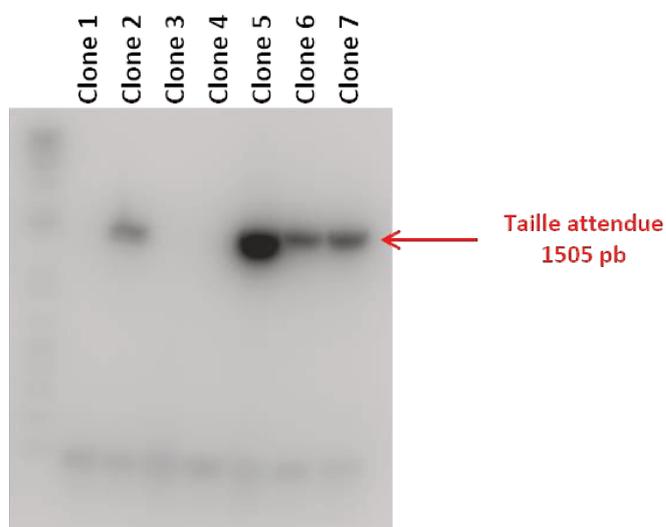


Figure 33 : Produits de PCR obtenus après clonage. Les clones 2, 5, 6 et 7 contiennent le plasmide pCR Blunt II Topo avec le gène du TLR9 inséré en sens.

Après sélection des clones contenant l'ORF du TLR9 inséré en sens, le plasmide a été purifié à partir de deux clones grâce au *Qiagen Plasmid Mini Kit* [Qiagen]. Sa concentration et sa pureté ont été vérifiées au nanodrop (tableau 9).

Nom de l'échantillon	Acide nucléique	260nm/280nM	260nm/230nm
pCR Blunt II-TOPO TLR9 clone 2	71,8 ng/μL	1,89	2,19
pCR Blunt II-TOPO TLR9 clone 7	16,5 ng/μL	1,79	2,15

Tableau 9 : Concentration des plasmides purifiés à partir des clones 2 et 7

POUR CLONER UNE HEMAGGLUTININE EN 3' DU CDNA DU TLR9 :

La suite du clonage a nécessité l'insertion de sites de restriction EcoRI et XhoI de part et d'autre de l'ORF du TLR9. Pour cela, nous avons réalisé une PCR avec la polymérase *Platinum Super Fi DNA polymerase* précédemment utilisée. L'emplacement des sites de fixation de ces oligonucléotides sur le plasmide pCR Blunt-II TOPO TLR9 est indiqué sur la

figure 32. Le produit de la PCR a été analysé. D'une taille de 3150 pb, il a été purifié sur gel par découpe puis utilisation du *High pure PCR product purification kit* [Roche Life Science] (figure 34). Sa quantité et pureté ont été évaluées au nanodrop (tableau 10).

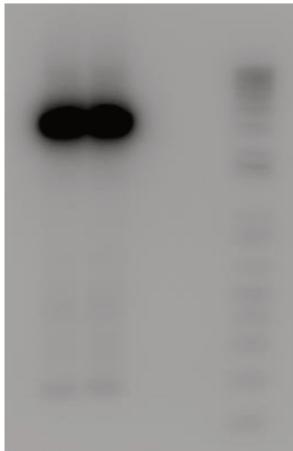


Figure 34 : Produits de PCR réalisée afin d'insérer les sites de restrictions nécessaires à l'insertion d'un tag hémagglutinine en C-terminal de l'ORF du TLR9.

Nom de l'échantillon	Acide nucléique	260nm/280nM	260nm/230nm
Insert TLR9 2217/2218 purifié	8,9 ng/μL	1,91	0,54

Tableau 10 : Concentration du produit de PCR purifié

Compte tenu de sa faible quantité, nous avons sous-cloné l'insert purifié dans le plasmide pCR Blunt II-TOPO par PCR. De la même manière que précédemment, des cellules *One Shot chemically competent* ont été transformées avant d'être cultivées et sélectionnées sur boîte de milieu LB contenant un gène de sélection kanamycine. Les clones obtenus ont été criblés et les résultats de la PCR analysés sur gel d'acrylamide 1% apparaissent ci-dessous (figure 35). La taille attendue est de 1437 pb.

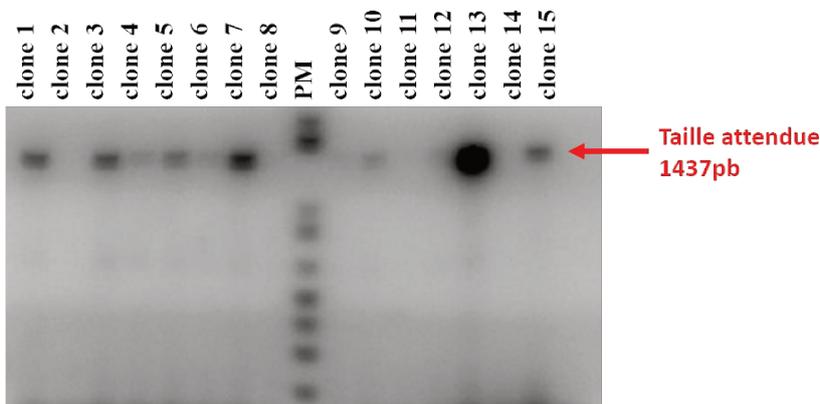


Figure 35 : Produits de PCR réalisée pour amplifier l'insert sous-cloné dans le plasmide pCR Blunt II-TOPO.

Les clones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13 et 15 ainsi validés ont été cultivés et le plasmide a été purifié à partir d'un clone grâce au kit *Qiagen Plasmid Midi Kit*. La bonne insertion du tag hémagglutinine a été vérifiée par séquençage selon la méthode Sanger (figure 36). Les profils de séquençages obtenus ont été vérifiés manuellement pour s'assurer de leur bonne qualité grâce au programme *SnapGene Viewer*. Les séquences obtenues ont été comparées par blast aux séquences attendues. Cette analyse par séquençage nous permet de confirmer la bonne présence du tag hémagglutinine en C terminale de l'ORF du TLR9 inséré en sens dans le plasmide pCR Blunt-II TOPO.

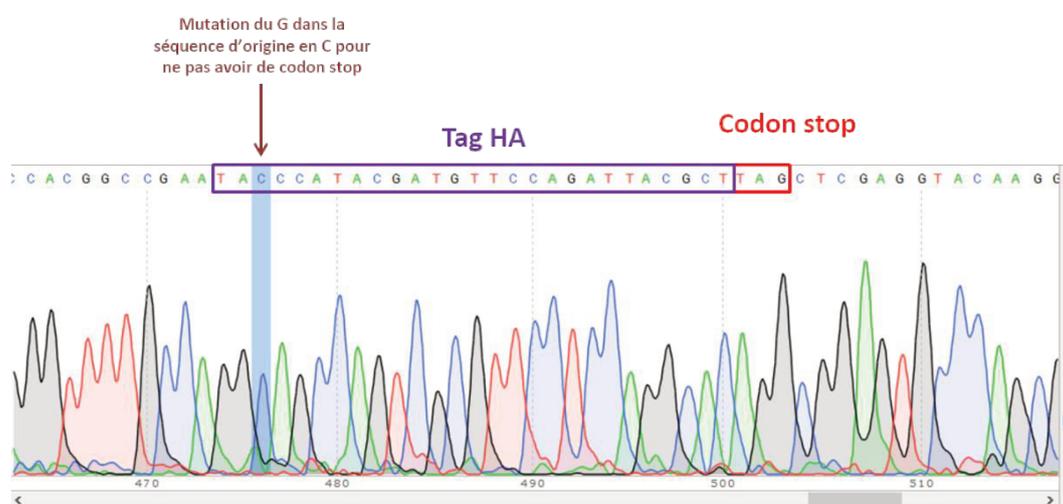
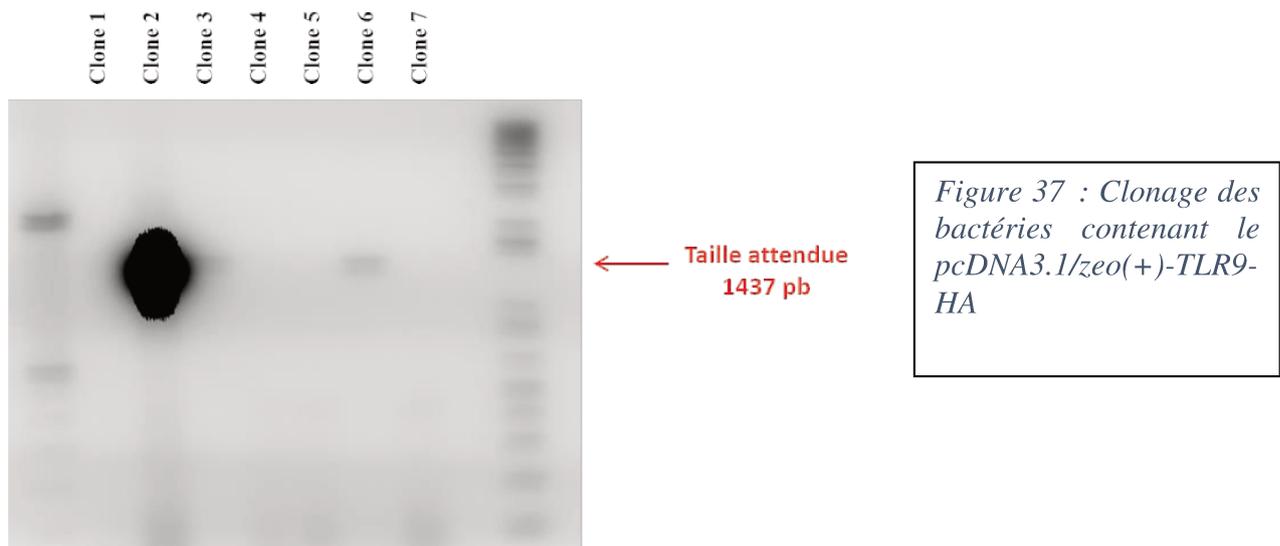


Figure 36 : Résultat du séquençage du plasmide pCR BluntII-TOPO-TLR9-hémagglutinine.

POUR OBTENIR UN PLASMIDE pCDNA3.1/ZEO(+)-TLR9-HA :

Le TLR9-HA a été transféré du plasmide pCR Blunt-II TOPO vers le plasmide pCDNA3.1/Zeo(+) par double digestion XhoI et EcoRI. Après 1 nuit de culture des bactéries transformées sur boîte de milieu LB, les clones ont été sélectionnés et la vérification du produit de ligation a été réalisée par PCR. La taille attendue est de 1437 pb et le résultat de la PCR analysé sur gel d'agarose 1% nous permet de confirmer la bonne ligation de l'insert et du plasmide dans le clone 2 (figure 37).



Les clones validés ont ensuite été cultivés et le plasmide a été purifié grâce au kit Qiagen Plasmid Midi Kit et conservé à -80°C . Une fois dosé au nanodrop, le plasmide est prêt pour la transfection transitoire de cellules eucaryotes. Un schéma de la protéine chimérique TLR9-HA obtenue formée est présentée figure 38.

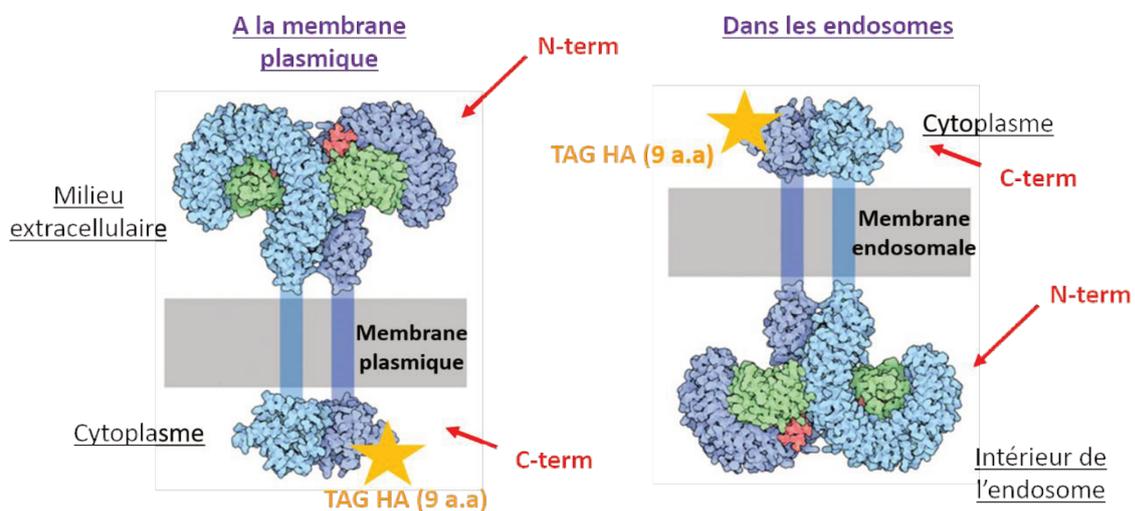


Figure 38 : Représentation schématique de la protéine TLR9-HA exprimée dans des lignées de cellules eucaryotes humaines transfectées avec le plasmide *pcDNA3.1/zeo-TLR9-HA*

VIII. Etude de l'expression des protéines de fusion TLR9-HA sur HEK293

1,33x10⁶ cellules de la lignée HEK293 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits 24 heures avant la transfection. Le jour de la transfection, les cellules entre 70-90% de confluence ont été transfectées avec 2,5µg d'ADN plasmidique pcDNA3.1-TLR9-HA par puit à l'aide du kit Lipofectamine[®]3000 [Invitrogen Life Technologies] selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 72 heures à 37°C, 5% CO₂. Un plasmide vide a servi de contrôle négatif. Une analyse par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti-HA conjugué à la FITC a permis de montrer l'efficacité de la transfection et l'expression de la protéine TLR9 taguée dans les cellules HEK293 après trois jours de culture (Figure 39). Si le plasmide vide induit une augmentation de l'auto-fluorescence des cellules HEK293, cette fluorescence reste moins importante que celle obtenu avec les cellules exprimant le TLR9 tagué. Cette expérience confirme le succès de la transfection et la surexpression de notre protéine d'intérêt.

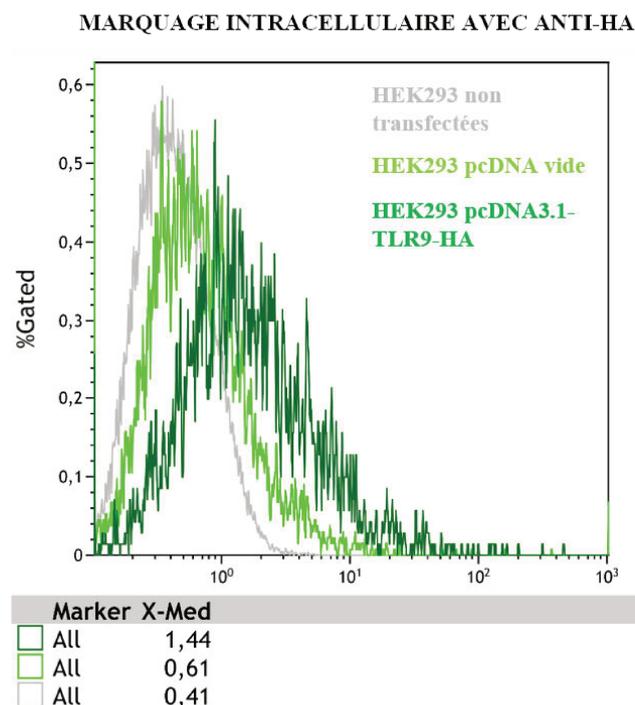


Figure 39 : Expression de la protéine TLR9-HA transfectée dans les cellules HEK293

Le plasmide contenant le construit TLR9-HA, ou le plasmide vide, ont été transfectés dans des cellules HEK293 à l'aide de Lipofectamine 3000. 48H après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées, perméabilisées puis marquées à l'aide d'un anticorps anti-HA.11 conjugué à la FITC et d'un marqueur de mort cellulaire.

Les cellules HEK293 transfectée ont été lysées avec le tampon de lyse Brij96. Les lysats protéiques ont été analysés par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-HA révélé par un anticorps secondaire de souris couplé à l'HRP (Figure 40). Une bande unique dont la taille est située entre 100 et 150kDa est détectée, confirmant l'expression du TLR9 tagué suite à la

transfection. Les résultats indiquent que la transfection à l'aide de 200ng de plasmide et 48h de culture post-transfection permettent d'obtenir une expression correcte de la protéine taguée et valide les contrôles négatifs (figure 40).

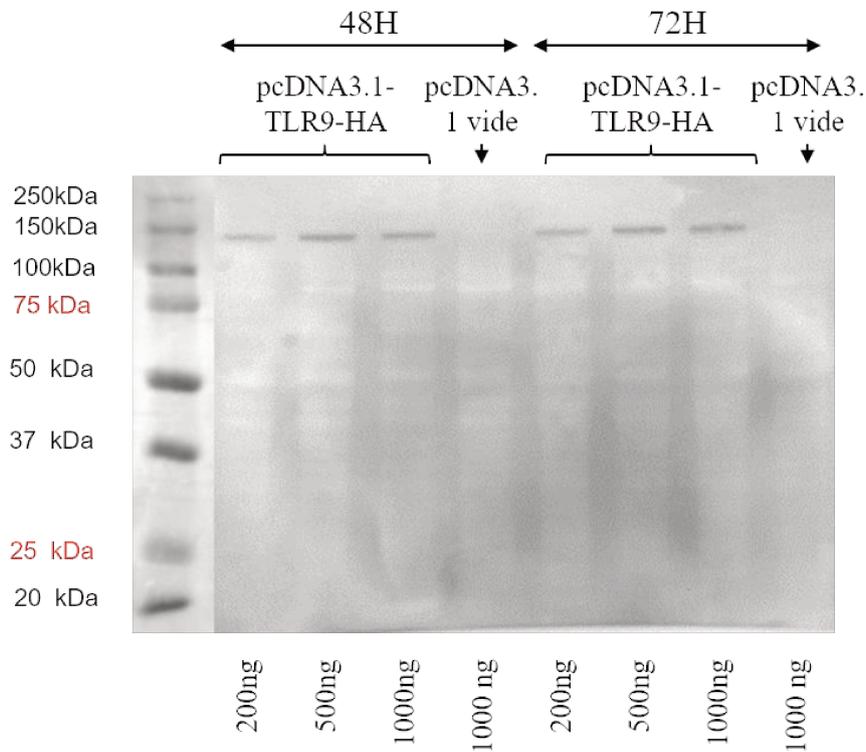


Figure 40 : Western blot avec des extraits protéiques issus des transfections de cellules rénales HEK293 avec le plasmide pcDNA3.1-TLR9-HA ou le plasmide pcDNA3.1 vide.

Le plasmide contenant le construit TLR9-HA, ou le plasmide vide, ont été transfectés dans les cellules HEK293 à l'aide de lipofectamine 3000. 48h après la transfection, les cellules ont été récoltées, lysées puis les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide. Après transfert sur membrane PVDF, la protéine TLR9-HA a été mise en évidence par un anticorps anti-HA.11 révélé par une anti-IgG-HRP.

Les mêmes lysats protéiques ont été analysés en présence des différents anticorps anti-TLR9, révélés avec des anticorps secondaires couplés à l'HRP (figure 41).

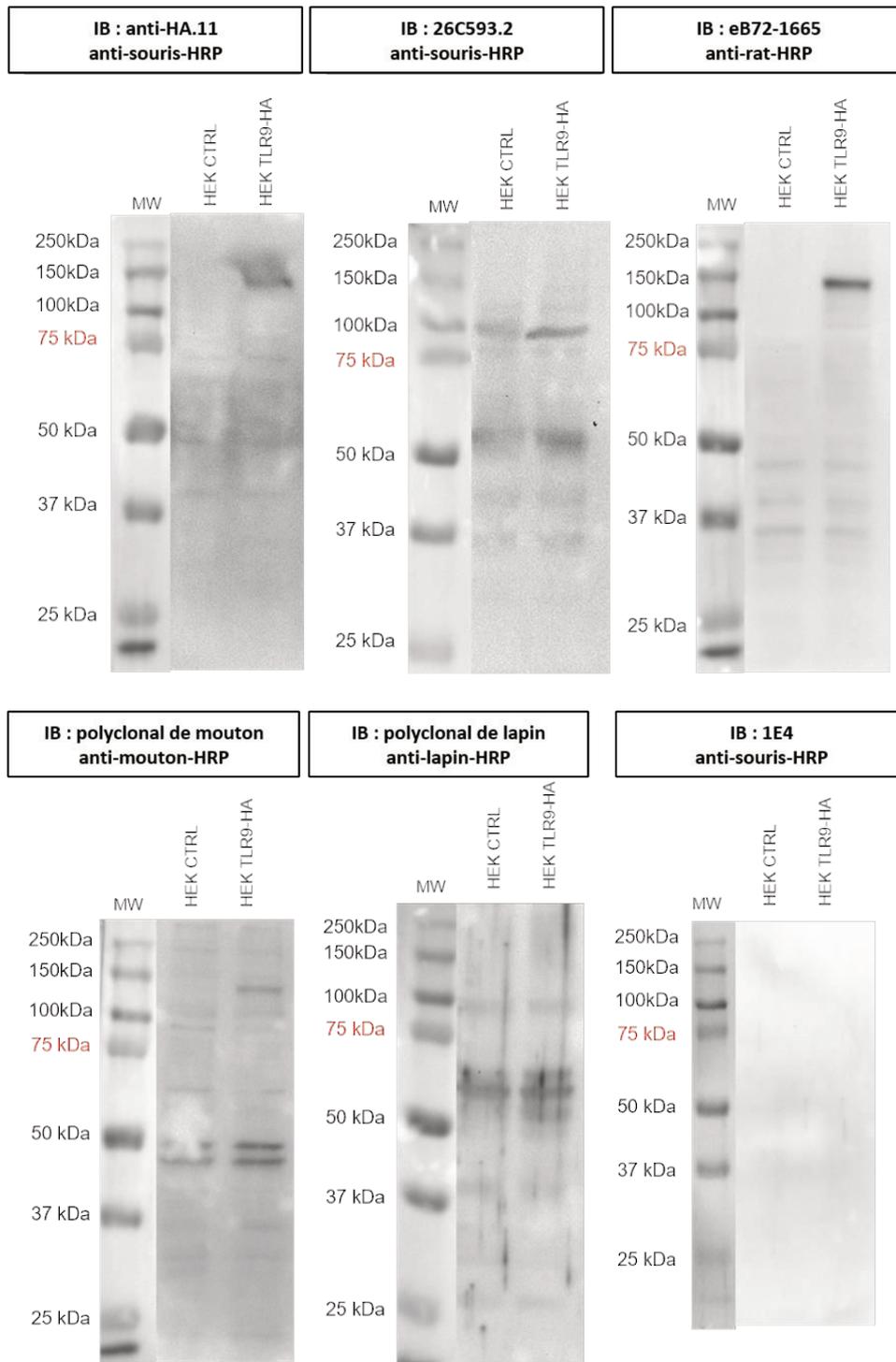


Figure 41 : Détection de la protéine TLR9-HA avec les anticorps anti-TLR9 dans les cellules HEK293 transfectées.

Les cellules HEK293 transfectées avec 2,5µg de plasmide pcDNA3.1-TLR9-HA ont été lysées à l'aide du tampon RIPA. 40µg de protéines totales ont été chargées par piste, et le western blot a été révélé à l'aide de l'anticorps anti-HA.11 révélé par un anticorps secondaire anti-souris-HRP.

Le clone eB72-1665 et le polyclonal de mouton reconnaissent bien la protéine TLR9 taguée. En revanche, le clone 26C593.2 et le polyclonal de lapin ne la reconnaissent pas. Or, le clone eB72-1665 reconnaît l'épitope 273-288, le clone 26C593.2 reconnaît l'épitope 268-300, le clone 1E4 reconnaît l'épitope 370-473 et l'anticorps polyclonal de mouton reconnaît l'épitope 64-189. Ces régions du TLR9 contiennent des sites de N-glycosylation. Seul l'anticorps polyclonal de lapin reconnaît l'épitope 771-870 qui ne contient pas de N-glycosylation. La glycosylation ne semble donc pas être responsable de l'absence de reconnaissance de la protéine TLR9 par certains anticorps anti-TLR9. C'est plutôt la conformation de la protéine qui favorise vraisemblablement la qualité de la fixation des anticorps à leur cible (figure 41).

IX. Microscopie – TLR9-HA ne colocalise pas avec l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2

Pour nos expériences de microscopie, nous nous sommes procuré des pré-monocytes de la lignée U937, capable de se différencier sous stimulation *in vitro* en cellules présentatrices d'antigène. L'expression intrinsèque du TLR9 dans les cellules U937 est de niveau moyen, comme confirmé par le Genevestigator.com. Mais contrairement aux cellules HEK293, les U937 expriment les protéines chaperonnes nécessaires au trafic de cette protéine. D'autre part, les U937 sont transfectables avec plus d'efficacité que des cellules B RAMOS. Notre choix s'est donc porté sur cette lignée.

Après électroporation en présence du plasmide pcDNA3.1-TLR9-HA, les cellules de la lignée U937 ont été cultivées 48h supplémentaires, récoltées puis marquées avec l'anticorps anti-HA.11 conjugué à de la biotine et révélé à l'aide d'une streptavidine-RRX, et observées au microscope confocal (figure 42).

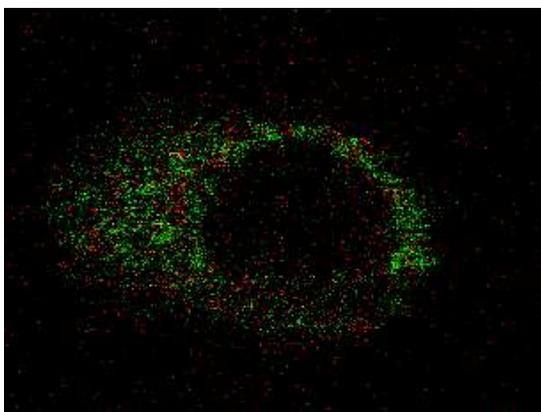


Figure 42 : Microscopie confocale sur U937-TLR9-HA

Après 24h de culture post-transfection, les U937 sont récoltées, fixées à la PFA4% et perméabilisées. Le TLR9-HA est révélé par un anticorps anti-HA.11 couplé à une biotine, elle-même révélée par une streptavidine-RRX. L'anticorps anti-TLR9 monoclonal 26C593.2-FITC a été utilisé en parallèle. Nous n'observons pas de colocalisation des deux marquages.

Nous observons que, si la fluorescence du Tag est bel et bien répartie dans l'ensemble de la cellule U937, elle ne semble pas se localiser à la membrane plasmique. De plus, l'utilisation conjointe de l'anticorps anti-TLR9 26C593.2 conjugué à la FITC indique que la cible de cet anticorps anti-TLR9 ne colocalise pas avec la protéine TLR9-HA. Ces analyses confortent l'idée que les anticorps anti-TLR9 ne sont pas en mesure de reconnaître la protéine TLR9 synthétisée par les cellules.

X. TLR9 recombinant – détection correcte avec anticorps anti-TLR9

Afin de confirmer par une autre approche la reconnaissance spécifique des anticorps anti-TLR9 par Western Blot, nous avons souhaité évaluer la reconnaissance d'une protéine TLR9 recombinante humaine produite à partir de l'ORF complet du TLR9 humain dans des germes de blé. Nous avons réalisé la migration sur gel dénaturant SDS PAGE d'échantillon de TLR9 recombinant non réduit et d'échantillon réduit par chauffage à 95°C en présence de bêta-mercaptoéthanol. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie (Figure 43).

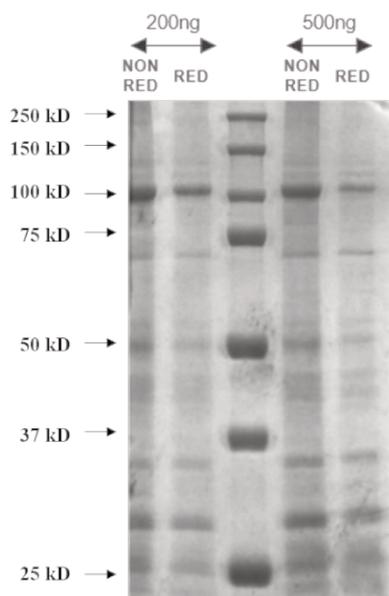


Figure 43 : Caractéristique du TLR9 recombinant

Coloration au Bleu de Coomassie de la protéine TLR9 recombinante après migration SDS-PAGE en gel dénaturant.

Les résultats indiquent une bande au poids moléculaire attendu de 113kDa environ, aucune bande au poids moléculaire de 160 kDa, mais plusieurs autres bandes à des poids moléculaires pouvant correspondre à des formes non glycosylées clivées (50kDa et 70kDa). Des bandes de poids moléculaires inférieurs à 50kDa sont également visibles pouvant correspondre à des fragments des formes complète et/ou clivée. Il semble donc que le contenu du TLR9 recombinant ne soit pas complètement homogène. La migration du TLR9 recombinant dans un

gel SDS PAGE en condition dénaturante et réductrice a été suivie d'une révélation par Western Blot avec l'ensemble des anti-TLR9 monoclonaux et polyclonaux testés (Figure 44).

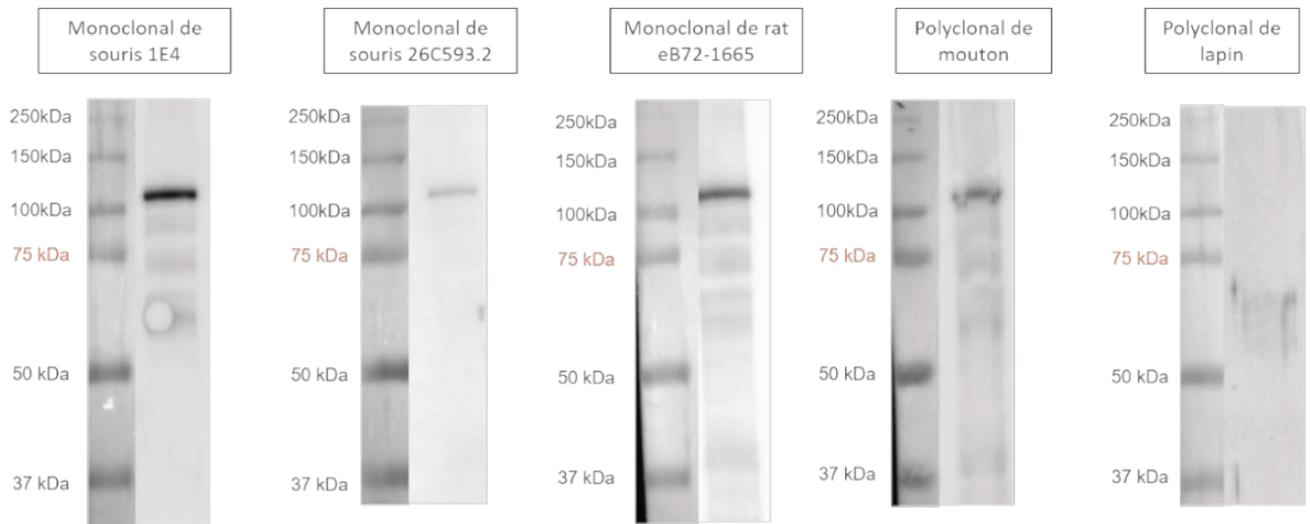


Figure 44 : Reconnaissance de la protéine TLR9 recombinante par les anticorps anti-TLR9.

Détection à l'aide des différents anticorps anti-TLR9 révélés par une anti-IgG couplée à de l'HRP. Exemple représentatif de 3 expériences.

Aucune bande à 160 kDa n'est révélée par les anticorps. Les anticorps monoclonaux de souris 1E4 et 26C593.2, l'anticorps monoclonal de rat eB72-1665 et l'anticorps polyclonal de mouton révèlent une bande de poids moléculaire de 110 kDa. En revanche, l'anticorps polyclonal de lapin ne révèle aucune bande. Les anticorps monoclonaux de souris 1E4 et de rat eB72-1665, ainsi que l'anticorps polyclonal de mouton révèlent également une bande à 60kDa, contrairement à l'anticorps monoclonal de souris 26C593.2. Curieusement, ces 3 anticorps révèlent aussi deux bandes autour de 70 kDa et 90 kDa. Finalement, il semble que la forme non glycosylée du TLR9 recombinant, la plus abondante, soit également la forme la mieux reconnue par une majorité d'anticorps. Or, certains de ces anticorps sont capables de reconnaître la forme glycosylée du TLR9-HA surexprimé dans les cellules rénales HEK293. Cela renforce l'idée que la présence ou l'absence de motifs de glycosylation ne gêne pas la reconnaissance de la protéine par les anticorps.

L'ensemble des résultats a fait l'objet de la rédaction d'un article actuellement soumis pour publication (Annexe 1).

XI. Le TLR9 et sa voie de signalisation dans la LLC

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'occasion de m'investir sur le projet de thèse d'Audrey Mohr, autre étudiante en doctorat dont le projet était l'implication du TLR9 dans la fonction régulatrice des LB et la sévérité de la pathologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC). La LLC est une hémopathie caractérisée par une accumulation de LB CD5⁺, et des réponses immunes anormales. Les LB de LLC font l'objet de nombreuses études. Ils partagent des traits phénotypiques avec les LB_{reg}, tels que l'expression des marqueurs CD24 et CD27 et une faible expression d'IgM de surface. De plus, l'accumulation de LT_{reg} chez ces patients suggère que les LB de LLC sont capables de jouer un rôle régulateur auprès de ces LT, et inhiberaient donc le développement de l'inflammation, favorisant ainsi le développement de la pathologie.

In vitro, il a été montré que les LB de LLC sont capables de répondre à une stimulation par le TLR9 et le CD40 et de produire de l'IL10. Dans ce travail, Audrey Mohr souhaite étudier les capacités des LB de LLC à inhiber la réponse inflammatoire de manière IL10-indépendante. Elle utilise pour cela un modèle de co-culture *in vitro* de LB et de LT autologues mis au point au sein du laboratoire (Lemoine et al., 2011). Dans ce modèle, elle cultive des LB de LLC provenant de patients à différents stades de développement de la pathologie. Ces LB sont stimulés *via* le TLR9 grâce à l'ajout en culture de CpG-ODN de type B et *via* le CD40 par les LT. Les résultats indiquent que la moitié des patients est capable d'induire une action régulatrice (Reg POS LLC) alors que l'autre moitié a des LB qui ne sont pas capables de réguler l'inflammation (Reg NEG CLL) (figure 45).

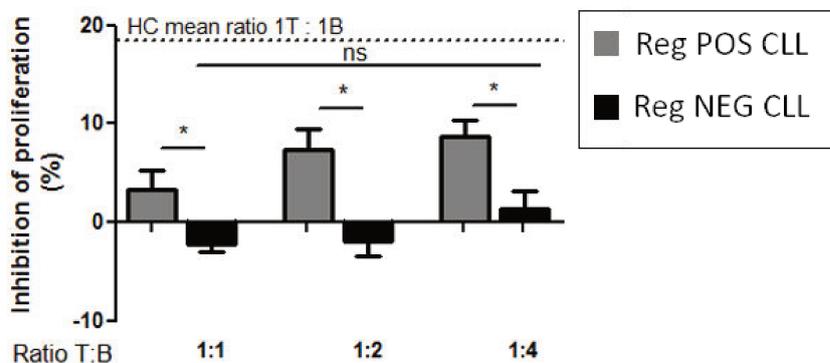


Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique par les lymphocytes B autologues

Or, Audrey Mohr a mis en évidence que les LT de toutes les LLC sont capables de proliférer en présence des LB des deux groupes de LB (figure 46).

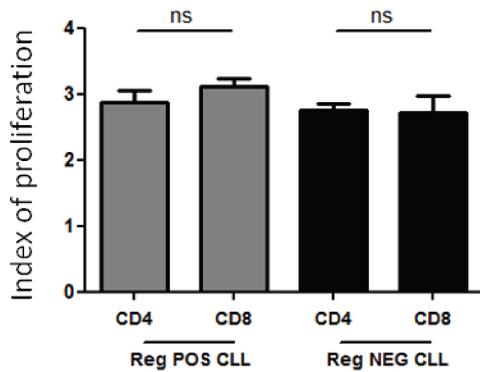


Figure 46 : Index de prolifération des lymphocytes T (LT) cultivés in vitro avec des lymphocytes B (LB) de leucémie lymphoïde chronique (LLC).

Il a donc été suggéré que les LB de LLC du groupe « régulateurs négatifs » ont un défaut intrinsèque qui les empêchent d'exercer cette fonction régulatrice. La stimulation des LB par leur TLR9 avec du CpG-ODN de type B a permis d'obtenir des LB CD69⁺ activés dans les deux groupes. Cependant, l'expression du CD40 par les LB de LLC du groupe régulateur négatif était significativement plus faible que celle des LB de LLC du groupe régulateur positif (figure 47).

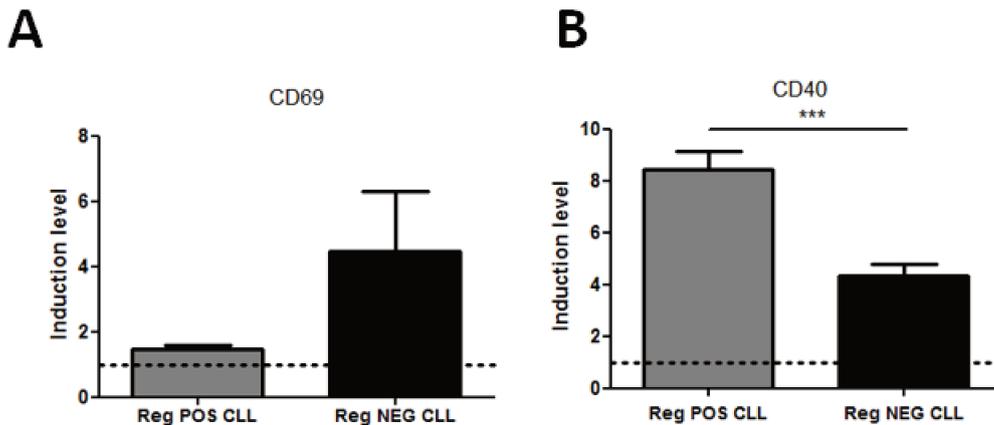


Figure 47 : Niveaux d'expression par les lymphocytes B (LB) de leucémie lymphoïde chronique (LLC) classés dans cette étude en groupe régulateur positif ou régulateur négatif de la prolifération de leurs lymphocytes T autologues

A : Le niveau d'induction du marqueur CD69 est mesuré. **B** : le niveau d'induction du marqueur CD40 est mesuré.

Il a donc été suggéré que les de LB de LLC du groupe régulateur négatif ont un défaut dans la voie de signalisation en aval du TLR9 par rapport aux LB de LLC du groupe régulateur positif.

Afin de répondre à cette question, les niveaux d'expression des ARNm des molécules de la voie de signalisation du TLR9 ou ceux de ses inhibiteurs ont été mesurés par l'utilisation d'une puce *TaqMan gene expression array*. Vingt-neuf gènes sont surexprimés et 10 gènes sous-exprimés dans les LB de LLC du groupe régulateur négatif par rapport aux LB de LLC du groupe régulateur positif (figure 48).

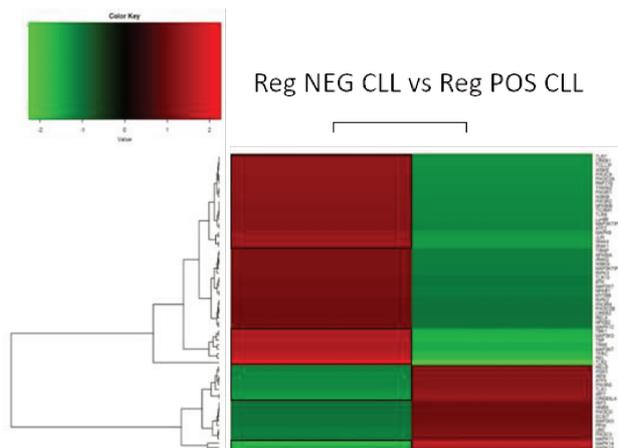


Figure 48 : Heat-Map représentant les niveaux d'expression de gènes de la voie du TLR9 des lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique (LLC) du groupe régulateur négatif ou du groupe régulateur positif

Parmi ces gènes différentiellement exprimés, 4 gènes associés à des signaux activateurs étaient surexprimés (TBK1, IRAK-4, IRAK-1 et REL) et 6 gènes étaient sous-exprimés (IRF-7, IRF-8, MAPK14, MAPK13, RELB et UBC) chez les LB de LLC régulateurs négatifs par rapport aux LB de LLC régulateurs positifs. De plus, deux gènes associés à des signaux inhibiteurs de la voie du TLR9 étaient également sur-exprimés (TOLLIP et TANK) par les LB de LLC du groupe régulateur négatif par rapport aux LB de LLC du groupe régulateur positif (tableau 11).

Voie du TLR9				
Activation			Inhibition	
Sur-exprimés dans les LB Reg NEG	TBK1	+1.56	TOLLIP	+1.28
	IRAK-4	+1.37	TANK	+1.49
	IRAK-1	+1.38		
	REL	+1.68		
Sous-exprimés dans les LB Reg NEG	IRF-7	-1.33	Aucun	
	IRF-8	-1.21		
	MAPK14	-1.73		
	MAPK13	-1.51		
	RELB	-1.19		
	UBC	-1.13		

Tableau 11 : Expression différentielle de gènes associés à la voie de signalisation du TLR9 chez les lymphocytes B de leucémie lymphoïde chronique du groupe régulateur négatif par rapport au groupe régulateur positif.

Ma participation a consisté en la réalisation de Western Blot dans le but de confirmer cette expression différentielle des ARNm au niveau protéique. Par rapport aux contrôles sains, l'expression différentielle d'IRAK-1, IRAK-4 et TANK a été confirmée. Pour ces molécules, des bandes spécifiques ont été révélées avec des anticorps monoclonaux (figure 49).

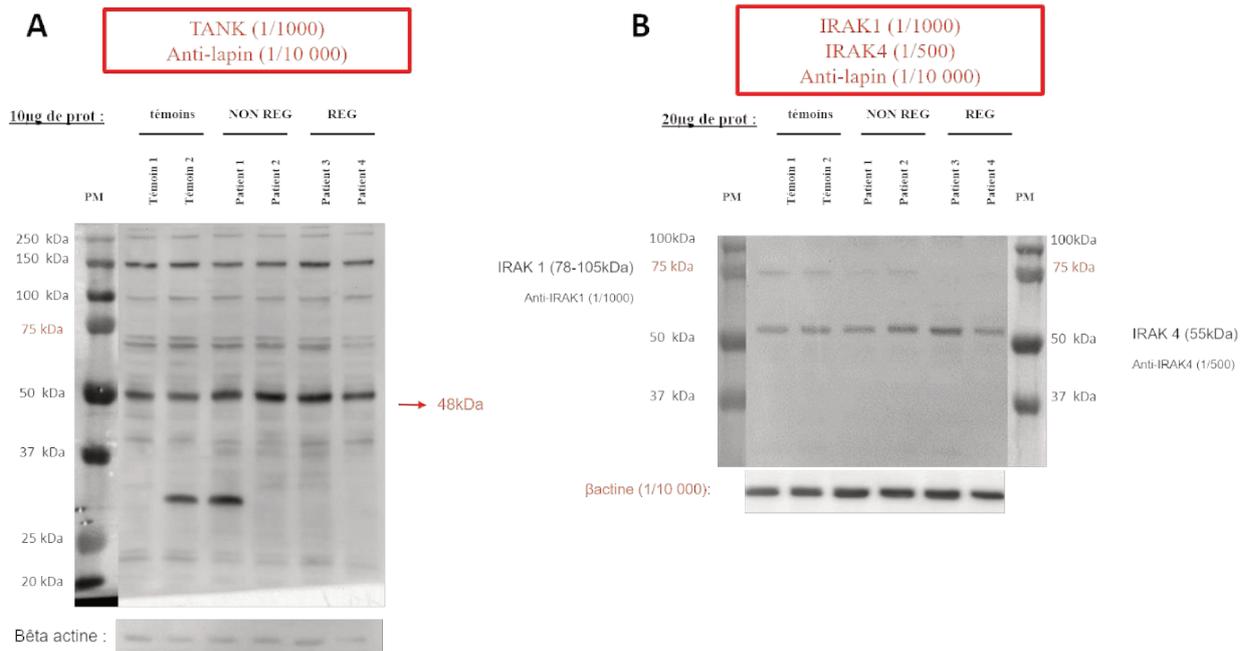


Figure 49 : Western Blot sur extraits protéiques totaux de lymphocytes B de LLC du groupe régulateur (REG) ou non régulateur (NON REG) ou de témoins

A : Un anticorps monoclonal anti-TANK est utilisé pour détecter la protéine TANK d’une taille attendue de 48kDa. **B** : Deux anticorps monoclonaux anti-IRAK-1 et anti-IRAK-4 permettent de détecter ces deux protéines de tailles attendues de 78kDa et 55kDa respectivement.

Les niveaux d’expression de ces protéines ont été calculés en utilisant les témoins sains comme contrôles (figure 50).

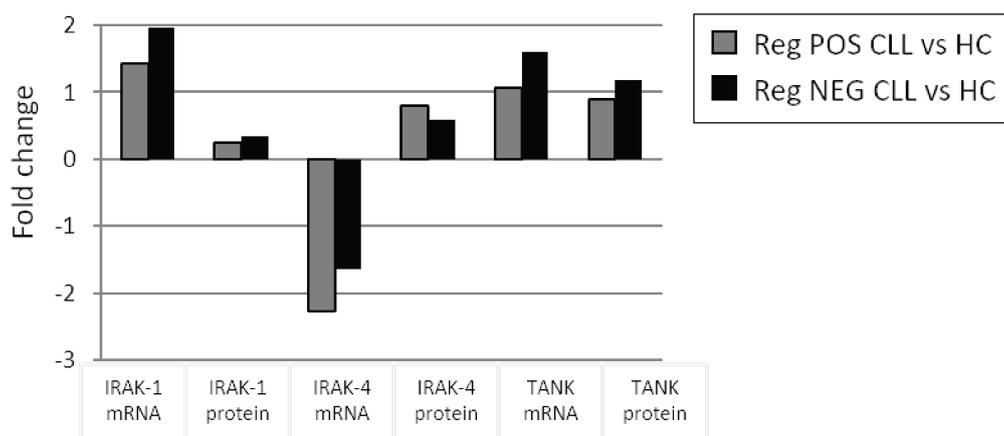


Figure 50 : Comparaison des niveaux d’expression des ARNm et des protéines IRAK-1, IRAK-4 et TANK dans les LB des patients LLC régulateurs positif et régulateurs négatifs par rapport aux contrôles sains (HC).

En conclusion de ces résultats, nous suggérons que l'expression plus importante des signaux inhibiteurs de la voie du TLR9 dans les LB de LLC non régulateurs peut être à la base de leur incapacité à développer une action régulatrice en réponse à une stimulation par le TLR9.

L'ensemble des résultats de ce travail est en cours de soumission pour publication (Annexe 2).

DISCUSSION

Relevance de l'étude du TLR9 dans le contexte de la régulation par les LB

La capacité des LB à devenir régulateurs a été mise en évidence. Elle est au cœur d'études qui visent à trouver des solutions thérapeutiques à des pathologies autoimmunes où cette fonction régulatrice est déficiente (ex : LES) (Miyagaki et al., 2015; Rafei et al., 2009; Rosser and Mauri, 2014; Schubert et al., 2015; Yang et al., 2010; Yoshizaki et al., 2012) ou dans des cas de cancers où elle encourage le développement de tumeurs (ex : LLC) (Yamamoto et al., 2008). Ces inductions de LB_{reg} doivent être particulièrement contrôlées dans la mesure où une surexposition des LB_{reg} à ces facteurs d'induction peut conduire à leur désensibilisation. Ces LB_{reg} induits parviennent ensuite plus difficilement à provoquer la tolérance (Menon et al., 2016). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la quantité de LB_{reg} nécessaires à l'obtention des effets régulateurs escomptés *in vivo*.

Il a été montré que plusieurs facteurs sont capables d'induire une régulation par des LB *in vitro*. La cytokine IL-35 peut, par exemple, jouer un rôle (Wang et al., 2014). De la même manière, une bactérie commensale peut induire la différenciation de LB_{reg} et la production d'IL-10 *via* la production d'IL-1 β et d'IL-6 chez les souris arthritiques (Rosser and Mauri, 2014). Cependant, l'effet régulateur maximal semble être obtenu après co-activation des LB par une stimulation conjointe par les TLR et leur CD40 (Genestier et al., 2007; Grammer and Lipsky, 2002; Menon et al., 2016). Les TLR remplissent ici un rôle à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Le TLR9 en est un exemple et a été particulièrement étudié dans le contexte de la régulation par les LB.

Lorsqu'il est stimulé par son ligand CpG, le TLR9 active les LB capables de réguler la prolifération de leurs lymphocytes T autologues, dans un modèle de co-culture mis au point au sein de notre laboratoire (Lemoine et al., 2011). Dans les maladies autoimmunes, les patients souffrent d'une activation aberrante du système immunitaire et de l'effet d'une hyper-inflammation. Chez ces patients, un défaut de la régulation par les LB a été mise en évidence. Chez les patients atteints de LES en particulier, il a été montré que la stimulation des LB *in vitro* par du CpG-ODN ne permet pas d'induire une régulation par ces cellules, ce qui suggère un défaut intrinsèque de la voie du TLR9 dans les LB de ces patients.

Caractérisation des anticorps anti-TLR9

Afin d'étudier plus amplement le TLR9 physiologique dans des cellules primaires et de comprendre les liens entre le TLR9 endosomal et le TLR9 exprimé à la membrane plasmique, nous souhaitons utiliser des anticorps anti-TLR9. Grâce à l'amélioration des outils dont nous disposons au laboratoire, nous avons été en mesure de préciser le signal obtenu précédemment par Thomas Guerrier à l'aide des anticorps anti-TLR9 humains. Nous avons vu comment un marquage peut suggérer la présence d'un TLR9 à la membrane plasmique des LB. Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence un important défaut de ces anticorps à marquer leur cible de manière spécifique.

Nous avons pris le soin de caractériser la capacité de ces anticorps à cibler la bonne protéine de manière spécifique. En l'occurrence, aucun anticorps n'a été capable de détecter le TLR9 de manière spécifique lorsqu'elle est dans un état physiologique. Or l'efficacité de ces anticorps à reconnaître leur cible dépend de la disponibilité de cette cible, de sa conformation tridimensionnelle et des modifications post-traductionnelles qui peuvent s'y ajouter. Les anticorps doivent donc être testés pour chaque application, et caractérisés afin d'être validés et garantir la fiabilité des résultats émis. Ainsi, le western blot est, parmi les techniques requérant l'utilisation d'anticorps, la technique la plus couramment utilisée. Or, les protéines sont souvent dénaturées et réduites par le protocole expérimental de cette technique, et sont donc reconnues par les anticorps avec une efficacité dépendante de chaque anticorps. Cette efficacité de reconnaissance peut varier avec la technique. Par exemple, en cytométrie en flux où les cibles sont dans des conditions natives, des anticorps pourront efficacement se fixer sur leur cible sans être en mesure de le faire en Western Blot.

Les anticorps anti-TLR9 humain ont une bonne reconnaissance générale du substitut recombinant produit dans germes de blé. Grâce à la transfection d'un TLR9 tagué par une hémagglutinine, nous avons mis en évidence la difficulté d'une majorité de nos anticorps anti-TLR9 testés à marquer la protéine surexprimée dans les cellules de la lignée rénale HEK293. En revanche, les raisons de leur incapacité à fixer leur cible dans des LB à l'état basal ne sont pas claires.

Les motifs de glycosylation ne sont pas les mêmes entre les cellules procaryotes et eucaryotes, animales et végétales. L'hypothèse d'une modification post-traductionnelle telle que la glycosylation a donc été émise. En effet, il a été montré que les motifs de glycosylation peuvent gêner la reconnaissance d'une cible par un anticorps (Uray et al., 2014). Or, le TLR9 a plusieurs

sites de glycosylation, qui sont principalement des N-glycosylations. De plus, certains anticorps anti-TLR9 ont été produits suite à une immunisation par un TLR9 entier, lui-même produit dans une souche bactérienne, ou par un TLR9 entier tagué et produit dans un système inconnu. Cependant, cette explication ne semble pas être recevable dans la mesure où certains anticorps tels que l'anticorps polyclonal de mouton et l'anticorps monoclonal de rat eB72-1665 ciblant des régions glycosylées parviennent à reconnaître le TLR9-HA surexprimé dans les cellules de la lignée rénale HEK293.

La disponibilité de la protéine peut être un point important puisque le TLR9-HA surexprimé et le TLR9 recombinant purifié sont plus faciles à détecter que les protéines natives. Cependant, de grandes quantités de protéines totales analysées par Western Blot n'ont pas suffi à permettre la détection du TLR9. La quantité de matériel utilisé ne semble donc pas suffire à expliquer ce défaut de reconnaissance.

La nécessité d'une conformation tridimensionnelle particulière peut être impliquée dans ce défaut de détection du TLR9. Une partie des anticorps est produite par immunisation à l'aide de peptides synthétiques courts qui peuvent ne pas être reconnus dans une protéine entière. C'est le cas de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 et de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de rat eB72-1665. Cependant, ce dernier parvient à reconnaître le TLR9-HA surexprimé dans les cellules de la lignée rénale HEK293.

Les raisons de la difficulté des anticorps à cibler le TLR9 dans des cellules primaires n'est donc toujours pas claire.

En conclusion, aujourd'hui et avec les outils dont nous disposons, nous ne sommes pas en mesure d'étudier le TLR9 physiologique à l'aide de ces anticorps. Il ne nous est donc pas possible d'affirmer ou d'infirmer la présence d'un TLR9 à la membrane plasmique de LB primaires. Si ce défaut a déjà subtilement été mentionné dans certaines revues, aucun article de description de ces anticorps n'a jamais vu le jour. Compte-tenu de l'importance biologique du TLR9 et de l'intérêt qu'il suscite, nous avons souhaité communiquer nos résultats afin de mettre en garde contre leur utilisation (Article en cours de soumission dans l'annexe 1).

Malgré une spécificité défectueuse, nous pouvons en revanche concentrer notre attention sur l'effet de l'anticorps monoclonal de souris 26C593.2 sur l'activation des LB. Il active les LB d'amygdales *in vitro* dans un modèle de coculture avec des LT autologues mais cet effet fonctionnel reste à caractériser. Il sera important d'évaluer l'effet de la fixation de cet anticorps sur les LB autant que sur les LT d'amygdales, ainsi que sur les LB et LT du sang périphérique

en culture *in vitro*. Bien que l'immunoprécipitation ait révélé plusieurs cibles de cet anticorps dont l'identification est discutée plus loin, il serait intéressant d'étudier le mécanisme sous-jacent de cet effet fonctionnel. D'autre part, l'immunoprécipitation par les autres anticorps anti-TLR9 révèle des cibles dont les poids moléculaires sont communs. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de ces autres anticorps anti-TLR9 sur l'activation cellulaire *in vitro*. Enfin, de plus amples expérimentations nous permettront peut-être d'évaluer l'effet de l'activation des LB primaires sur leur capacité à réguler la prolifération des LT en culture *in vitro*. Les LB primaires du sang périphérique activés par une stimulation avec du CpG-ODN sont capables de réguler la prolifération de LT autologues. Dans ce modèle de co-culture, il serait intéressant de voir comment, l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 pourra modifier cette inhibition de la prolifération des LT.

Les anticorps anti-TLR9 humain dans la littérature

Aujourd'hui encore, les anticorps anti-TLR9 sont utilisés et les données obtenues apparaissent dans des publications, sans que les limites de leur spécificité n'aient été pointées.

Comme nous avons pu le voir avec les travaux de Thomas Guerrier, l'un des anticorps anti-TLR9 humain est capable de se localiser dans les radeaux lipidiques en présence du BCR sur des LB d'amygdales humaines. D'autres publications ont montré un accrochage à la membrane plasmique de cet anticorps. Dans la mesure où il active les LB, les données générées à l'aide de cet anticorps sont intéressantes. Il est cependant important de ne pas oublier que leur cible n'est pas le TLR9, ou du moins pas seulement le TLR9. Ces publications sont donc à considérer avec précaution.

Nous évoquons ici plusieurs études impactées dans la mesure où elles mettent en évidence un marquage des anticorps anti-TLR9 utilisés à la surface des cellules.

Une étude datant de 2004 publie les résultats d'un marquage de cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-TLR9 humain provenant des sociétés Imgenex (Novus Biologicals) et de chez eBiosciences. Les noms des clones ne sont pas précisés. Ces anticorps se fixent à la surface de cellules mononucléées du sang CMH-II⁺CD19⁻CD11c⁺ et ou CD14⁺. L'intensité de marquage augmentait de quatre fois suite à la stimulation *in vitro* des cellules par du LPS (Eaton-Bassiri et al., 2004).

Un autre article publié en 2004 rapporte un marquage du TLR9 la surface de monocytes suite à l'infection par *Yersinia pestis*, ainsi que suite à une stimulation au CpG-ODN grâce à l'utilisation d'anticorps provenant des sociétés ActivMotiv et eBiosciences mais les noms des clones utilisés ne sont pas indiqués (Saikh et al., 2004).

Une étude publiée en 2005 rapporte un accrochage de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de rat eB72-1665 à la surface de LB du sang périphérique, majoritairement sur les LB à l'état basal (Dasari et al., 2005).

En 2006, une autre étude rapporte un marquage de surface sur PBMC ou LB du sang périphérique à l'aide d'un anticorps produit par la société Biocarta et dirigé contre la séquence allant de l'acide aminé 268 à l'acide aminé 284 du TLR9 humain (Baiyee et al.).

Enfin, une étude très intéressante publiée en 2017 montre un marquage du TLR9 murin à l'aide d'un anticorps anti-TLR9 monoclonal nouvellement conçu, appelé NaR9. Ce marquage a été caractérisé à l'aide d'un modèle murin délété pour le gène du TLR9. Cet anticorps a eu pour effet d'inhiber la production cytokinique *in vitro* induite par du CpG-ODN de type B associé à de la D-(+)-galactosamine des macrophages dérivés de la moëlle osseuse et par des cellules dendritiques conventionnelles chez la souris (Murakami et al., 2017). En revanche, aucun marquage de TLR9 à la surface n'a été remarqué à l'aide de cet anticorps sur les LB murins de la rate.

L'étude du TLR9 sans anticorps

Dans notre travail de thèse, nous avons apporté la démonstration que 5 anticorps anti-TLR9 humain ne sont pas performants pour son étude. L'étude du TLR9 murin ne semble pas davantage aisée. En effet, en 2013 dans une revue publiée dans le *Journal of immunoassay*, les auteurs indiquent que « l'étude [...] du TLR9 [...] grâce à la transduction rétrovirale d'un TLR9 tagué en C-terminal dans des cellules RAW 264.7 est [...] nécessaire dans la mesure où les anticorps dirigés contre le TLR9 murin ne sont pas spécifiques du TLR9 murin » (Leifer et al., 2013).

A l'heure actuelle, l'étude du TLR9 est confrontée à des biais techniques qui empêchent l'étude directe de la protéine dans son état physiologique. Des avancées majeures dans la compréhension de la structure et du fonctionnement du TLR9 ont quand même pu être réalisées

en s'affranchissant de l'utilisation de ces anticorps. De manière non exhaustive, nous allons citer quelques études clé du TLR9 ayant utilisé des approches sans anticorps.

PROTEINES DE FUSION

La majorité des informations dont nous disposons à propos de la localisation du TLR9 est issue d'études utilisant des protéines de fusion. Lorsque le TLR9 est tagué, soit par une protéine fluorescente, soit par une protéine pour laquelle nous disposons d'anticorps fiables, il est alors possible de suivre la protéine chimérique. Par microscopie, il a ainsi été possible de démontrer la colocalisation du TLR9 avec son ligand CpG-ODN fluorescent à l'intérieur des cellules (Takeshita et al., 2001) à l'aide d'un TLR9 tagué par une hémagglutinine fusionnée en N terminal. De la même manière, il a pu être montré que le CpG-ODN induit le recrutement de MyD88 dans les endosomes d'où le TLR9 induit sa signalisation (Ahmad-Nejad et al., 2002). Finalement, la localisation exacte du TLR9 a pu être décrite grâce à la fusion directe du TLR9 à une *green fluorescent protein* (GFP) (Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004).

Une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire du TLR4 associé au domaine transmembranaire et au domaine TIR du TLR9 a été générée. Cette protéine, au lieu de s'implanter dans la membrane plasmique, localisation finale du TLR4, se localisait dans les compartiments intracellulaires à l'instar du TLR9. Ainsi, l'importance de ces deux domaines dans le trafic du TLR9 a été mise en évidence. Pour aller plus loin, une étude a généré un TLR4 contenant un motif de 14 acides aminés dans sa queue cytoplasmique, motif généralement associé à la queue cytoplasmique du TLR9. Ce motif riche en résidus tyrosine-base suffit à relocaliser le TLR4 à l'intérieur de la cellule (Pelka et al., 2014).

Un TLR9 chimérique a également pu être produit dans la lignée RAW264.7 de macrophages murins et dans des macrophages et cellules dendritiques primaires dérivés de la moelle osseuse de souris déficientes en TLR9. Il a ainsi été possible d'étudier les évènements protéolytiques qui régulent la fonction du TLR9. De même, il a été possible de faire exprimer un TLR9 chimérique dont la localisation finale était la membrane plasmique, ce qui conduisit les souris à développer de l'autoimmunité (Ewald et al., 2008). De même, une transduction rétrovirale dans une lignée lymphocytaire B a permis de montrer que les protéines chaperonnes gp96 et CNPY3 jouent un rôle dans le repliement tridimensionnel du TLR9 (Ewald et al., 2011).

MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES : LA PHOSPHORYLATION

Suite à la liaison de son ligand, il a été montré que le TLR9 subit une phosphorylation de ses tyrosines. Cette phosphorylation sur le motif riche en résidus tyrosine contenu dans la queue cytoplasmique du TLR9 semble nécessaire à la production de TNF mais pas à la production d'IFN de type I en aval de la signalisation par le TLR9. Cela a été montré grâce à des mutations ponctuelles dans ce motif, générant des cellules qui n'étaient plus capable de produire du TNF (Pelka et al., 2014) en réponse à une stimulation par des CpG-ODN.

Plus tard, il a été montré que les familles de kinases Src et Tec sont importantes pour cette phosphorylation. Une étude conduite sur un modèle levure a permis de mettre en évidence que la kinase Btk interagit avec le domaine cytoplasmique du TLR9 (Chockalingam et al., 2012).

ANALYSE DE LA GLYCOSYLATION

La glycosylation est un processus enzymatique qui consiste en l'ajout d'un groupement glucidique sur une molécule. Dans les cellules, la glycosylation d'une protéine peut jouer sur sa circulation à l'intérieur de ces cellules, ainsi que sur sa fonction. Il existe plusieurs types de glycosylations dont la N-glycosylation qui débute dans le réticulum endoplasmique, et la O-glycosylation qui a lieu uniquement dans l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, les résidus mannoses sont enlevés et les résidus N-acetylglucosamine sont ajoutés. L'endoglycosidase H n'est pas en mesure de réaliser de clivage des groupements glucidiques ajoutés dans le *cis*-Golgi. La déglycosylation des protéines à l'aide de cette enzyme permet donc d'identifier la nature des groupements glucidiques qu'elle porte, et donc de renseigner sur une partie de sa circulation intracellulaire.

Le TLR9 est en majorité sensible à la digestion par l'EndoH, et présente 12 sites de N-glycosylation (Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004). Six à 13% du TLR9 total restent cependant insensibles à ce traitement enzymatique. Cela nous indique que le TLR9 peut également traverser l'appareil de Golgi. Il y passe avant de trouver sa localisation finale dans les endolysosomes LAMP-1⁺ (Chockalingam et al., 2009).

ANALYSE EN PULSE-CHASE

L'analyse en *pulse-chase* permet l'étude d'un processus cellulaire ayant lieu au cours du temps. Elle consiste en l'incubation des cellules avec un précurseur marqué par de la

radioactivité puis un précurseur non marqué, dit « froid ». La radioactivité est incorporée par le précurseur marqué qui participe à la formation d'une protéine impliquée dans le processus cellulaire que l'on souhaite étudier. Cette technique apporte une information clé sur la cinétique de *turnover* et de maturation des protéines.

Grâce à cette technique, il a été montré que la demi-vie du TLR9 est de 8 heures (Leifer et al., 2004). Il a également été renseigné par cette technique qu'une faible quantité de TLR est maintenue en permanence dans les cellules et une proportion encore plus faible de ces TLR circule vers les endosomes (Chockalingam et al., 2009). On sait également grâce à cette approche que le TLR9 subit une maturation protéolytique dans les endosomes (Ewald et al., 2008; Park et al., 2008).

TEST DE CLIVAGE PROTEOLYTIQUE A LA FURINE

La furine est une peptidase localisée dans le réseau *trans*-Golgien et à la surface cellulaire. Elle réalise le clivage de sites spécifiques sur des protéines qui circulent donc à travers le trans-golgi ou qui arrivent à la membrane plasmique.

Le TLR9 natif ne contient pas de site de clivage à cette enzyme mais, grâce à la réalisation d'une protéine chimérique TLR9 exprimant un tag hémagglutinine en N-terminal et un site de clivage à la furine, il a été possible de suivre le TLR9 et de confirmer qu'une partie du TLR9 est capable de traverser l'appareil trans-Golgien (Chockalingam et al., 2009).

“ Les anticorps sont la bête de somme des expérimentations biologiques mais ils polluent le domaine avec de fausses découvertes” (Baker, 2015)

De plus en plus d'études mettent en évidence la difficulté de certains anticorps commerciaux à cibler la protéine contre laquelle ils sont générés (Gilda et al., 2015; Weller, 2016).

Une étude publiée en 2008 compare 5436 anticorps dirigés contre des protéines humaines et obtenues de 51 vendeurs commerciaux différents (Berglund et al., 2008). Mille quatre cent dix anticorps monoclonaux et 1316 anticorps polyclonaux ont pu être validés par une méthode standardisée. Cela n'a pas été le cas de l'autre moitié des anticorps testés.

Pour valider un anticorps, il est nécessaire de savoir s'il cible son antigène de manière spécifique ou s'il reconnaît également une ou plusieurs autres cibles. Il est également nécessaire de savoir si sa spécificité sera maintenue dans le temps. Cette reconnaissance dépend du contexte et de l'application que l'on en fait (Hjelm et al., 2011).

Les informations accompagnant les anticorps sont parfois limitées, ce qui constitue un autre problème. Dans notre cas particulier, plusieurs irrégularités ont été trouvées dans les fiches d'information accompagnant les anticorps anti-TLR9 humains. D'une manière générale, il n'est pas rare de voir certains anticorps être validés grâce à la détection de protéines recombinantes ou de protéines chimériques. Comme nous l'avons montré, cibler les protéines natives provenant de cellules non stimulées représenter un défi tout particulier. D'un lot à l'autre, les anticorps commerciaux ne sont pas nécessairement testés, et leur efficacité n'est pas redémontrée. Si les anticorps polyclonaux sont relativement fonctionnels d'une application à l'autre et leurs marquages reproductibles d'un lot à l'autre, ce n'est pas le cas des anticorps monoclonaux. Cette « crise » de reproductibilité a été décrite dans un article récent publié dans le journal *Nature* qui met en garde les utilisateurs des anticorps commerciaux, et les encourage à réaliser des tests de validation à chaque acquisition de nouveaux lots (Baker, 2015).

En 2017, une équipe publie que les anticorps dirigés contre le récepteur bêta aux œstrogènes, cible potentielle de thérapies contre le cancer du sein, ne sont pas fiables (Andersson et al., 2017). En 2016, une autre équipe établit que les anticorps dirigés contre la protéine IRF5 ne sont pas fiables (Li et al., 2016). En 2018, une revue trace un bilan terrible à propos des anticorps commerciaux (Goodman, 2018). Pour certains, ils sont l'origine d'une grande perte de temps et d'argent parce qu'ils induisent des résultats erronés (Baker, 2015).

Finalement, certaines publications se concentrent sur une méthode de validation de ces anticorps (Bradbury and Plückthun, 2015; Stadler et al., 2012; Uhlen et al., 2016; Voskuil, 2014, 2017; Weller, 2018). Ils conseillent dans un premier temps d'obtenir un maximum d'informations à propos de l'anticorps en lui-même, sa structure, sa clonalité, sa cible antigénique, sa constante d'affinité, sa concentration, la présence d'additifs, ses modes de conservation et sa stabilité (Weller, 2016, 2018). Un schéma de méthode de validation standardisé a été publié (figure 51) (Pauly and Hanack, 2015) (figure 51).

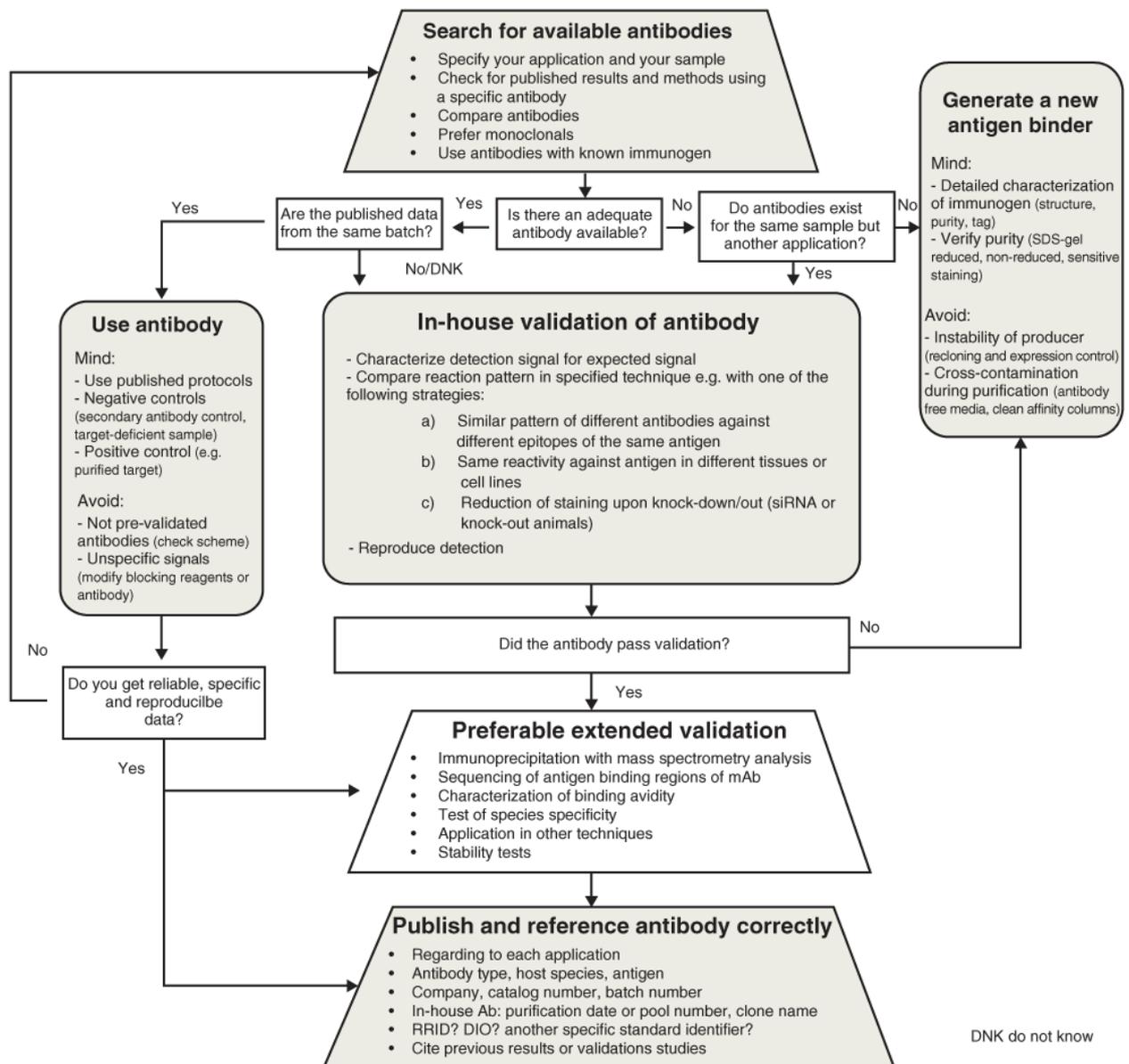


Figure 51 : Guide étape par étape de validation des anticorps

Un projet international d'échange d'informations sur les anticorps commerciaux a été lancé : le projet MIAPAR (*Minimum Information About a Protein Affinity Reagent*) (Bourbeillon et al., 2010) (figure 52). Il s'agit d'une proposition de partage d'informations à propos de la production et des propriétés des anticorps commerciaux ou non commerciaux, afin de les rendre accessibles à tous les utilisateurs. Le but est également de rendre facilement accessible l'ensemble des résultats obtenus par les laboratoires de contrôle qualité ainsi que les utilisateurs,

afin de pouvoir mettre en regard facilement l'efficacité des anticorps et les conclusions publiées dans la littérature (figure 52).

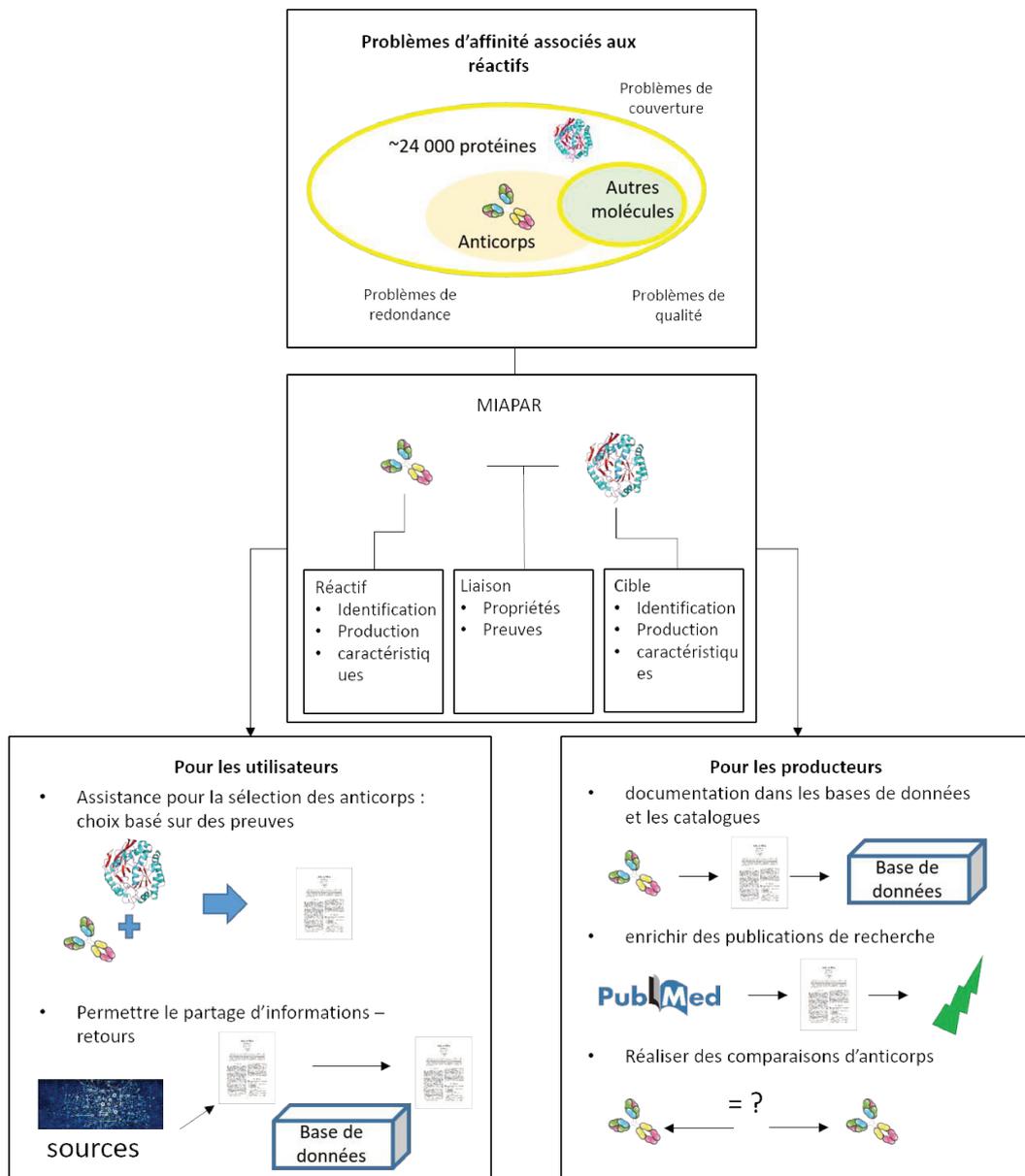


Figure 52 : Projet Minimum Information About Protein Affinity Reagent (MIAPAR)

L'objectif du projet MIAPAR est de permettre aux utilisateurs d'anticorps de faire des choix avisés de réactifs et d'avoir accès aux informations concernant notamment la bonne manière de les utiliser et les résultats déjà obtenus à l'aide de ces anticorps.

CONCLUSION GENERALE

Le TLR9 est une protéine du système immunitaire inné qui joue un rôle clé dans le développement d'une réponse immunitaire adaptative. Notamment exprimée par les LB chez l'Homme, elle peut induire le développement d'un caractère régulateur de l'inflammation de ces cellules. Déficiante ou mutée dans des modèles animaux, elle peut conduire à une hyperinflammation, à des pathologies autoimmunes et à la mort. Son étude est donc capitale dans le but de développer de nouvelles thérapies contre ces maladies.

L'étude d'une protéine au laboratoire peut passer par des techniques requérant l'utilisation d'anticorps. Il existe également des techniques s'en affranchissant. Or, pour étudier la protéine dans son état physiologique, il est préférable de disposer d'anticorps spécifiques de cette cible.

Au sein du laboratoire, un anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 a été utilisé en culture en présence de LB extraits d'amygdales humaines. Sa cible est localisée à la membrane plasmique dans les radeaux lipidiques en présence du BCR. Cet anticorps a eu pour effet d'induire un changement phénotypique de ces LB qui ont adopté un profil activé et ont proliféré. De plus, il a été montré que cette activation bloque l'effet du CpG-ODN qui, stimulant le TLR9 dans les endosomes, rend les LB régulateurs.

Dans notre travail, nous avons montré que l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris 26C593.2 ainsi que quatre autres anticorps anti-TLR9 ne sont pas spécifiques de leur cible. En s'inspirant de méthodes de validation standardisées, nous avons réalisé une étude critique visant à les caractériser. Quatre anticorps sur cinq sont capables de reconnaître le TLR9 recombinant produit dans le germe de blé, et deux anticorps sur cinq sont capables de reconnaître le TLR9 tagué par une hémagglutinine et surexprimé dans les cellules de la lignée rénale HEK293. Aucun d'entre eux n'est en revanche capable de cibler le TLR9 physiologique.

En cours de soumission, nous espérons que notre étude permettra d'informer les équipes intéressées des limites de ces anticorps, afin d'éviter la dispersion d'informations erronées obtenues à l'aide de ces anticorps qui ralentissent des avancées scientifiques nécessaires.

Annexe 1

Detection of toll-like receptor 9 (TLR9):

Dealing with antibodies' specificities

**Marie Cumin,¹ Laetitia Le Pottier,¹ Kahina Amrouche,¹ Jacques-Olivier Pers,¹ and
Christophe Jamin^{1,2}**

¹Lymphocytes B et AutoImmunité, UMR1227, Univ Brest, INSERM, Brest, France

²Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie, CHRU Morvan, Brest, France;

Correspondence: Dr Christophe Jamin, Immunologie, INSERM UMR1227, CHRU Morvan,
BP824, F29609, Brest, France; Tel: +332 98 22 33 84; christophe.jamin@univ-brest.fr

Toll-like receptor 9 (TLR9) is a member of the TLR innate immune receptors. TLR9 has been extensively studied for its role in the activation and orientation of antigen presenting cells such as dendritic cells, monocytes, but also B cells. Its critical role has been demonstrated in several pathological situations and specifically in autoimmune diseases. As a prototypic example, TLR9 signalling pathway is deficient in B cells from systemic lupus erythematosus patients contributing to the development of autoreactivity. To study function, expression and localisation of TLR9, a large number of antibodies are commonly used. In the present work, we show that five commercial monoclonal and polyclonal antibodies are not specific for TLR9 and recognize unidentified antigens in TLR9-negative cells. To circumvent the specificity aspect, we have constructed a chimeric TLR9 protein expressing a hemagglutinin tag at its C-terminal region for the transfection of TLR9-negative cells. Three anti-TLR9 antibodies efficiently target this overexpressed construction but all the five antibodies also target other molecules. This approach allowed us to demonstrate that some anti-TLR9 antibodies do not specifically recognize TLR9 and bind to other proteins. Caution should thus be taken in the interpretation of TLR9 function, expression and localisation when using anti-TLR9 antibodies.

Introduction

Toll-like receptors (TLRs) belongs to a family of type I transmembrane glycoproteins composed of an extracellular domain, a transmembrane domain and an intracellular domain. The extracellular domain is made of leucine-rich repeat (LRR) structural motifs. Modeling and crystallography studies show that these motifs form a “horseshoe” structure whose concave surface is directly involved in the recognition of ligands. The intracellular domain contains a conserved region of approximately 200 amino acids called the Toll/IL-1R (TIR) domain. The TIR domain enables signal transduction thanks to its interaction with various cytoplasmic proteins ¹. TLRs are receptors of the innate immune system. They form the Pattern Recognition Receptors (PRR) family that has been the most thoroughly described. They are able to recognize and detect a wide variety of microbial molecular motifs, the Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). However, TLRs can also be activated by self molecules that are released during aggressions or tissue damage, the Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). The purpose of TLRs, like other PRR, is to create a signal, called a danger signal. This danger signal is not only required to initiate an adaptive immune response, but also to regulate and direct it, for instance towards a Th1 or Th2-type response. Therefore, TLRs are positioned at the interface between innate and adaptive immunity ²⁻⁴.

Most TLRs are localized in the plasma membrane but some are localized in the endosomes where they recognize internalized nucleic acids. Among them, the TLR9 binds unmethylated CpG dinucleotide repeats of the bacterial or viral genomes ^{5,6}. As opposed to microbial nucleic acids, self nucleic acids do not normally have access to

these compartments. The specific subcellular location of these TLRs impedes their activation by the nucleic acids of the host ⁷.

In humans, TLR9 is almost exclusively expressed by plasmacytoid dendritic cells (pDC), monocytes and B lymphocytes. Stimulation of TLRs in pDC or monocytes triggers the secretion of chemokines attracting immune system cells, of proinflammatory cytokines, and of cytokines that orient the adaptive response towards the Th1-type or Th2-type response ^{8,9}. Specifically, TLR9 activation of pDCs induces type I IFN production, notably IFN- α , that plays a major part in the antiviral response but also in some systemic autoimmune diseases ². The activation of TLRs expressed by B cells potentializes the T-independent and T-dependent immune responses. For the T-dependent immune response, it brings what Lanzavecchia calls a "third signal" that sets the stage for an efficient humoral response with the other two signals being the antigen and the interaction with the CD4+ T cells leading to the production of antibodies and proinflammatory cytokines and interferons ^{10,11}. The B cell receptor (BCR) involvement renders B cells sensitive to TLR ligands providing efficient endocytosis of the intracellular TLR ligands ¹². Thus, TLR9 moves from the early endosomes where it is found at basal level to the late endosomes where its concentration increases. There, it co-localizes with the BCR, its antigen and therefore possibly with microbial DNA ^{13,14}. BCR stimulation also enables an increase in the MyD88 and TLR9 mRNA expression levels. Even though this has yet to be confirmed at the protein level, this would suggest that BCR engagement could increase TLR expression ^{15,16}.

Depending on the maturation stage of the B cells, *in vitro* stimulation of TLR9 using synthetic ligand (CpG-ODN) induces a response leading to the production of

antibodies and proinflammatory cytokines and interferons. Thus, the stimulation of human memory B cells by TLR9 is much striking than that of naive B cells^{17,18}. The difference could be due to higher levels of TLR mRNA expression in memory B cells¹⁵, but this has not been confirmed at the protein level¹⁹.

Finally, a link has been established between TLR9 and autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), the characteristics of which is the production of autoantibodies directed against immune complexes containing autoantigens associated with endogenous DNA. *In vitro* activation of anti-IgG B cells by immune complexes, *i.e.* antibody-antigen complexes, is possible if they contain self-DNA, and that the co-signal carried by DNA is transmitted by TLR9²⁰. Thus, notwithstanding its low level of unmethylated CpG motifs, mammalian DNA is able to activate the TLR9 when concentrated in endosomes thanks to the BCR-triggered endocytosis. A similar mechanism operates in anti-DNA B cells, whose stimulation is also TLR9-dependent²¹.

The comprehension of those mechanisms has opened exciting therapeutic perspectives in autoimmune diseases but also in vaccination or cancers²². However, the extensive investigations performed for many years to study TLR9 expression, localization and function are commonly based on the utilization of monoclonal and polyclonal anti-TLR9 antibodies. As part of our approach, concerns with the efficacy of anti-TLR9 antibodies have been noted. In this work, we have evaluated several anti-TLR9 antibodies to raise user awareness of their limits and caution that should be used in the scientific conclusion based on the data reached with these antibodies.

Results

TLR9 mRNA is expressed in monocytes and B cells but not in T cells or epithelial cells

TLR9 is a gene preferentially expressed by the cells of the immune system, mainly by antigen presenting cells. In humans, it is found in plasmacytoid dendritic cells but also in B cells. Using human cell lines and primary human B cells and T cells, we have confirmed the *TLR9* preferential expression in the immune system cells. Quantitative expression analyses of the *TLR9* transcript (Figure 1A) show that, if the U937 monocytic cells are those which express the higher amount, the B cells also express strongly *TLR9* mRNA but at variable levels. Thus, the DAUDI and RAMOS B-cell lines express respectively 2 and 2.5 times more *TLR9* transcripts than the primary B cells. T cells produce very low levels of *TLR9* transcripts, about 9.5 times less than B cells. Conversely, in the renal HEK293 cell lines and HSG epithelial cell lines, the transcripts of this receptor are not detectable. These cells will serve as a negative control for further experiments and the detection of the *TLR9* protein.

Anti-TLR9 antibodies do not seem able to fix their target in flow cytometry

Five commercially available anti-*TLR9* antibodies were tested in this study (Table 1). In order to calibrate the flow cytometry stainings, prior experiments were performed to determine the optimal amounts to be used for each antibody. We have made simple staining after permeabilization with FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal antibody, PE-conjugated eB72-1665 rat monoclonal antibody, A488-conjugated sheep polyclonal antibody, and 1E4 mouse monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody revealed by a FITC-conjugated anti-globulin, on RAMOS B-cell line, on cells of the HEK293 kidney line and on freshly isolated peripheral blood T cells

(Figure 1B). Fluorescence is positively detected on all three cell types with the five anti-TLR9 antibodies (Table 2). With regard to the expression of the TLR9 mRNA, these results suggest a nonspecific binding of the five anti-TLR9 antibodies in the HEK293 cells and in the T-cells, and consequently do not allow us to assert the specificity of the signals detected in the RAMOS B cells.

In order to evaluate the specific binding of the antibodies in the RAMOS B cells, we performed competition experiments with CpG-ODN whose saturated binding concentration was determined in prior experiments with FITC-conjugated CpG. Thus, following fixation and permeabilization, the cells were incubated with 3 μ M of unconjugated CpG. After washing, they were incubated with anti-TLR9 antibodies as above and analyzed on the flow cytometer (Figure 1B). Pre-incubation of the cells with CpG-ODN decreases, but not completely prevent, the fluorescence in the RAMOS B cells for the five anti-TLR9 antibodies (Table 2). However, the T-cell stainings are not clearly affected and remain somehow at the same level after CpG saturation, whereas those of the HEK293 cells are even more intense for some antibodies. Overall, these results indicate that the binding of anti-TLR9 antibodies in RAMOS B cells specifically targets TLR9, but suggest also that the antibodies recognize another target as well. The persistent fixation in the T cells and in the HEK293 cells without the presence of the TLR9 protein, confirms a non-specific recognition of the anti-TLR9 antibodies.

TLR9 protein is hardly detectable in Western Blot using anti-TLR9 antibodies

As TLR9 is a faintly expressed transmembrane protein mainly located in intracellular endosomes, isolating TLR9 for Western Blot studies can be a particular challenge. We wanted to determine the molecular weight of the anti-TLR9 antibody

targets and compare this with that expected of the TLR9 protein. According to its sequence, a 160kDa band corresponding to a complete glycosylated form of TLR9 is likely to be identified. The unglycosylated complete form should generate a band around 113kDa, while the cleaved form is expected to be detected at the size of 60kDa. We have carried out Western Blot experiments on HEK293 kidney cells and RAMOS B cells using different lysis buffers with various detergent properties whose compositions are detailed in the Methods section. The lysates were centrifuged at high speed (10,000g) and the supernatants harvested and assayed using a BCA kit. The same amount of proteins was deposited on each well of the polyacrylamide gel. After transfer, the PVDF membranes were incubated with each of the five anti-TLR9 antibodies tested. The results are shown in Figure 2. Proteins of identical molecular weight and thus non-specific to the TLR9 protein are detected in the protein lysates of the HEK293 cells and the RAMOS cells with all the antibodies except for the 1E4 mouse monoclonal antibody. The 1E4 Mouse monoclonal antibody (370-473 epitope) specifically detects a 60kDa band in RAMOS B cells when proteins are extracted with N-dodecyl buffer, a 110kDa band when proteins are extracted with Brij96, Triton X100 and N-dodecyl buffers, but does not detect a 160kDa form regardless of the lysis buffer used. The 26C593.2 mouse monoclonal antibody (268-300 epitope) detects only a 160kDa band when the proteins are extracted with Triton X100 buffer. The eB72-1665 rat monoclonal antibody (273-288 epitope) detects a faint 110kDa band and a clear 145kDa band in the protein lysate extracted with Triton X100 and N-dodecyl buffers. Rabbit polyclonal antibody (771-870 epitope) specifically detects a 60kDa band in RAMOS B cells when proteins are

extracted with Brij96 buffer but it is weaker detected with other buffers. The overall results are summarized in Table 3.

In order to confirm the ability of a specific recognition of the anti-TLR9 antibodies by Western Blot, we repeated the experiment using recombinant human TLR9 produced from the complete ORF of human TLR9 in wheat germs. We performed the migration on SDS PAGE denaturing gel of an unreduced recombinant TLR9 sample and a reduced sample by heating at 95°C in the presence of beta-mercaptoethanol. The gel was then stained with Coomassie blue (Figure 3A). The results indicate a band at the expected molecular weight of about 113kDa, no band at the molecular weight of 160kDa, but several other bands at molecular weights that may correspond to unglycosylated cleaved forms (50kDa and 70kDa). Bands of molecular weight below 50kDa are also visible which may correspond to fragments of the complete and/or cleaved forms. It therefore seems that the content of the recombinant TLR9 is not completely homogeneous. Migration of the recombinant TLR9 into an SDS-PAGE gel under denaturing and reducing conditions was followed by Western Blot visualization using all the monoclonal and polyclonal anti-TLR9 antibodies tested (Figure 3B). No 160kDa band was revealed by any of the antibodies. The mouse monoclonal antibodies, 1E4 and 26C593.2, the rat monoclonal antibody eB72-1665 and the polyclonal sheep antibody reveal an 110kDa molecular weight band. In contrast, the polyclonal rabbit antibody does not reveal any bands. Monoclonal antibodies of mice (1E4) and rats (eB72-1665), as well as the sheep polyclonal antibody also reveal a band at 60kDa, in contrast to the 26C593.2 mouse monoclonal antibody. Curiously, these 3 antibodies also reveal two bands around 70kDa and 90kDa.

All these experiments allow us to conclude that the anti-TLR9 antibodies can recognize by Western Blot the non-glycosylated recombinant TLR9 protein produced in a plant system, but are not capable of systematically recognizing the physiologically glycosylated human TLR9 protein expressed by the RAMOS B cells. This is probably due to a difference in glycosylation between the recombinant TLR9 and the natural TLR9. TLR9 is a protein with seven N-glycosylation sites distributed throughout the protein. They are the only difference between physiological TLR9 and recombinant TLR9. It is possible that these post-translational modifications result in conformational and accessibility changes of the different epitopes which consequently may alter the ability of the different antibodies to recognize the physiological form of human TLR9.

The anti-TLR9 monoclonal antibodies tested are not capable of TLR9 immunoprecipitation

Since Western Blot conditions change the three-dimensional conformation of proteins, this protocol may alter the recognition capacity of the antibodies. This is why we wanted to study the ability of anti-TLR9 antibodies to recognize their target in natural conformation with an immunoprecipitation approach. We performed an extraction of total RAMOS B-cell and HEK293 renal cell proteins using Brij96 lysis buffer. These proteins were then immunoprecipitated with the different anti-TLR9 antibodies and then separated according to their molecular weight on a polyacrylamide gel under denaturing and reducing conditions, transferred onto a PVDF membrane and then revealed with Coomassie Blue (Figure 4). Based on the amino acid sequence of the TLR9 protein, 113-160kDa-sized bands for the complete and glycosylated forms are expected, while the presence of the cleaved N-terminal fragment of the TLR9 protein is revealed by a band size of 60kDa²³⁻²⁵. Bands of different molecular weight which do not correspond

to the expected sizes are observed in the immunoprecipitates of RAMOS B cells and of HEK293 cells with all antibodies. Among the expected sizes specifically revealed in RAMOS B-cell immunoprecipitates, the 1E4 antibody (370-473 epitope) and, in a weaker proportion, the 26C593.2 antibody (268-300 epitope) immunoprecipitate a band at 160kDa and a band at 110kDa. The eB72-1665 antibody (273-288 epitope) does not immunoprecipitate any specific band. A faint 160kDa band is immunoprecipitated with the rabbit polyclonal antibody (771-870 epitope). The sheep polyclonal antibody (64-189 epitope) immunoprecipitates a faint band at 160kDa and another one at 110kDa. These bands may correspond to the complete and glycosylated forms, whereas the N-terminal cleaved fragment of the TLR9 protein does not seem to be immunoprecipitated.

Molecular cloning of TLR9 with a HA tag provides a reliable positive control and a good support for studying human TLR9 characterization

In order to have an alternative positive control for our experiments, we created a TLR9 fusion protein tagged with a haemagglutinin (HA). For this, the sequence of a HA tag was cloned into the ORF C-terminal of the human TLR9 gene in a pcDNA3.1 Zeo(+) plasmid. The pcDNA3.1-TLR9-HA plasmid obtained was transfected with Lipofectamine 3000 into cells of the HEK293 line. An empty plasmid served as a negative control. Flow cytometric analysis using a FITC-conjugated anti-HA antibody showed the transfection efficiency and the tagged TLR9 protein expression in HEK293 cells after three days of culture (Figure 5A). The transfected HEK293 cells were lysed with Brij96 lysis buffer. Protein lysates were analyzed by Western blot using an anti-HA antibody revealed by a secondary anti-globulin coupled with the HRP (Figure 5B). A single band between 100 and 150kDa in size was detected, confirming the expression

of the tagged TLR9 following transfection. The same protein lysates were analyzed in the presence of the different anti-TLR9 antibodies, revealed with secondary antibodies coupled to the HRP. The eB72-1665 clone (273-288 epitope not containing N-glycosylation sites) correctly detects the tagged TLR9 protein, as does the polyclonal sheep antibody (64-189 epitope containing an N-glycosylation site). In contrast, the 26C593.2 clone (268-300 epitope, containing an N-glycosylation site) and the polyclonal rabbit antibody (771-870 epitope containing no N-glycosylation sites) do not recognise the tagged TLR9 protein. Glycosylation does not appear to be responsible for the lack of recognition of TLR9 protein by anti-TLR9 antibodies. It is rather the conformation of the protein that probably favors the binding quality of the antibodies to their target.

U937 electroporated premonocytes in the presence of pcDNA3.1-TLR9-HA demonstrate the TLR9 localization in the endosomes and in plasma membrane

After electroporation in the presence of pcDNA3.1-TLR9-HA plasmid, the U937 monocytic cells were grown for a further 48h, the cells were harvested, labelled with anti-HA.11-biotin antibody revealed with streptavidin-RRX and then observed under an epifluorescence microscope. Since premonocytes have the protein machinery necessary to traffic TLR9 in the cell, it was possible to observe TLR9-HA in its location. We are able to confirm that the intracellular location of the TLR9-HA and we may note that part of the TLR9 also appears to be expressed in the plasma membrane (Figure 5C).

Western blot detection of TLR9 from protein extracts enriched with membrane fractions is not possible

We have recently demonstrated a binding of anti-TLR9 antibodies on the plasma membrane of B cells, suggesting the presence of TLR9 on the surface of B cells²⁵. We have also observed that FITC-CpG binding on the surface of B cells is independent of the target recognized by anti-TLR9 antibodies. In order to characterize this target and to verify if it is indeed the TLR9 protein expressed on the surface of the B cells, we have separated the protein extracts of the RAMOS B cell line according to their location through the use of a cell fractionation kit. The controls confirm the enrichment expected in each fraction after fractionation (Figure 6A). GAPDH is detected in the F1 fraction enriched in cytosol proteins but not in the F2 fraction enriched in membrane proteins. The F3 fraction contains the histone H3 nuclear proteins, which are not detected in the F4 fraction enriched in cytoskeleton proteins. Two equivalent bands revealed by an anti-CD20 antibody are detected in the total protein extract and in the F2 fraction confirming the enrichment of the membrane protein in this fraction (Figure 6B). Proteins from the total extracts and proteins from the F2 fraction were transferred to PVDF membranes after migration and incubated in the presence of anti-TLR9 26C593.2 mouse and eB72-1665 rat clones as well as polyclonal rabbit and sheep antibodies (Figure 6B). The 26C593.2 clone detects a single protein of about 100kDa, of the same size as that detected in the total protein extract. The eB72-1665 clone faintly detects this protein in the total protein extract but not in the F2 fraction. The rabbit polyclonal does not detect this protein in the total extract nor in the F2 fraction. Finally, the sheep polyclonal detects this protein in the total protein extract but not in the F2 fraction. Although the molecular weight is slightly lower than expected, these results suggest that the complete

unglycosylated TLR9 protein is present in the RAMOS B-cell membrane. Its recognition seems possible only with the 26C593.2 monoclonal antibody.

Discussion

TLR9 is a receptor at the frontier between innate and adaptive immune responses directed against the bacterial genome recognizing unmethylated CpG motifs. Chaperoned by the protein UNC93B1, TLR9 leaves the endoplasmic reticulum for the Golgi apparatus and the endolysosomes where it is enzymatically cleaved by cathepsins at acidic pH. This cleavage reduces its molecular weight near 130kDa to two fragments of 60kDa and 70kDa ²⁴ and is required to be functional.

Numerous studies have been performed using anti-TLR9 antibodies to better understand the localization and functions of the TLR9 proteins. Flow cytometry approach with two different fluorescence-conjugated anti-TLR9 antibodies, for which the clone name have not been mentioned, have suggested the presence of TLR9 in CMH-II+ CD19- CD11c + and CD14+ peripheral blood mononuclear cells ²⁶. The staining intensity was four-fold increased after LPS stimulation, indicating that TLR9 expression is dependent on the activation status of the monocytes. Another study has reported a TLR9 staining on the surface of monocytes following infection by *Yersinia pestis*, as well as following stimulation with CpG-ODN ²⁷. Again, the anti-TLR9 clone identities were not given. The interpretation of the results was that increased expression of TLR9 on the surface of infected cells may serve a role as an activation signal to other cells of the immune system. Another study using the eB72-1665 clone relates the fixation of this monoclonal antibody on human B cells without permeabilisation, and thus concluded to the expression of TLR9 on the B cell surface ²⁸. Later, further phenotypic analysis of

peripheral blood cells revealed the fixation of another anti-TLR9 antibody, developed against synthetic peptides corresponding to the amino acids 268–284 of human TLR9, on the surface of B lymphocytes ²⁹. This fixation was even more increased when the B cells were stimulated by CpG, especially in severely injured patients prone to sepsis patients. The authors concluded that immunosuppression in the early phase after trauma does not appear to be associated with a disturbed sensing of bacterial DNA. More recently, our group also observed the fixation of the 26C593.2 anti-TLR9 monoclonal antibody on the surface of human B cells ²⁵. Furthermore, using *in vitro* experiments, we demonstrated an activation response of the B cells following stimulation with this anti-TLR9 antibody. Interestingly, we could observe an inhibitory effect of the cell surface anti-TLR9 stimulation on the intra-cellular CpG-activation. We concluded that the TLR9 protein expressed on the cell surface could act as a negative regulator of the endosomal TLR9 in B cells ²⁵. Consistent with these conclusions, stimulation of murine DCs with NaR9, a newly established anti-TLR9 monoclonal antibody impaired the *in vitro* CpG-induced production of cytokine ³⁰. Authors concluded that a monoclonal antibody can be seen as a promising tool for therapeutic intervention in TLR9-dependent inflammatory diseases.

Obviously, all these interpretations rely on the specificity of the anti-TLR9 antibodies. Otherwise, nothing can be trustworthy demonstrated. Our results presented in the current work clearly indicate that anti-TLR9 antibodies do not specifically recognize the TLR9 protein. There are arguments in favor of the efficient specificity for some antibodies when using recombinant TLR9 molecule as antigen. But there are also arguments against when looking at the flow cytometry approach, Western blot or

immunoprecipitation analyses on TLR9 mRNA-positive and –negative cells, and when using immunocytochemistry technique on TLR9-HA transfected cells. Anti-TLR9 antibodies recognize also other antigens that remain to be identify questioning the interpretation of the literature.

In conclusion, our results indicate that evaluations of TLR9 expression, localization and function using available anti-TLR9 antibodies are not recommended at this time. These results are in line with the difficulties pointed out by numerous commercial antibodies used for research studies^{31,32}. The majority of the anti-human protein antibodies is not specific and cannot be used to safely interpret the results they generate³³. This reproducibility crisis encourages each user to carry out its own validation tests with each acquisition of new antibodies^{34,35}. The scientific community should strive to adopt consensual procedure for the validation of commercial antibodies^{36,37}, and thus be able to confidently provide reliable scientific information^{38,39}.

Methods

Cell lines culture and lymphocyte purification

The RA-1 human B-cell line derived from Burkitt's lymphoma (RAMOS) and the U937 myelomonocytic line are maintained in RPMI-1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Aldrich) enriched with 10% of decompemented fetal calf serum (FCS) (Eurobio), 2mM of L-Glutamine (Gibco Life Technology), 100µg/mL of penicillin and 200U/mL of streptomycin (Panpharma). The adherent HEK293 cell line derived from human embryonic kidney epithelial cells is maintained in DMEM medium (Dutscher) enriched with the same elements. To achieve the passage of HEK293 cells at 90-95% confluence, cells are resuspended using Trypsin/EDTA (Pan Biotech),

washed in PBS 10% FCS and a fraction is cultured in DMEM medium. All cell types are cultured at 37°C in the presence of 5% CO₂.

The isolation of tonsil mononuclear cells is performed from hypertrophic tonsils of children aged 2 to 15 years old. They are dissected, mechanically ground in PBS and filtered through a 70µm filter (BD Biosciences). The cell suspension is diluted in PBS and separated on a Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (Eurobio). T cells are isolated the rosette technique. Briefly, sheep red blood cells (Merck) are suspended in Alsever solution, washed in PBS, and incubated with Neuraminidase (Sigma Aldrich), allowing the interaction of LFA-3 receptors with the T-cell CD2 receptors. Complexes containing the T cells are isolated with Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. The cell ring and the pellets are recovered and washed in PBS. Both fractions are incubated in an Ammonium/Chloride/Potassium lysis solution (0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH = 7.4) to eliminate the sheep red blood cells. The purity of the cells is then evaluated by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter). The population of B cells is more than 95% pure. The T cells need further enrichment with a human CD19+ Microbead kit (Miltenyi Biotec) used according to the manufacturer's recommendations. The T-cell population is then more than 95% pure.

Quantitative analysis of mRNA expression

Total RNA extraction is performed using the RNeasy Plus MicroKit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Quality and concentration are carried out with the Nanodrop 2000C. After reverse transcription into cDNA, with the Supertranscript II reverse transcriptase, real-time quantitative PCR is performed using the QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the

SYBR® Green PCR Master Mix kit and the RT-PCR Reagents kit (Life Technologies) in MicroAmp tubes (Applied Biosystems). Each reaction is prepared in duplicate and a tube of H₂O serves as a negative control. The reaction takes place in a total volume of 20 µl with 5 µM of sense and antisense primer, 50 ng of cDNA and 10 µl of MasterMix qs 20 µL with H₂O. The program comprises a first step *Hold stage* (50°C for 2 minutes, then 95°C for 10 minutes) then a *PCR Stage* step (40 cycles with 15 secs at 95°C then 1 minute at 60°C) and ends with a dissociation step of the amplified fragments allowing us to obtain the dissociation curve (Melt curve) reflecting the purity of the amplified fragment. . Results are calculated according to the 2- Δ Ct method, with Δ Ct = Ct target gene (RPL13A) – Ct TLR9 gene.

Cloning of the TLR9 tagged with hemagglutinin

The human TLR9 cDNA sequence [NM_017442] obtained from tonsil B-cell cDNA was amplified using the 5'-CCTGTAGCTGCTGTCCAGTC-3' sense primer and the 5'-CTGTGTCAGGTGTGGGGTG-3' antisense primer. They produce a 3263pb sequence. This sequence is inserted into the pCR BLUNT II TOPO vector and amplified by the transformation of One Shot TOP10 bacteria made chemically competent. After screening the selected clones resistant to kanamycin, the plasmid pCR Blunt-II TOPO-TLR9 is purified and its insertion verified. The cDNA obtained is inserted by PCR between the EcoRI and XhoI restriction sites using the 5'-GTACGAATTCCAGCATGGGTTTCTGCCGC-3' sense primer and the 5'-GTACCTCGAGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTCGGCCGTGGTCC-3' antisense primer and then fused with the HA tag in C-terminal. The gel-purified insert is amplified in TOP10 bacteria, the plasmid pCR Blunt TOPO-TLR9-2

purified and the HA tag insertion verified by sequencing. By double digestion with the EcoRI and XhoI enzymes, the insert is transferred from the pCR Blunt-II-TOPO TLR9 vector into the pcDNA3.1/zeo(+) vector. After transformation of electrocompetent NovaBlue bacteria with the ligation product, the amoxicillin resistant clones are selected, verified by PCR and the plasmid purified. For the expression of fusion proteins tagged with the hemagglutinin, 5×10^5 cells of the HEK293 cell line are seeded in 6-well plates 24 hours before transfection using the Lipofectamine®3000 kit (Invitrogen Life Technologies) as recommended by the manufacturer. The cells are then incubated for 48 hours at 37°C, 5% CO₂. They are finally harvested and put on ice before being used. The U937 premonocytes were also cultured and electroporated with 15µg of plasmid in 200µL of PBS containing 10 µM of Hepes buffer using an electroporator at 250kV, 900µF. After a further 36-48h of culture, the cells were analyzed for the study of TLR9 expression and localisation by immunofluorescence and Western Blot.

Flow cytometry

The following antibodies were used: FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9 (Novus Biologicals), PE-conjugated eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9 (eBiosciences), Alexa 488-conjugated sheep polyclonal anti-TLR9 (R&D Systems), rabbit polyclonal anti-TLR9 (Santa Cruz) and 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 (Abnova) revealed with FITC-conjugated anti-globulins (Jackson ImmunoResearch). To evaluate the ability of the anti-TLR9 antibodies to specifically target endosomal TLR9, 2×10^5 RAMOS B cells, HEK293 cells and tonsillar T lymphocytes were washed in PBS and fixed in 4% cold paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes. The cells were washed again with 2ml of cold permeabilisation buffer

containing PBS1X, 1% BSA1, 0.1% saponin and 0.01% azide and resuspended in 50 μ L of this same buffer to carry out the staining. This latter was performed on ice for 30 minutes with antibodies under saturating conditions. The cells were then washed with the permeabilization buffer and suspended in 300 μ L of PBS for analysis with a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). Blocking experiments with 3 μ M CpG-ODN, determined in preliminary experiments using FITC-conjugated CpG-ODN as saturating concentration (not shown), were also carried out by a 30-minute incubation before anti-TLR9 stainings.

Fluorescence microscopy

The electroporated U937 cells were fixed with 10% PFA for 10 minutes and permeabilized as described above for the flow cytometry staining procedure after 48h of post-transfection culture. The cells were then washed and stained with a biotinylated-conjugated anti-HA.11 monoclonal antibody (Cell Signaling) revealed with RRX-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch) associated with a FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9. They were then cytopspined and analyzed by confocal microscopy (TCS-NT Leica) in a drop of anti-fading Vectashield mounting liquid (Vector Laboratories).

Western Blot, cell fractionation and immunoprecipitations

Four different lysis buffer were used: RIPA buffer (50 mM TrisHCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS), Brij96 buffer (25 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0.5% Brij96), Triton X-100 buffer (20 mM TrisHCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM Na⁺pyrophosphate, 1

mM Glycerophosphate, 1 mM Na⁺ orthovanadate), and N-Dodecyl buffer (0.1% N-dodecyl). After washing in cold PBS, 106 RAMOS B cells and HEK293 cells were lysed with buffer freshly enriched with a cocktail of protease inhibitors (Sigma Aldrich) for 1h on wheel in a cold room. The lysate was centrifuged at 10,000g for 15 minutes at 4°C, and the protein concentration in the supernatant was evaluated using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) before being frozen at -20°C for storage for up to 1 month. For polyacrylamide gel electrophoresis migration, 10 to 80µg of protein samples (according to the experiments) were diluted in 2X loading buffer (Tris pH 6.8, 125mM, 4% SDS, 10% glycerol, bromophenol blue), with β-mercaptoethanol for the migration experiments under reducing conditions, and 20 to 40µL per well were separated on 10% polyacrylamide gel. Precision Plus Dual Color Protein Standards (Biorad) were used as control of molecular weight. The samples were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 0.45µm (GE Healthcare) in a Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell system (Biorad) thanks to the passage of 20-Volt current, with fixed amperage during 1h.

For Western Blot experiments, the membranes were saturated with 1X TBS, 0.1% Tween, 5% skimmed milk or BSA for 1 hour with stirring at room temperature, and washed 3 times for 5 minutes in 1X TBS, 0.1% Tween. Hybridization with the anti-TLR9 or anti-HA antibodies was then performed in 1X TBS, 0.1% Tween, 1% skimmed milk overnight at 4°C with stirring. The membranes were then washed 3 times for 5 minutes in 1X TBS, 0.1% Tween, then *Horseradish Peroxidase* (HRP)-conjugated anti-globulins (Jackson ImmunoResearch) were incubated. The revelation was finally performed after washing three times for 5 minutes in 1X TBS using the ECL Advance

reagent (GE Healthcare). The bands were analyzed with the Quantity One software (BioRad).

The ability of anti-TLR9 antibodies to immunoprecipitate TLR9 was evaluated using 50 μ L Dynabeads® Protein G (Invitrogen). The washed beads were gently suspended in 200 μ L of 1X PBS in the presence of 5 μ g of antibodies for incubation for 10 minutes at room temperature on a wheel. After washing three times with 400 μ L of 1X PBS, 500 μ g of protein sample were added into a total volume adjusted to 500 μ L with 1X PBS. The hybridization of the proteins was carried out for 2 hours on a wheel at room temperature followed by three washes with the buffer used for the cell lysis. Finally, the elution of the immunoprecipitation products was carried out by adding the reducing loading buffer and by heating the tubes in a water bath at 95°C for 5 minutes.

References

- 1 Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511, doi:10.1038/nri1391 (2004).
- 2 Delneste, Y., Beauvillain, C. & Jeannin, P. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* **23**, 67-73, doi:10.1051/medsci/200723167 (2007).
- 3 Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305, doi:10.1126/science.1071059 (2002).
- 4 Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9 (1997).
- 5 Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745, doi:10.1038/35047123 (2000).
- 6 Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549, doi:10.1038/374546a0 (1995).
- 7 Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56, doi:10.1038/ni1280 (2006).
- 8 Didierlaurent, A. *et al.* Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* **172**, 6922-6930 (2004).
- 9 Redecke, V. *et al.* Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* **172**, 2739-2743 (2004).
- 10 Pasare, C. & Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* **438**, 364-368, doi:10.1038/nature04267 (2005).
- 11 Ruprecht, C. R. & Lanzavecchia, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* **36**, 810-816, doi:10.1002/eji.200535744 (2006).
- 12 Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* **19**, 268-274, doi:10.1016/j.coi.2007.04.002 (2007).
- 13 Chaturvedi, A., Dorward, D. & Pierce, S. K. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* **28**, 799-809, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.019 (2008).
- 14 O'Neill, S. K. *et al.* Endocytic sequestration of the B cell antigen receptor and toll-like receptor 9 in anergic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6262-6267, doi:10.1073/pnas.0812922106 (2009).
- 15 Bernasconi, N. L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **101**, 4500-4504, doi:10.1182/blood-2002-11-3569 (2003).
- 16 Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. & Mantovani, A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of

- TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* **102**, 956-963, doi:10.1182/blood-2002-11-3355 (2003).
- 17 Bekeredjian-Ding, I. B. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* **174**, 4043-4050 (2005).
 - 18 Bernasconi, N. L., Traggiai, E. & Lanzavecchia, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**, 2199-2202, doi:10.1126/science.1076071 (2002).
 - 19 Papadimitraki, E. D. *et al.* Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum* **54**, 3601-3611, doi:10.1002/art.22197 (2006).
 - 20 Leadbetter, E. A. *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-607, doi:10.1038/416603a (2002).
 - 21 Viglianti, G. A. *et al.* Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* **19**, 837-847 (2003).
 - 22 Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**, 823-835, doi:10.1038/nri1957 (2006).
 - 23 Park, B. *et al.* Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **9**, 1407-1414, doi:10.1038/ni.1669 (2008).
 - 24 Ewald, S. E. *et al.* The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* **456**, 658-662, doi:10.1038/nature07405 (2008).
 - 25 Guerrier, T. *et al.* TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J Autoimmun* **51**, 23-29, doi:10.1016/j.jaut.2014.02.005 (2014).
 - 26 Eaton-Bassiri, A. *et al.* Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* **72**, 7202-7211, doi:10.1128/IAI.72.12.7202-7211.2004 (2004).
 - 27 Saikh, K. U., Kissner, T. L., Sultana, A., Ruthel, G. & Ulrich, R. G. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol* **173**, 7426-7434 (2004).
 - 28 Dasari, P., Nicholson, I. C., Hodge, G., Dandie, G. W. & Zola, H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol* **236**, 140-145, doi:10.1016/j.cellimm.2005.08.020 (2005).
 - 29 Baiyee, E. E. *et al.* Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin Exp Immunol* **145**, 456-462, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03160.x (2006).
 - 30 Murakami, Y. *et al.* The protective effect of the anti-Toll-like receptor 9 antibody against acute cytokine storm caused by immunostimulatory DNA. *Sci Rep* **7**, 44042, doi:10.1038/srep44042 (2017).
 - 31 Gilda, J. E. *et al.* Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS One* **10**, e0135392, doi:10.1371/journal.pone.0135392 (2015).

- 32 Weller, M. G. Quality Issues of Research Antibodies. *Anal Chem Insights* **11**, 21-27, doi:10.4137/ACI.S31614 (2016).
- 33 Berglund, L. *et al.* A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2019-2027, doi:10.1074/mcp.R800013-MCP200 (2008).
- 34 Baker, M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* **521**, 274-276, doi:10.1038/521274a (2015).
- 35 Goodman, S. L. The path to VICTORY - a beginner's guide to success using commercial research antibodies. *J Cell Sci* **131**, doi:10.1242/jcs.216416 (2018).
- 36 Weller, M. G. Ten Basic Rules of Antibody Validation. *Anal Chem Insights* **13**, 1177390118757462, doi:10.1177/1177390118757462 (2018).
- 37 Pauly, D. & Hanack, K. How to avoid pitfalls in antibody use. *F1000Res* **4**, 691, doi:10.12688/f1000research.6894.1 (2015).
- 38 Li, D. *et al.* Specific detection of interferon regulatory factor 5 (IRF5): A case of antibody inequality. *Sci Rep* **6**, 31002, doi:10.1038/srep31002 (2016).
- 39 Bourbeillon, J. *et al.* Minimum information about a protein affinity reagent (MIAPAR). *Nat Biotechnol* **28**, 650-653, doi:10.1038/nbt0710-650 (2010).

Acknowledgements

Thanks are due to Geneviève Michel and Simone Forest for their secretarial assistance

Author Contributions

M.C. carried out all experiments and contributed to draft the manuscript, L.L.P. and K.A. prepared the materials for the transfection experiments, J.O.P. aided in experimental design, C.J. designed the study and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing financial interest: The authors declare no competing financial interests.

Figure Legends

Figure 1. TLR9 expression at transcriptional and protein levels. **A.** Quantitative analysis of TLR9 mRNA expression in primary human tonsillar B and T lymphocytes, in RAMOS EBV-negative and DAUDI EBV-positive Burkitt's lymphoma human B cell lines, in HEK293 human embryonic kidney and HSG human submandibular gland epithelial cell lines, and in U937 human monocytic cell line. Data are expressed with the $2^{-\Delta Ct}$ method using RPL13A as the reference gene. **B.** Intracellular flow cytometry detection of the TLR9 proteins in RAMOS B cells, HEK293 cells and peripheral T cells saturated or not with CpG-ODN, using FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, PE-conjugated eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, Alexa 488-conjugated sheep polyclonal anti-TLR9, rabbit polyclonal anti-TLR9 and 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 revealed with FITC-conjugated anti-globulins. Representative example of 5 experiments.

Figure 2. Protein detection with the anti-TLR9 antibodies. RAMOS B cells and HEK293 epithelial cells were lysed with different lysis buffers. Total protein extracts were electrophoretically separated in a 10% polyacrylamide gel, transferred on PVDF membrane and targeted by 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, sheep polyclonal anti-TLR9, rabbit polyclonal anti-TLR9 or 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 revealed with HRP-conjugated anti-globulins. The detection of the actin beta protein was performed as internal control. MW: Molecular Weight. Representative example of 5 experiments.

Figure 3. Recognition of TLR9 recombinant protein by the different anti-TLR9 antibodies. **A.** Coomassie Blue coloration of human TLR9 full-length recombinant protein produced in vitro in Wheat Germ. **B.** The TLR9 recombinant protein was transferred on PVDF membrane and targeted by 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, sheep polyclonal anti-TLR9, rabbit polyclonal anti-TLR9 or 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 revealed with HRP-conjugated anti-globulins. MW: Molecular Weight. Representative example of 2 experiments.

Figure 4. Immunoprecipitation with the anti-TLR9 antibodies. RAMOS B cells and HEK293 epithelial cells were lysed using the Brij96 buffer. Proteins were immunoprecipitated with the either 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, sheep polyclonal anti-TLR9, rabbit polyclonal anti-TLR9 or 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 using G protein beads. The immunoprecipitated proteins were electrophoretically separated in a 10% polyacrylamide gel and revealed with Coomassie Blue coloration. MW: Molecular Weight. Targeted epitopes on the TLR9 protein are indicated. Representative example of 4 experiments.

Figure 5. Detection of HA-tagged TLR9 construct by the anti-TLR9 antibodies. The pcDNA3.1-TLR9-HA plasmid construct was transfected into HEK293 epithelial cells. An empty plasmid served as a negative control. **A.** After 48 hours, the cells were harvested, fixed, permeabilized and labeled with a FITC-conjugated anti-HA.11 monoclonal antibody associated with a cell death marker for flow cytometry analysis. Expression of HA-tagged TLR9 was evaluated on living cells. **B.** HEK293 epithelial

cells expressing the HA-tagged TLR9 protein were lysed using the Brij96 buffer. Total protein extracts were electrophoretically separated in a 10% polyacrylamide gel, transferred on PVDF membrane and targeted by anti-HA.11 monoclonal antibody, 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, sheep polyclonal anti-TLR9 or rabbit polyclonal anti-TLR9 revealed with HRP-conjugated anti-globulins. HEK293 cells transfected with an empty plasmid served as negative control. MW: Molecular Weight. Representative example of 5 experiments. **C.** U937 monocytic cells were transfected with the pcDNA3.1-TLR9-HA plasmid construct. After 24 hours, cells were harvested, fixed, permeabilized and labeled with a biotinylated-conjugated anti-HA.11 monoclonal antibody revealed with RRX-conjugated streptavidin, associated with a FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9. Stained cells were analyzed by confocal microscopy. Representative example of fluorescent cells.

Figure 6. Sub-cellular localisation of proteins targeted by anti-TLR9 antibodies. A. Subcellular protein fractions from RAMOS B cells were purified using a fractionation kit. **B.** Total protein extracts and membrane expressed proteins (Fraction 2) were electrophoretically separated in a 10% polyacrylamide gel, transferred on PVDF membrane and targeted by 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, sheep polyclonal anti-TLR9 and rabbit polyclonal anti-TLR9 revealed with HRP-conjugated anti-globulins. MW: Molecular Weight. Representative example of 3 experiments.

Table 1. Anti-TLR9 antibodies used in the study.

Antigen	Clonality	Species	Name	Isotype	Epitope (aa)	Immunogen	Company	Recommendation
Human TLR9	Polyclonal	Sheep		IgG	64-189	E. Coli derived recombinant human TLR9	R&D Systems	FC ; IHC
		Rabbit		IgG	771-870		Santa Cruz	WB ; IP ; IHC ; ELISA
	Monoclonal	Mouse	26C593.2	IgG1, kappa	268-300	KLH-conjugated synthetic peptide corresponding to aa 268-300 of human TLR9 isoform A	Novus Biologicals	FC ; WB ; IP ; IHC ; ICC ; ELISA ; Fu
		Rat	eB72-1665	IgG2, kappa	273-288	aa 273-288 portion of human TLR9	eBiosciences	FC
		Mouse	1 ^E 4	IgG2, kappa	370-473	Full-length recombinant protein with GST tag	Abnova	WB ; ELISA

aa: amino acids ; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay ; FC: Flow cytometry ; Fu: Functional ; ICC: Immunocytochemistry ; IHC: Immunohistochemistry ; IP: Immunoprecipitation ; WB: Western Blot.

Table 2. Heterogeneity of anti-TLR9 antibody fixation by flow cytometry.

	Mean Fluorescence Intensity								
	RAMOS B cells			HEK293 cells			T lymphocytes		
Anti-TLR9 antibody	w/o saturation	CpG after saturation	CpG	w/o saturation	CpG after saturation	CpG	w/o saturation	CpG after saturation	CpG
Mouse monoclonal 26C593.2	1.13	0.7		0.8	0.75		1.83	1.5	
Rat monoclonal eB72-1665	2.3	2.02		11.22	2.42		2.62	5.1	
Sheep polyclonal	5.32	1.73		5.25	3.9		9.56	5.92	
Mouse monoclonal 1E4	154.29	76.74		404.53	523.79		64.44	34.31	
Rabbit polyclonal	12.96	7.79		27.32	29.48		9.35	7.29	

Flow cytometry analysis of the cells permeabilized and stained with FITC-conjugated 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, PE-conjugated eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, Alexa 488-conjugated sheep polyclonal anti-TLR9, or rabbit polyclonal anti-TLR9 and 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9 revealed with FITC-conjugated anti-globulins

Table 3. Anti-TLR9 antibody recognition by Western Blot.

	Non-specific proteins				TLR9 cleaved form 60 kDa				Complete TLR9 110 kDa				Glycosylated TLR9 160 kDa			
	RIPA buffer	Brij 96 buffer	Triton X-100 buffer	N-Dodecyl buffer	RIPA buffer	Brij 96 buffer	Triton X-100 buffer	N-Dodecyl buffer	RIPA buffer	Brij 96 buffer	Triton X-100 buffer	N-Dodecyl buffer	RIPA buffer	Brij 96 buffer	Triton X-100 buffer	N-Dodecyl buffer
Anti-TLR9 antibody																
Mouse monoclonal 1E4	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	++	-	-	-	-
Mouse monoclonal 26C593.2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
Rat monoclonal eB72-1665	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	+	-	+	+	-	-
Rabbit polyclonal	+	+	+	+	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sheep polyclonal	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RAMOS B cells and HEK293 epithelial cells were lysed with the different lysis buffers. Total protein extracts were electrophoretically separated in a 10% polyacrylamide gel, transferred on PVDF membrane and targeted by 1E4 mouse monoclonal anti-TLR9, 26C593.2 mouse monoclonal anti-TLR9, eB72-11665 rat monoclonal anti-TLR9, rabbit polyclonal anti-TLR9 or sheep polyclonal anti-TLR9 revealed with HRP-conjugated anti-globulins. Non-specific proteins correspond to protein detected in the HEK293 protein extracts. The detection of the different forms of TLR9 correspond to protein detected in the RAMOS B cell protein extracts. - = no detection; + = weak detection; ++ = strong detection.

FIGURE 1

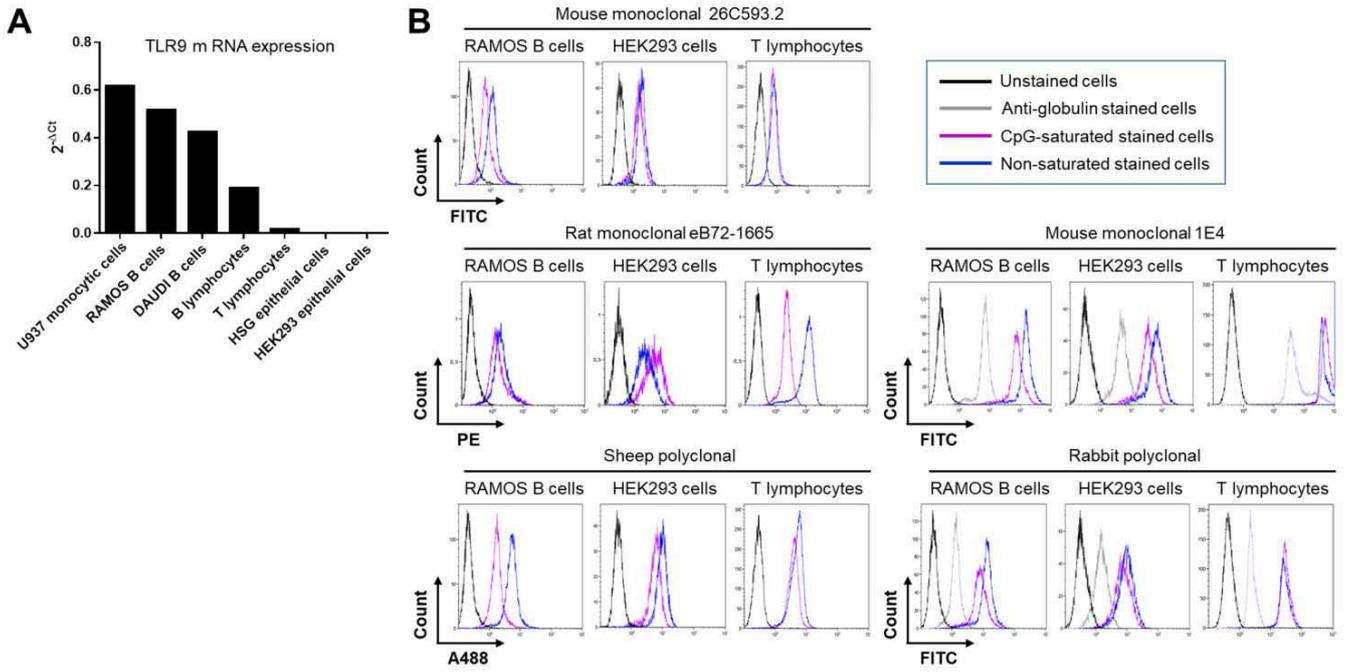


FIGURE 2

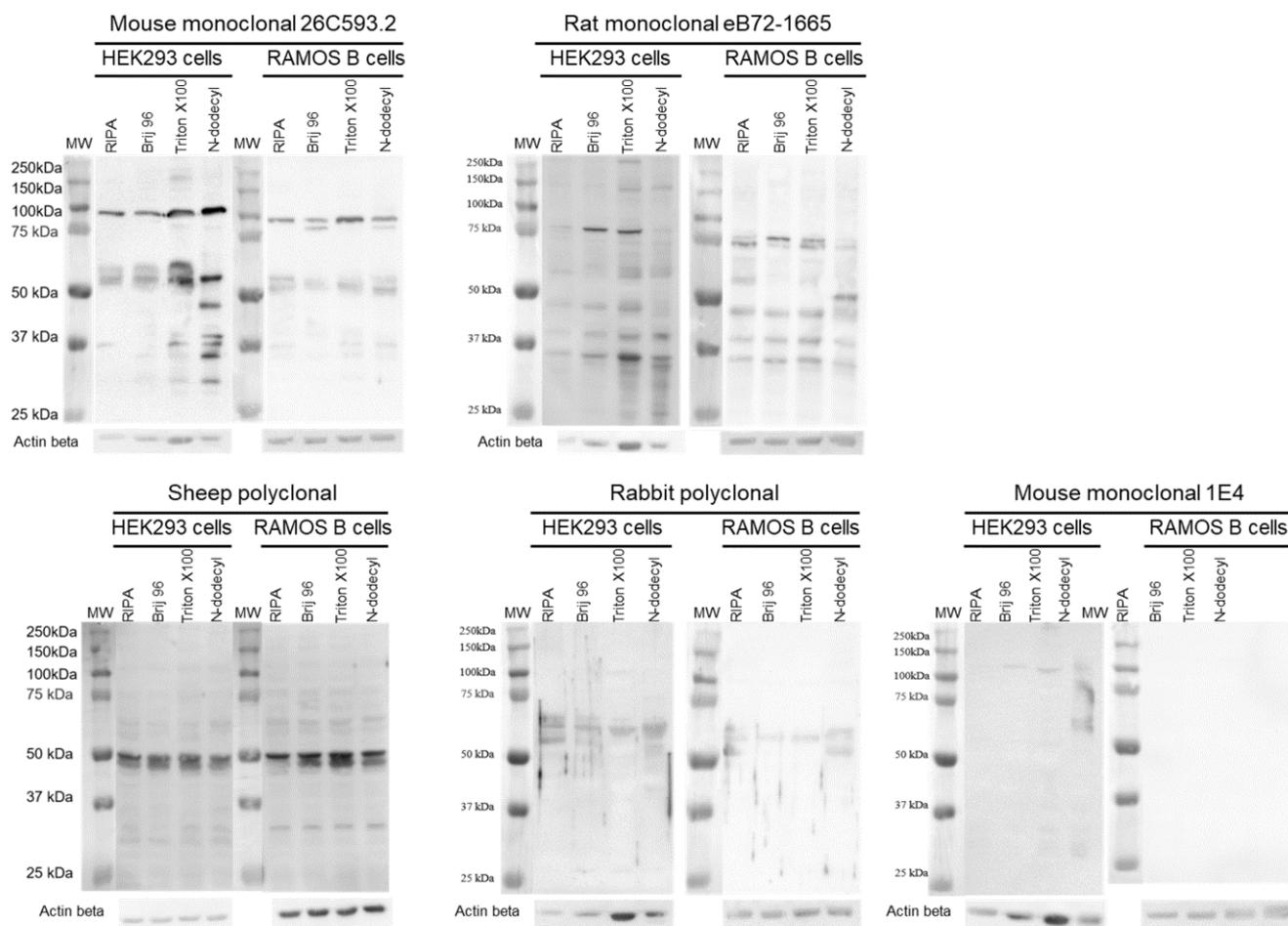


FIGURE 3

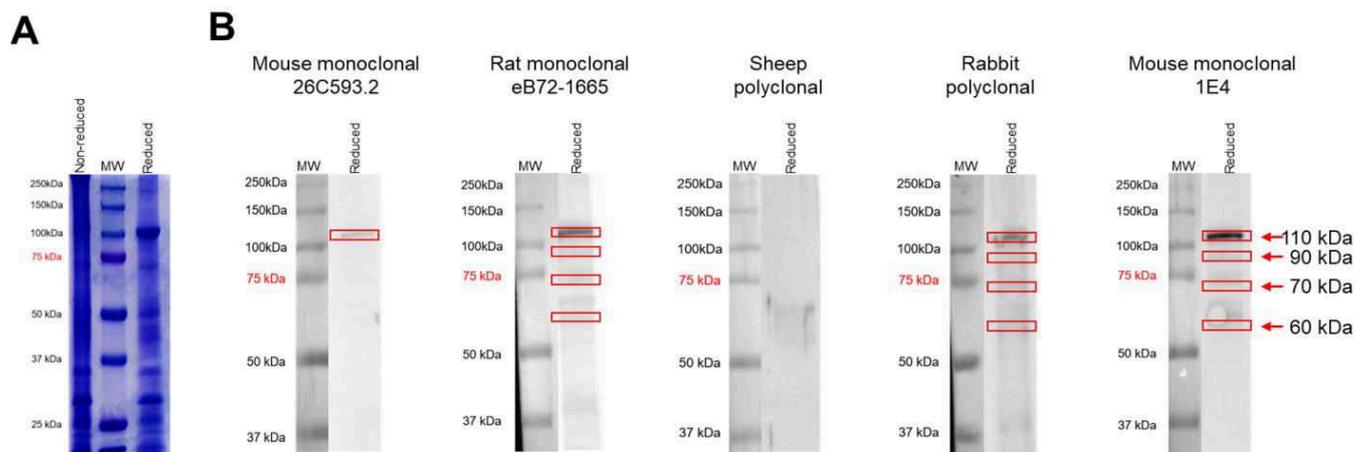


FIGURE 4

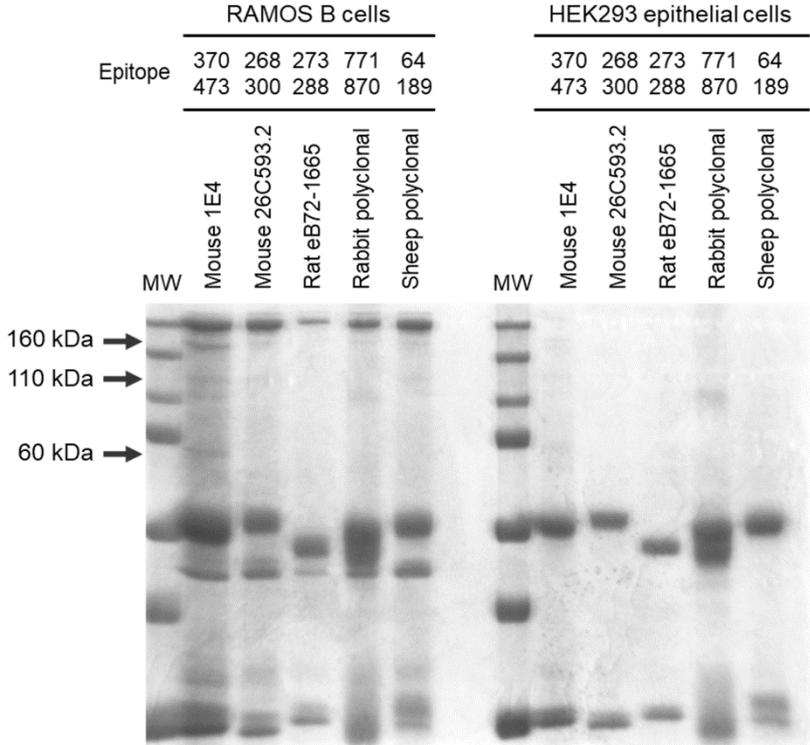


FIGURE 5

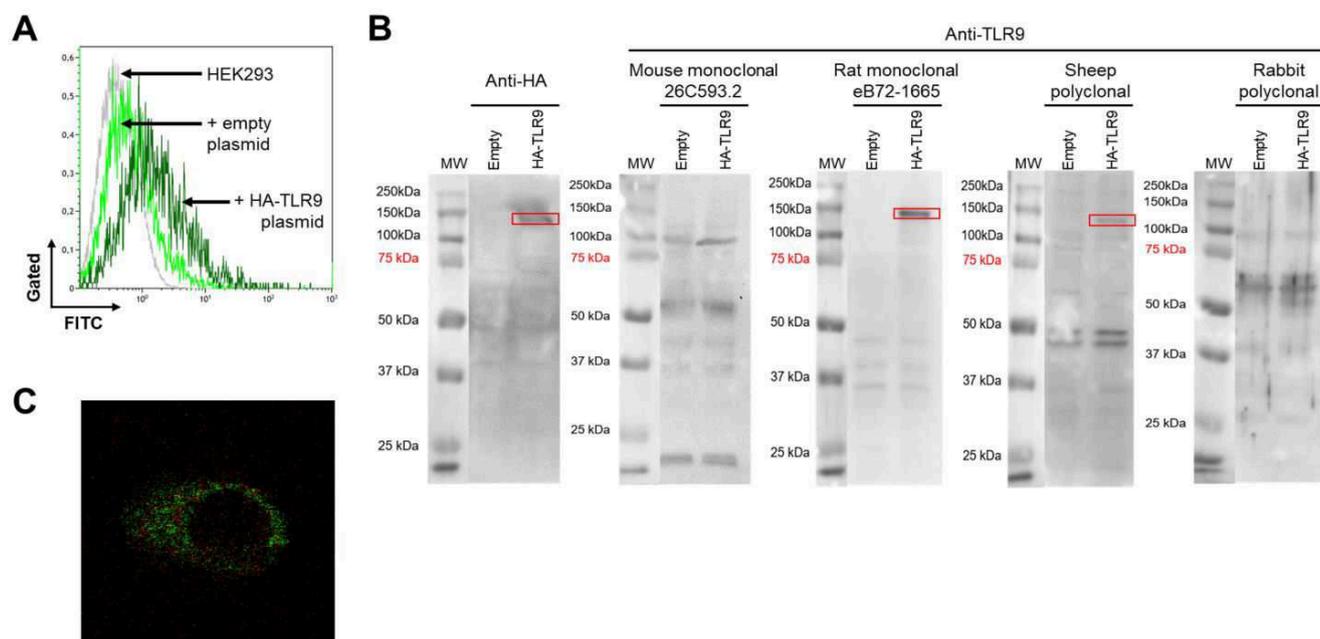
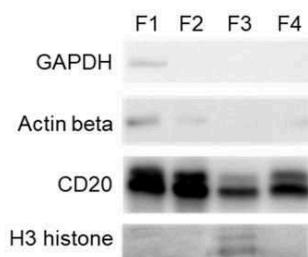


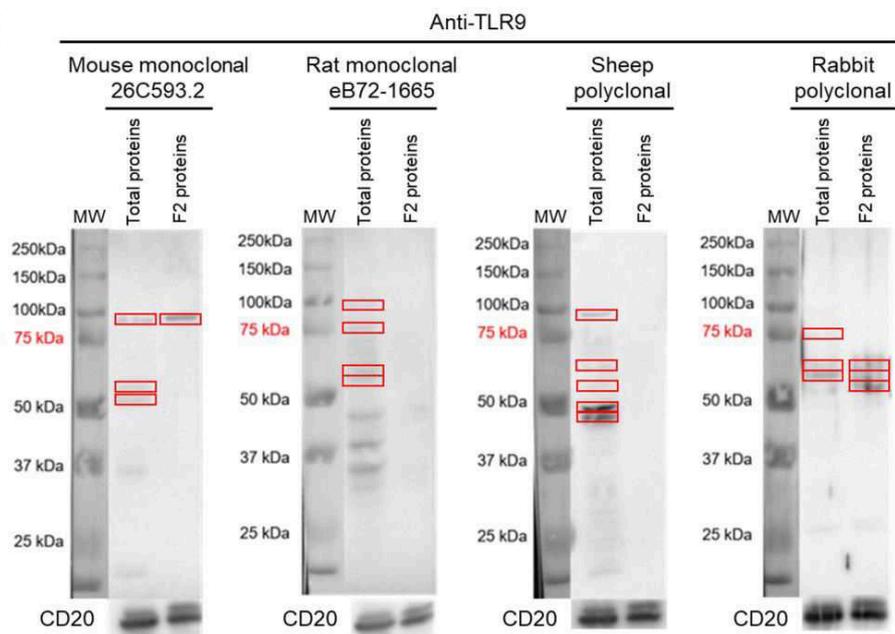
FIGURE 6

A



F1: cytosol
 F2: membranes
 F3: nucleus
 F4: cytoskeleton

B



Annexe 2

THE REGULATORY CAPACITY OF B CELLS DIRECTS THE AGGRESSIVENESS OF CLL
Running Title: B cell regulatory function and CLL aggressiveness

**Audrey Mohr,¹ Marie Cumin,¹ Cristina Bagacean,^{1,2} Pierre Pochard,^{1,2}
Christelle Le Dantec,¹ Sophie Hillion,^{1,2} Yves Renaudineau,^{1,2} Christian
Berthou,^{1,3} Adrian Tempescul,^{1,3} Hussam Saad,³
Jacques-Olivier Pers,¹ Anne Bordron,^{1*} and Christophe Jamin^{1,2*}**

¹UMR1227, Lymphocytes B et Autoimmunité, Univ Brest, INSERM, Brest, France

²Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie, CHRU Morvan, Brest, France;

³Département d'Hématologie, CHRU Morvan, Brest, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr Christophe Jamin, Immunologie, INSERM UMR1227, CHRU Morvan, BP824, F29609, Brest, France; Tel: +332 98 22 33 84; christophe.jamin@univ-brest.fr

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Support: This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer" and the "Association Laurette Fugain". A.M. was supported by the Agence Nationale de la Recherche under the "Investissement d'Avenir" program with the reference number ANR-11-LABX-0016-001, and the "Region Bretagne".

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is associated with abnormal T-cell responses responsible for defective anti-tumor activities. Intriguingly, CLL B cells share phenotypical characteristics with regulatory B (Breg) cells suggesting that they might negatively control the T-cell activation and immune responses. We elaborated an *in vitro* co-culture system with T cells to evaluate the Breg capacities of CLL B cells following innate Toll-like receptor 9 (TLR9) engagement. We demonstrated that B cells from half of the patients exhibited regulatory capacities, whilst B cells from the remaining patients were unable to develop a Breg function. The T cell sensitivities of all patients were normal suggesting that defective Breg activities were due to intrinsic CLL B cell deficiencies. Thus, TLR-dedicated gene assays highlighted differential signature of the TLR9 negative regulation pathway between the two groups of patients. Furthermore, correlations of the doubling time of lymphocytosis, the time to first treatment, the mutational status of IgVH and the Breg functions indicate that patients with efficient Breg activities have more aggressive CLL than patients with defective Breg cells. Our *in vitro* observations may open new approaches for adjusting therapeutic strategies targeting the Breg along with the evolution of the disease.

KEYWORDS: Regulatory capacity; B cells; CLL; Aggressiveness; TLR9

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a clinically heterogeneous disease characterized by the accumulation of CD5⁺ tumor B cells originating either from naïve B cells,¹ marginal zone B cells,² mature CD5⁺ B cells,³ or from the CD27⁺ memory B cell compartment.⁴ Development of the disease is associated with abnormal immune responses that may be responsible for the defective anti-tumor activity.⁵ T cells display abnormal functions and are unable to trigger, sustain and complete an immune response against the tumor cells.⁶ One explanation can be found in the differential sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to be terminated by CLL B cells.⁷ The enriched regulatory T (Treg) cells in progressive CLL patients compared with indolent patients and normal individuals also suggests a down-regulation of the tumor-specific response.⁸

It has now been widely demonstrated that some B cells have regulatory properties to control adaptive as well as innate immune responses in autoimmunity^{9, 10}, infections,¹¹ allergies¹² and cancers mainly through IL-10-dependent and IL-10 independent mechanisms.¹³⁻¹⁵ Thus, one of the predominant regulatory factors secreted by Breg cells is IL-10.¹⁶ The IL-10 producing Breg cells, called B10 cells in mice,¹⁷ represent less than 5% of the B-cell pool in humans.¹⁸ They differentiate from CD24^{hi} CD27⁺ memory B cells expressing the CD5 molecule following BCR and subsequent CD40 signaling,¹⁹ suggesting that antigen exposure and T-cell contact are key components for their generation.²⁰ However, TLR9 and IL-21R signals are able to generate effector B10 cells^{17, 21} indicating that innate stimulations can also activate efficient regulatory activities. Other Breg cells can be functionally defined by their IL-10-independent control of the immune responses. Thus, CD24^{hi}CD38^{hi}CD5⁺ B cells

suppress the proliferative response of T cells²² and the function of dendritic cells²³ mainly by cellular interactions, TGF- β production and Treg expansion.²⁴ Their regulatory properties are acquired following CD40 activation during cell-to-cell contacts and are up-regulated following TLR9 engagement.

Breg and CLL B cells share phenotypical characteristics, both expressing CD5, CD24 and CD27²⁵ and low levels of surface IgM.^{18, 26} They also share physiological analogies. While non-stimulated CLL cells produce low levels of IL-10,²⁷ *in vitro* stimulation through CD40L or TLR9 induces significant production of IL-10,²⁵ similar to human Breg cells.^{9, 17, 22} Furthermore, the inability of CLL B cells to stimulate T cell proliferation or their Th1 polarization²⁸ associated with increased Treg frequencies²⁹ suggest that they could exhibit regulatory properties like Breg cells inhibiting the T cell proliferation through an IL-10-independent mechanism,^{22, 30} suppressing the Th1 polarization through the production of IL-10²⁰ and expanding the Treg cells.^{22, 24} Taken together, the disturbance of the immune responses observed in CLL patients may result from the development of different Breg functions.³¹

While CLL B cells may share IL-10-dependent immunosuppressive functions with B10 cells leading to the control of Th1 polarization,²⁵ their IL-10-independent regulatory properties to control the T cell proliferation during immune responses have never been identified. To evaluate these capacities, we developed an autologous *in vitro* co-culture system. We highlight that B cells from half of the patients exhibit efficient regulatory capacities, whilst B cells from the remaining patients are unable to develop regulatory function after TLR9 stimulation. Comparison of the two groups indicates

differential gene expression signatures related to the control of the TLR9 pathway. Moreover, Breg activity appears to be associated with the clinical evolution suggesting that the development of the IL-10-independent regulatory control of the CLL B cells may be associated with the aggressive outcome of the disease.

RESULTS

TLR9-induced Breg activity differentiates two groups of CLL patients

To assess the IL-10-independent Breg function, purified B cells were incubated for 4 days with autologous T cells activated by anti-CD3 and anti-CD28 mAb to induce their proliferation in the presence of CpG-ODN.²² TLR9 stimulation of CLL B cells identified two groups of patients (Fig. 1A). A regulatory activity was observed in the first group, classified as Reg POS CLL patients, for which the T cell proliferation was inhibited by $+8.0\pm 1.2\%$. In the second group, classified as Reg NEG CLL patients, no inhibition of the T cell proliferation was induced ($-8.2\pm 1.3\%$; $p<0.001$) (Fig. 1A). Because the control of the T cell proliferative response by the B cells is IL-10 independent,²² but involves a TGF- β -dependent mechanism as previously demonstrated with blocking Abs,²⁴ both cytokines were assessed in the two groups. Consistent with these observations, the level of the inhibition of the T cell proliferation was not associated with the concentration of IL-10 but was slightly correlated with the concentration of TGF- β detected in the co-culture's supernatants (Fig. 1B). Furthermore, because CLL B cells are prone to die spontaneously *in vitro*,³² the level of the B cell mortality after 4 days of co-cultures was evaluated. Reg POS and Reg NEG CLL B cells exhibited $7.8\pm 2.1\%$ and $8.2\pm 2.3\%$ of mortality respectively (Fig. 1C), indicating that the different Breg behaviour cannot be ascribed to different survival levels. Moreover, no significant up-regulation of the

inhibited T cell proliferation level was observed when the CLL B cell ratio increased ($p < 0.05$) (Fig. 1D), suggesting that B cell regulatory deficiency in the Reg NEG CLL is independent of lymphocytosis. The ensuing experiments were therefore performed at a 1T:1B ratio for all samples.

CLL T cell proliferation response is not defective

It can be argued that T cell differential sensitivities⁷ and/or differential CD4:CD8 ratio³³ could be responsible for the discrepancies in the Breg activities. However, the T cells exhibited similar levels of mortality after 4 days of co-culturing ($p > 0.05$) and the CD4:CD8 ratios were found to be identical between Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients ($p > 0.05$) (Fig. 2A). Moreover, the proliferation index of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2B) were equivalent between Reg POS CLL (2.8 ± 0.2 and 3.1 ± 0.1 , respectively) and Reg NEG CLL (2.7 ± 0.1 and 2.7 ± 0.3 , respectively) ($p > 0.05$), and the CD4⁺ and CD8⁺ T cells were similarly regulated by their B cell counterparts in autologous co-culture experiments (Fig. 2C). Taken together, these results indicate that the distinct Breg activities between the two groups of CLL patients are not due to differential CD4⁺ or CD8⁺ T cell sensitivities.

Furthermore, in heterologous co-cultures (Fig. 2D), HC B cells similarly inhibited the proliferation of Reg POS CLL T cells ($+17.8 \pm 3.5\%$) and Reg NEG CLL T cells ($+13.0 \pm 1.8\%$) ($p > 0.05$). Conversely, Reg POS CLL B cells but not Reg NEG CLL B cells inhibited the proliferation of HC T cells ($+5.7 \pm 2.0\%$ vs $-12.2 \pm 7.3\%$, $p < 0.05$, respectively). All these data indicate identical sensitivities of the T cells from Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients and emphasize that B cells from Reg NEG CLL

patients exhibit intrinsic defective Breg capacities compared to B cells from Reg POS CLL patients.

Differential efficient signaling pathways in Reg POS and Reg NEG CLL B cells

To understand the differential Breg capacities of CLL B cells, we first searched for phenotypic discrepancies. As expected, all B cells displayed a unique cell surface phenotype (Fig. 3A), confirming the CLL diagnosis established by Matutes et al. for both Reg POS and Reg NEG patients with higher level of CD5 and reduced expression of CD22, CD79b, IgM, IgD and FMC7 relative to HC B cells.^{34, 35} As previously described, decreased levels of CD19 and CD20 were also found confirming the cellular origin of these cells. However, the densities of molecules previously shown to be associated with regulatory function such as CD23, TLR9, CD24, BR3 IL-21R, CD25, CD38 or TACI were similar on Reg POS and Reg NEG CLL B cells ($p>0.05$) (Fig. 3B). Because CD27⁻ naïve B cells were considered to possess a greater regulatory capacity than CD27⁺ memory B lymphocytes,³⁰ CD27 expression was also evaluated. All cells were found to be positive with identical CD27 MFI on Reg POS and Reg NEG CLL B cells ($p>0.05$), suggesting that the presence of CD27 is unlikely associated with the efficacy of the Breg effect of the CLL B cells. Finally, CD40 which is known to be required for the generation of the Bregs,²² was also similarly expressed on Reg POS and Reg NEG CLL B cells ($p<0.05$), suggesting that this interacting molecule is unlikely responsible for the difference in the Breg activity.

To go further in depth, we then questioned the efficiency of the activating TLR9 signaling. B cells were incubated with CpG-ODN for 48h. The MFI of the CD86 and CD25 molecules were up-regulated without significant differences between Reg POS and Reg NEG CLL B cells (Fig. 4A). However, while Reg POS CLL displayed higher proportion of CD69⁺ activated B cells, TLR9 stimulation increased their frequencies in the two groups indicating that Reg POS as well as Reg NEG CLL B cells can be activated by CpG-ODN (Fig. 4A). The TLR9-induced up-regulation of CD40 expression was also evaluated.^{22, 24} Reg NEG CLL B cells exhibited a lower up-regulated expression of CD40 molecules compared to the enhanced density triggered on Reg POS CLL B cells (Fig. 4A). These results suggest a defective TLR9 signaling pathway in the Reg NEG CLL B cells that may be responsible for their inability to develop Breg activity in close contact with the T cells.

Therefore, we deciphered the TLR9 pathway engaged and controlled following CpG-ODN stimulation and 3 days of co-cultures. Among 66 genes analyzed in the TLR-dedicated TaqMan gene expression assays, 29 genes were over-expressed and 10 genes were under-expressed in the Reg NEG CLL B cells compared to the Reg POS CLL B cells (Fig. 4B). Among these clusters, 12 genes were relevant to the TLR9 pathways (Table 1). In the Reg NEG B cells, 4 genes associated with activating signals were over-expressed (TBK1, IRAK-4, IRAK-1 and REL) when 6 genes were under-expressed (IRF-7, IRF-8, MAPK14, MAPK13, RELB and UBC). Moreover, 2 genes associated with inhibitory signals of the TLR9 pathway were also over-expressed in the Reg NEG CLL B cells (TOLLIP and TANK) when none were under-expressed compared to the

Reg POS CLL B cells. Compared with HC, this differential expression was confirmed at the mRNA and protein levels for IRAK-1, IRAK-4 and TANK molecules for which specific bands could be identified with the corresponding mAbs on the Western Blot (Fig. 4C). The imbalance in favor of the inhibitory signals of the TLR9 pathway may be the basis of the inability for the Reg NEG CLL B cells to develop a Breg function following TLR9 stimulation.

Correlation of the Breg capacities, the time to first treatment and the doubling time of lymphocytosis
Finally, the correlation of the Breg capacities with clinical aspects was assessed (Table 2).

Breg activities were not correlated with either sex, age of diagnosis, the Binet stage, lymphocytosis, or CD38 expression. Identical repartitions of cytogenetic abnormalities (Fig. 5A) as well as mutational status of IgVH (Fig. 5B) were also observed in Reg POS and Reg NEG CLL B cells. However, patients with unmutated IgVH status are known to exhibit a more aggressive form of CLL compared with patients harboring a mutated IgVH.³⁶ We wish to evaluate the impact of the Breg efficiency on the CLL aggressivity. We found that the doubling time of lymphocytosis appeared more quickly for the patients with unmutated IgVH than for the patients with mutated IgGVH, and even more quickly for the Reg POS CLL patients than for the Reg NEG CLL patients ($p < 0.05$) (Fig. 5C). Furthermore, the time to first treatment occurred earlier for the patients with unmutated IgVH than for the patients with mutated IgVH and even more earlier for the Reg POS CLL patients than for the Reg NEG CLL patients ($p < 0.05$) (Fig. 5D). These

observations indicate that the detection of Breg activity is associated with a more aggressive form of CLL.

DISCUSSION

Breg cells turn off the anti-tumor T-cell immune responses in solid cancers by the inhibition of the T cell proliferation and the expansion of the Treg cells.^{37, 38} Their role in the development of CLL is not fully clarified and the question as to whether CLL B cells can be considered as Breg cells contributing to disease progression has not yet been elucidated. Two functional mechanisms defining distinct subsets of Breg cells have been recognized to date. The first corresponds to B cells expressing IL-10¹⁸ leading to the control of the Th1 polarization and inflammatory responses.³⁹ CLL B cells share the functional capacity to express IL-10²⁷ although the identification and characterization of IL-10 competent CLL cells remain to be established.²⁵ The second mechanism is IL-10-independent and requires cell-to-cell contact⁴⁰ with CD40/CD40L interaction leading to the control of the T cell proliferation.^{22, 30} Herein, TLR9 engagement, known to induce efficient IL-10-independent Breg activities in HC B cells²² defined two groups of patients classified as Reg POS and Reg NEG CLL. No evident association could be found with either clinical aspect or with the IgVH mutational status of any patients, suggesting that defective IL-10-independent Breg activity is not associated with specific antigen patterns. Heterogeneous responses to CpG-stimulation have already been reported with proliferation of CLL B cells in half of the cases but also with apoptosis in some cases.⁴¹⁻⁴³ It is likely that the variation of intra-cellular signaling pathways might determine different CLL B cell behaviours in response to TLR9 engagement as shown

for example by the variable magnitude of Akt signaling.⁴⁴ Thus, it has been recently demonstrated that the levels of CD19 expression and the associated intracellular pathways are key elements in the efficient TLR9-induced B cell activation. CD19 abrogated expression and an altered PI3K/Akt/BTK-dependent CD19 pathway result in a TLR9 activation defect.⁴⁵ As previously observed,^{46, 47} we found lower CD19 surface expression on CLL B cell patients compared to HC B cells but the levels were similar on Reg POS and Reg NEG CLL B cells, suggesting that CD19 expression is unlikely involved in the Breg deficiencies of the Reg NEG patients. Furthermore, the over-expression of the inhibitors TOLLIP and TANK in the Reg NEG CLL B cells participating in the inhibition of the TLR9 signals could explain the absence of Breg activities in these patients. Consistent with this hypothesis, TLR9 stimulation induced a lowered CD40 up-regulation on Reg NEG CLL B cells. This implies defective CD40-mediated transductions⁴⁸ that might be inappropriate to efficiently activate the CLL B cells during the close contact with T cells and may impede the development of Breg activities.²²

Our observations indicate that the TLR9-induced Breg control of the T cell proliferation develops in patients with shorter doubling time of lymphocytosis and with earlier time to first treatment suggesting that IL-10-independent Breg properties may be more readily apparent in more aggressive CLL B cells. These Breg functions may control anti-tumor immune responses over time and could explain why time from diagnosis is associated with the severity of immune suppression, especially when TLR9 signaling is effective.⁵ There are also arguments supporting the concept of CLL B cells that may

exhibit IL-10-competence contributing to the immunosuppression observed in these patients.²⁵ Further studies will be required to evaluate whether IL-10-dependent and -independent regulatory mechanisms may jointly occur or appear separately during disease progression and whether these Breg activities may be the properties of distinct or common CLL cells. The emergence or disappearance of the Breg effects might influence the outcome of the disease's severity. Ultimately, understanding how these Breg mechanisms are controlled may help in the selection of targeted therapies that could be adjusted along with the evolution of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients and normal controls

Fifty-six untreated patients fulfilling the criteria for the diagnosis of CLL were enrolled in the study and were scored clinically according to Matutes and colleagues.³⁴ Twenty males and 15 females ranging in age from 40 to 84 were scored at stage A, 10 males and 8 females ranging in age from 43 to 79 scored at stage B and 3 males ranging in age from 54 to 71 scored at stage C. For some experiments, blood was also taken from 29 aged-matched healthy controls (HC). Consent was obtained from all individuals and the protocol approved by the Ethical Board at the Brest University Medical School Hospital (OFICE, nov 26th, 2015, collection 2008-214).

Cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells were separated by density-gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, France). B lymphocytes were enriched with a negative pan B-cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). Due to the weak

frequency in CLL, T cells were directly isolated from the patients' peripheral blood using the positive MACSxpress Pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) while T lymphocytes from HC were isolated with neuraminidase-treated sheep red blood cells (Thermo scientific, Hampshire, United Kingdom). The purity was over 90% in all conditions.

Cell culture

Cells were cultured at 37°C into 96-well plates coated with a goat affiniPure F(ab')₂ anti-mouse IgG fragment (Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA) in RPMI1640 medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, antibiotics and 10% of human AB serum (Sigma Aldrich). 4.10⁴ T cells were stimulated with mouse anti-human CD3 (0.2µg/ml, Clone OKT3, Biolegend, San Diego, USA) and anti-human CD28 (0.2µg/ml, Clone CD28.2, Beckman Coulter, Marseille, France) mAb to induce their proliferation. TLR9 of B cells was activated with CpG-ODN 2006 (0.25 µM, Invivogen, Toulouse, France). T and B cells were co-cultured at a 1:1 ratio as previously described,²² unless otherwise indicated, for four days. For the proliferation assays, T cells were first labeled with the CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher scientific, Waltham, USA) and analyzed by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter, Villepinte, France). The inhibition of proliferation in the presence of B cells was evaluated using the FlowJo software (FlowJo, Ashland, USA). To study the B cell activation, 5.10⁵ CLL B cells were cultured alone for 48h in a 48-well plate with or without anti-CD40 activating mAb (2µg/ml, Beckman Coulter) or CpG-ODN (0.25µM).

Flow cytometry

All antibodies were from Beckman Coulter unless otherwise specified: FITC-conjugated anti-TLR9 (Imgenex, San Diego, USA), CD268 (B-cell activating factor-receptor (BAFF-R, Biolegend), IgD, CD19, CD25 (BD Biosciences, San Jose, USA), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD5, CD19, CD86, IL21R (BD Biosciences, Grenoble, France), IgM, CD267 (TACI, Biolegend), CD69, CD40, PE-cyanin(Cy)5.5-conjugated anti-CD4, anti-CD27, CD25, CD79b, PE-Cy7-conjugated anti-CD19, CD23, CD38, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD40, CD24, APC-Alexa Fluor 700 (AF700)-conjugated anti-CD19, APC-AF750-conjugated anti-CD5, Pacific blue (PB)-conjugated anti-CD22, CD20 and FMC7, Krome Orange (KO)-labelled anti-CD8 mAbs. 1×10^6 lymphocytes were incubated for 30 min at 4°C with saturating concentrations of mAbs. The determination of the mean fluorescence intensity (MFI) of all markers required a minimum of 5,000 events. The results were standardized to those obtained with isotype controls. For intracellular staining, a preliminary permeabilization was performed with the cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences). For the proliferation evaluation after co-culture, the fluorescence intensity of Cell Trace Violet was analyzed on CD19-negative T cells. Their viability was assessed using the DRAQ7 DNA staining dye (DRAQ7 Biostatus, Beckman Coulter).

Elisa

Concentrations of IL-10 and TGF- β from the supernatants of co-cultures were measured with OptEIA™ IL-10 (BD Biosciences) and Human TGF-beta 1 Quantikine (R&D System) ELISA kits, respectively.

Real Time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western Blot

After 3 days of co-culture with autologous T cells, CpG-simulated B cells from CLL patients and HC were positively selected with the CD19 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec) for qRT-PCR and Western Blot studies. Total RNA was extracted with the RNeasy Plus Micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed to cDNA with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Gene expression patterns of TLR pathways were evaluated using the TaqMan Array Plate (Applied Biosystems, Foster City, USA). For each group defined below, 3 samples of cDNA were diluted (1/40), mixed and added on one plate. Relative expression was normalized with the mean of all CTs (Cycle Threshold) and compared to each other with the fold change method.⁴⁹ CT values greater than 35 reflected no expression and were excluded from analysis.

After washing at 4°C in TNE buffer (25mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl and 1 mM EDTA), positively selected B cells were incubated for 30 min in 1% Triton X-100 in TNE buffer containing anti-proteases cocktail (Sigma). Samples were separated by SDS-PAGE electrophoresis and proteins transferred on polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. After 1 h of saturation with 5% milk in 0.1% Tween 20 buffer, PVDF membranes were incubated in the presence of either rabbit anti-IRAK-1, anti-IRAK-4 (Cell signaling) or anti-TANK (Abcam) antibodies. After washes, HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulins (Jackson) were added, revealed using the ECL Advance Kit (GE Healthcare) and membranes analyzed with Quantity One Software (BioRad).

Mutational Status of IgVH

The immunoglobulin variable heavy chain (IgVH) gene mutation status was determined after PCR amplification and sequencing based on the BIOMED-2 consortium guidelines.⁵⁰ 100ng of genomic DNA isolated with the BioSprint 15 DNA Blood kit (Qiagen), 0.25µl of Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem), 10pmol of each primer, 0.2mM dNTP Mix, 1.5mM MgCl₂, 1x PCR Buffer II, and water adjusted to 50µl were used to perform the multiplex PCR amplifications. PCR products were controlled through 2% agarose gel, purified with ExoSAP-IT PCR product cleanup kit (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom) and sequenced with a Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem). Results were analyzed with the database IMGT/HighV-Quest (The international ImMunoGeneTics information system, Montpellier).⁵¹ A homology sequence >98% defined an un-mutated status.

Statistics

All the results were analyzed with GraphPad Software and presented as Mean ± SEM. Analyses were performed using Mann-Whitney and Chi-square statistical tests, with significances assessed at $p < 0.05$.

Acknowledgements

Thanks are due to Catherine Riou and Valérie Olivier who were supported by the Canceropôle Grand Ouest, for their help in collecting the clinical informations and to Stéphanie Deshayes and Charlotte Laot for their experimental support. We are grateful to Geneviève Michel and Simone Forest for their secretarial assistance and to Jean-Marc Serme and Wesley H. Brooks for their editorial assistance.

conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Forconi F, Potter KN, Wheatley I, Darzentas N, Sozzi E, Stamatopoulos K, Mockridge CI, Packham G, Stevenson FK. The normal IGHV1-69-derived B-cell repertoire contains stereotypic patterns characteristic of unmutated CLL. *Blood* 2010; 115:71-7.
2. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117:1781-91.
3. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, Kuppers R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; 209:2183-98.
4. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194:1625-38.
5. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood* 2015; 126:573-81.
6. Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:383-9.
7. Tinhofer I, Marschitz I, Kos M, Henn T, Egle A, Villunger A, Greil R. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91:4273-81.
8. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest* 2013; 31:121-31.
9. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173:260-7.
10. Jamin C, Morva A, Lemoine S, Daridon C, de Mendoza AR, Youinou P. Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2008; 58:1900-6.
11. Fillatreau S. Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells during intracellular bacterial infection. *Immunol Rev* 2011; 240:52-71.

12. Smits HH. B cells in allergic diseases: bad or better? *Autoimmunity* 2012; 45:415-26.
13. Gorosito Serran M, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett* 2015; 589:3362-9.
14. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol* 2015; 27:521-30.
15. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol* 2015; 27:531-6.
16. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:221-41.
17. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol* 2009; 182:7459-72.
18. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011; 117:530-41.
19. Tedder TF. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. *J Immunol* 2015; 194:1395-401.
20. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* 2010; 185:2240-52.
21. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012; 491:264-8.
22. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 2011; 36:228-38.
23. Morva A, Lemoine S, Achour A, Pers JO, Youinou P, Jamin C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood* 2012; 119:106-14.
24. Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, Hillion S. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* 2015; 59:53-60.

25. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, Matsushita T, Matta KM, Chen Y, Venturi GM, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* 2013; 27:170-82.
26. Coelho V, Krysov S, Steele A, Sanchez Hidalgo M, Johnson PW, Chana PS, Packham G, Stevenson FK, Forconi F. Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood* 2013; 122:2664-72.
27. Rossi M, Gentile M, Toscano R, Recchia AG, Bossio S, Caruso N, De Stefano L, Granata T, Pellicano M, Vigna E, et al. Enumeration of interleukin-10-positive B cells from peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; 55:1394-6.
28. Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* 1999; 93:1992-2002.
29. Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J, Pratt G, Moss PA. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2011; 166:154-63.
30. Nouel A, Segalen I, Jamin C, Doucet L, Caillard S, Renaudineau Y, Pers JO, Le Meur Y, Hillion S. B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 2014; 85:590-9.
31. Mohr A, Renaudineau Y, Bagacean C, Pers J-O, Jamin C, Bordron A. Regulatory B lymphocyte functions should be considered in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1132977.
32. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989; 71:343-50.
33. Wu J, Xu X, Lee EJ, Shull AY, Pei L, Awan F, Wang X, Choi JH, Deng L, Xin HB, et al. Phenotypic alteration of CD8+ T cells in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic reprogramming. *Oncotarget* 2016; 7:40558-70.
34. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8:1640-5.

35. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; 108:378-82.
36. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, Bauer K, Malchau G, Rabe KG, Stilgenbauer S, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 124:49-62.
37. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, Biragyn A. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* 2011; 71:3505-15.
38. Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998; 4:627-30.
39. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28:639-50.
40. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* 2012; 188:3188-98.
41. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, Jox R, Giese T, Emmerich B, Endres S, et al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1490-9.
42. Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, Peschel C. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia* 2002; 16:327-34.
43. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77:378-87.
44. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; 21:110-20.

45. Morbach H, Schickel JN, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco JL, Meffre E. CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137:889-98 e6.
46. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51:364-9.
47. Huh YO, Schweighofer CD, Ketterling RP, Knudson RA, Vega F, Kim JE, Luthra R, Keating MJ, Medeiros LJ, Abruzzo LV. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features. *Am J Clin Pathol* 2011; 135:686-96.
48. Laytragoon-Lewin N, Duhony E, Bai XF, Mellstedt H. Downregulation of the CD95 receptor and defect CD40-mediated signal transduction in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Eur J Haematol* 1998; 61:266-71.
49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402-8.
50. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17:2257-317.
51. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol* 2012; 882:569-604.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

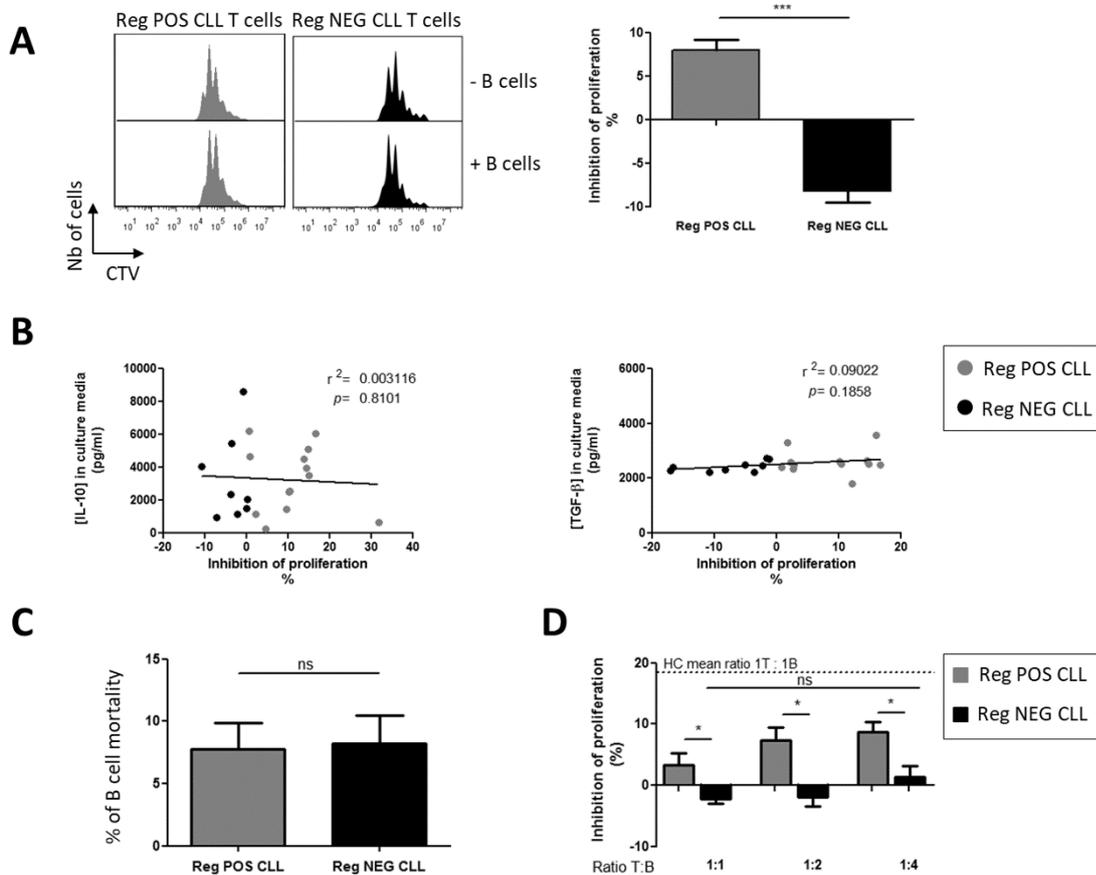


Figure 1: The regulatory activity of TLR9-stimulated CLL B cells is impaired.

Purified peripheral blood T cells from CLL patients were labeled with cell trace violet (CTV), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, and their proliferative response evaluated by the decreased CTV fluorescence intensity after four days of cultures with or without purified autologous CpG-stimulated B cells added at a 1:1 ratio. (A) Representative examples of T cell proliferation (left) and determination (right) of Reg POS CLL (n=30) and Reg NEG CLL (n=26) B cell regulatory activities evaluated as the B cell-induced inhibition of T cell proliferation. (B) Correlations between the B cell-induced inhibition of the T cell proliferation and the concentrations of IL-10 and TGF- β in the supernatants determined by ELISA. Regression lines are shown. (C) Frequencies of CD19+DRAQ7+ died B cells after 4 days of co-cultures evaluated by flow cytometry. (D) Regulatory activities of Reg POS CLL (n=3) and Reg NEG CLL

(n=6) B cells evaluated in co-cultures with T cells at various T cell:B cell ratio. Results are expressed as Mean \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns, not significant.

Figure 2

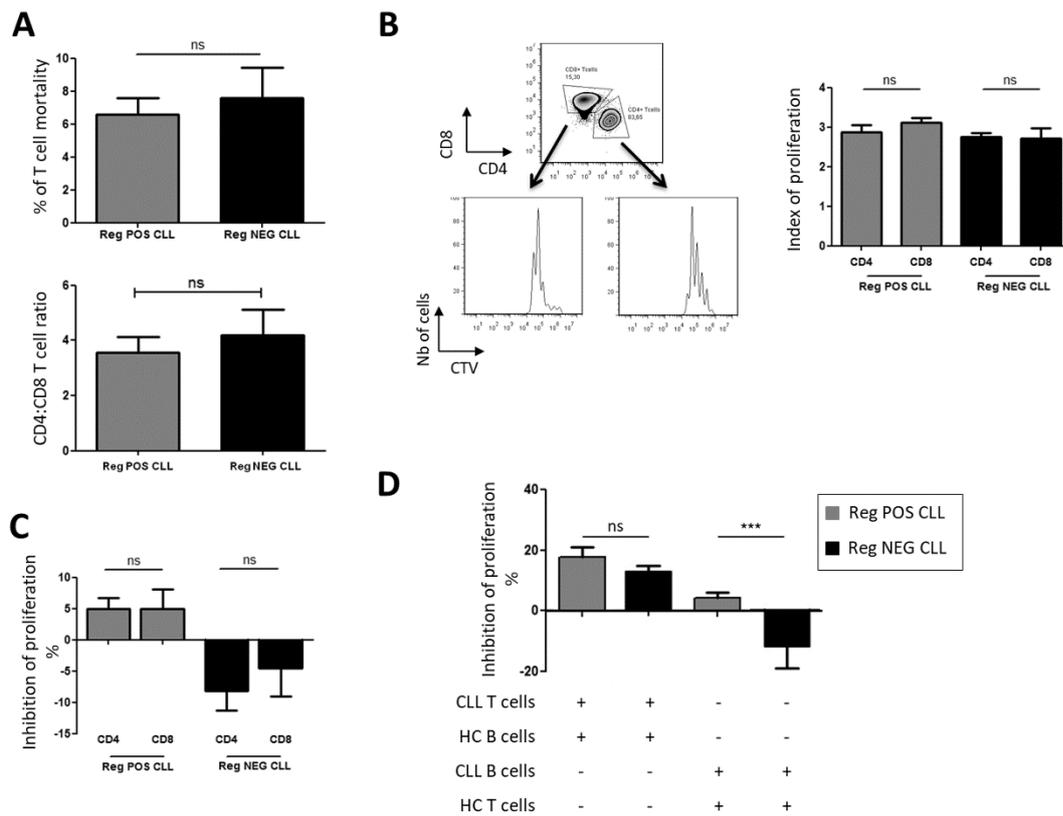


Figure 2: CLL T cell proliferative response is effective.

T and B cells were purified from the peripheral blood of CLL patients and healthy controls (HC). T cells were labeled with cell trace violet (CTV), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, and their proliferative response evaluated by the decreased CTV fluorescence intensity after four days of cultures with or without CpG-stimulated B cells. **(A)** Frequencies of CD19-DRAQ7+ died T cells after 4 days of co-culture evaluated by flow cytometry and CD4:CD8 T cells ratio in peripheral blood before co-culture. **(B)** Proliferation capacity of Reg POS CLL (n=6) and Reg NEG CLL (n=6) CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells stimulated without B cells. **(C)** Determination of the CLL B cell-induced inhibition of autologous CD4⁺ T cell and CD8⁺ T

cell proliferation. **(D)** Regulatory activities of Reg POS CLL (n=8) and Reg NEG CLL (n=16) B cells evaluated in heterologous co-cultures with HC cells. Mean \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001; ns, not significant.

Figure 3

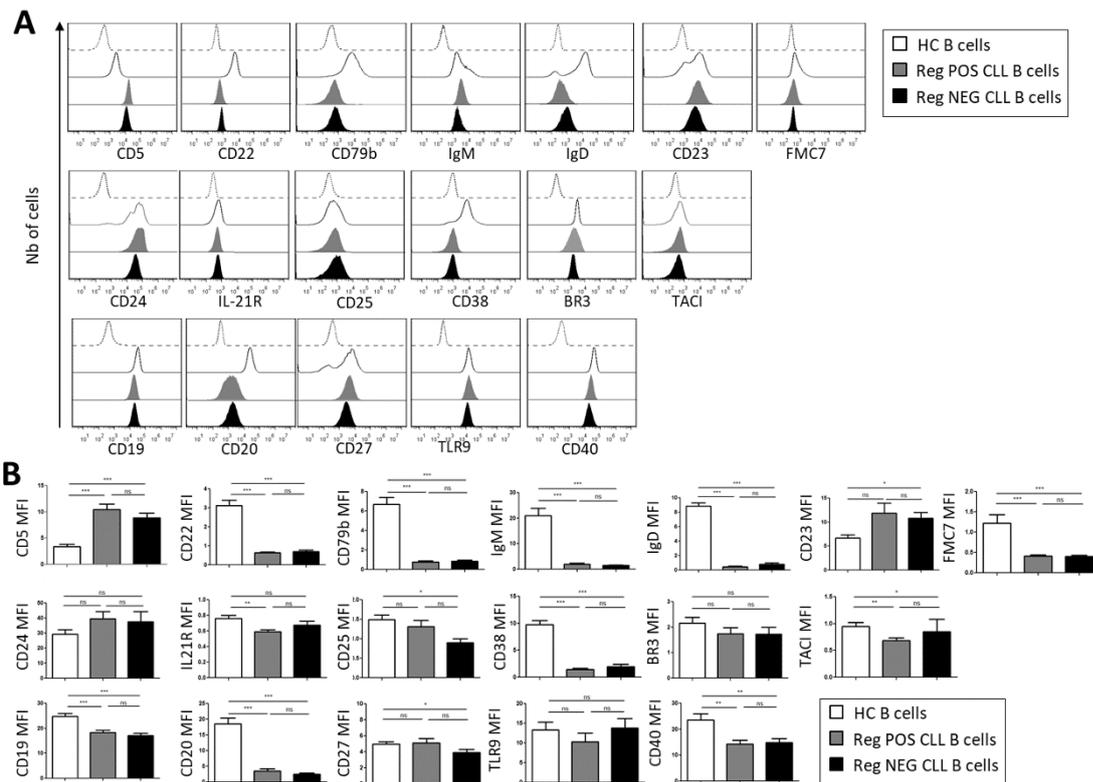


Figure 3: Phenotypic characteristics of CLL B cells.

(A) Representative examples of peripheral B cell flow cytometry analysis from healthy controls (HC), Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of all markers analyzed on HC (n=29), Reg POS CLL (n=21) and Reg NEG CLL (n=20) B cells. Representative examples of CD40 expression on HC (n=5), Reg low CLL (n=5) and Reg NEG CLL (n=5) B cells. (C) Determination of HC, Reg POS CLL and Reg NEG CLL B cell regulatory activities evaluated as the CpG-activated B cell-induced inhibition of T cell proliferation in a 4-day autologous co-culture with or without anti-CD40L blocking mAb. Results are expressed as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ns, not significant.

Figure 4

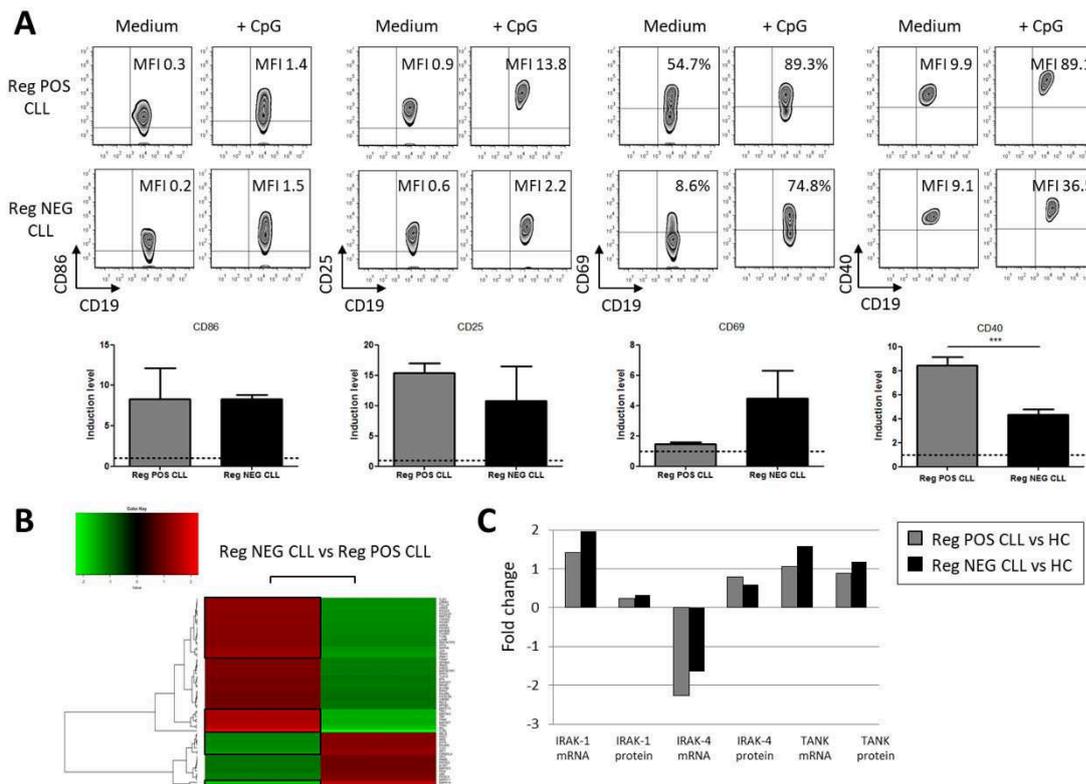


Figure 4: Specific TLR9 pathway functionalities in CLL B cells.

(A) Peripheral B cells from Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients were stimulated for 2 days with or without CpG-ODN. Representative examples of CD86, CD25, CD69 and CD40 expression analyzed by flow cytometry (upper) and index of induction (lower) on Reg POS CLL (n=5) and Reg NEG CLL (n=5) B cells. Results are expressed as Mean±SEM. ***p<0.001. (B-C) After 3 days of co-cultures with autologous activated T cells, CpG-stimulated HC, Reg POS CLL and Reg NEG CLL B cells were sorted. TLR-associated gene expressions were assessed using TaqMan array qRT-PCR and protein expressions assessed by Western Blot. (B) Heat maps of differential expression profiles (Ct values) between Reg POS CLL and Reg NEG CLL B cells are shown. (C)

Fold change expression of mRNA and proteins in Reg POS and Reg NEG CLL B cells compared to HC B cells.

Figure 5

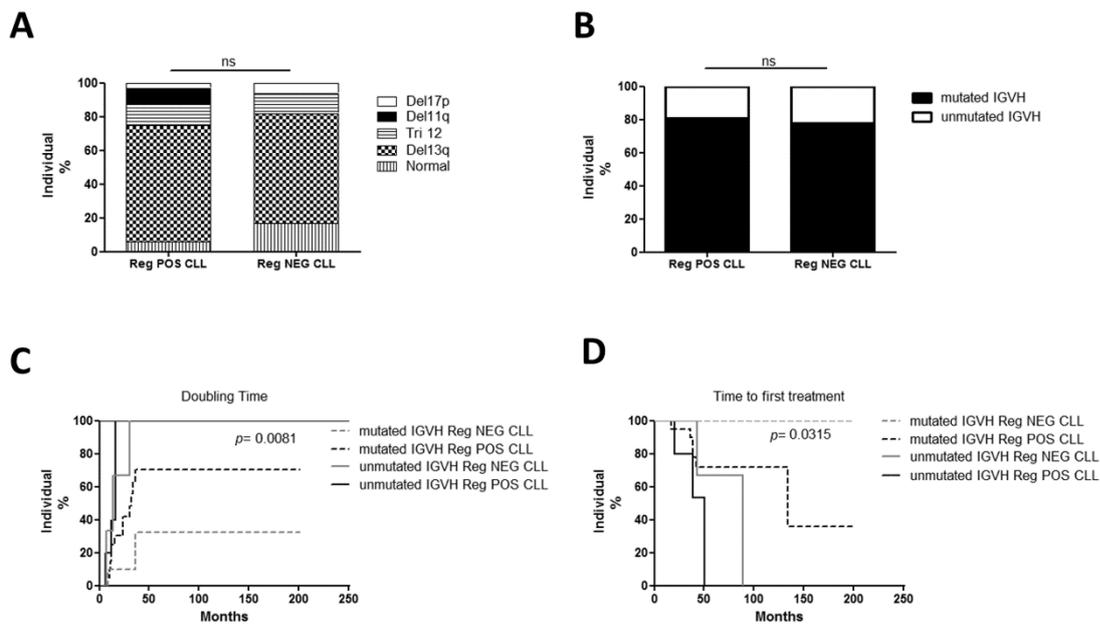


Figure 5: Patients with regulatory B cell activity present a more aggressive form of CLL.

Comparisons of chromosomal abnormalities (**A**) and IGVH mutational status (**B**) between Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients. (**C-D**) Kaplan-Meier graphs for the comparisons between Reg POS CLL and Reg NEG CLL patients according to their IGVH mutational status. (**C**) Comparisons of the doubling time of lymphocytosis. (**D**) Comparisons of the time to first treatment. ns, not significant.

Differential expression of the TLR9 pathway-associated genes in Reg NEG CLL B cells compared to Reg POS CLL B cells.

Clinical characteristics of the CLL patients.

	Reg POS CLL	Reg NEG CLL	p
	patients	patients	
Number of patients	n=30	n=26	
Sex ratio			
Male/Female	16/14	17/9	0.36
Binet's Stage			
A	17	18	0.33
B/C	13	8	
≥ 65 years old at diagnosis	13/30	14/26	0.43
Lymphocytosis			
≥50Giga/L	13	5	0.06
≤50Giga/L	17	21	
IgVH mutational status			
Mutated	21	11	1.00
Unmutated	5	3	
ND	4	12	
Cytogenetic abnormalities			
normal	2	3	
Del13q	22	11	
Tri12	4	2	
Del11q	3	0	0.52
Del17p	1	1	
UND	0	8	
CD38 MFI ± SEM	1.5±0.2	1.9±0.5	0.86

Abbreviations: MFI, mean fluorescence intensity; ND, not determined; UND, undetermined. p: Comparison between Reg POS and Reg NEG CLL patients.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* *32*, 1958–1968.
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 5–11.
- Akkaya, M., Akkaya, B., Kim, A.S., Miozzo, P., Sohn, H., Pena, M., Roesler, A.S., Theall, B.P., Henke, T., Kabat, J., et al. (2018). Toll-like receptor 9 antagonizes antibody affinity maturation. *Nat. Immunol.* *19*, 255–266.
- Alderson, M.R., and Lynch, D.H. (1998). Receptors and ligands that mediate activation-induced death of T cells. *Springer Semin. Immunopathol.* *19*, 289–300.
- Amano, M., Baumgarth, N., Dick, M.D., Brossay, L., Kronenberg, M., Herzenberg, L.A., and Strober, S. (1998). CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 1710–1717.
- Andersson, S., Sundberg, M., Pristovsek, N., Ibrahim, A., Jonsson, P., Katona, B., Clausson, C.-M., Zieba, A., Ramström, M., Söderberg, O., et al. (2017). Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nat. Commun.* *8*, 15840.
- Andonegui, G., Bonder, C.S., Green, F., Mullaly, S.C., Zbytniuk, L., Raharjo, E., and Kubes, P. (2003). Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J. Clin. Invest.* *111*, 1011–1020.
- Anel, A., Bosque, A., Naval, J., Pineiro, A., Larrad, L., Alava, M.A., and Martinez-Lorenzo, M.J. (2007). Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *12*, 2074–2084.
- Avalos, A.M., Kiefer, K., Tian, J., Christensen, S., Shlomchik, M., Coyle, A.J., and Marshak-Rothstein, A. (2010). RAGE-independent autoreactive B cell activation in response to chromatin and HMGB1/DNA immune complexes. *Autoimmunity* *43*, 103–110.
- Baiyee, E.E., Flohe, S., Lendemans, S., Bauer, S., Mueller, N., Kreuzfelder, E., and Grosse-Wilde, H. Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* *145*, 456–462.
- Baker, M. (2015). Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* *521*, 274–276.
- Bankoti, R., Gupta, K., Levchenko, A., and Stäger, S. (2012). Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 3961–3971.
- Barr, T.A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., and Gray, D. (2007). TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *37*, 3040–3053.
- Barton, G.M. (2007). Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* *19*, 33–40.
- Bauer, S. (2013). Toll-like receptor 9 processing: the key event in Toll-like receptor 9 activation? *Immunol. Lett.* *149*, 85–87.

- Berglund, L., Björling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szgyarto, C.A.-K., Persson, A., Ottosson, J., Wernérus, H., Nilsson, P., et al. (2008). A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7, 2019–2027.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199–2202.
- Beutler, B. (2002). TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270, 109–120.
- Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2009). Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 6105–6113.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220.
- Blair, P.A., Chavez-Rueda, K.A., Evans, J.G., Shlomchik, M.J., Eddaoudi, A., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (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. Baltim. Md 1950* 182, 3492–3502.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (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, 129–140.
- Blasius, A.L., Arnold, C.N., Georgel, P., Rutschmann, S., Xia, Y., Lin, P., Ross, C., Li, X., Smart, N.G., and Beutler, B. (2010). Slc15a4, AP-3, and Hermansky-Pudlak syndrome proteins are required for Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19973–19978.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.-J., and O’Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 197, 101–109.
- Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D.A., Jury, E.C., and Mauri, C. (2012). Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 36, 477–490.
- Bossaller, L., Christ, A., Pelka, K., Nündel, K., Chiang, P.-I., Pang, C., Mishra, N., Busto, P., Bonegio, R.G., Schmidt, R.E., et al. (2016). TLR9 Deficiency Leads to Accelerated Renal Disease and Myeloid Lineage Abnormalities in Pristane-Induced Murine Lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 197, 1044–1053.
- Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 40, 2686–2691.
- Bourbeillon, J., Orchard, S., Benhar, I., Borrebaeck, C., de Daruvar, A., Dübel, S., Frank, R., Gibson, F., Gloriam, D., Haslam, N., et al. (2010). Minimum information about a protein affinity reagent (MIAPAR). *Nat. Biotechnol.* 28, 650–653.

- Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., and Mantovani, A. (2003). The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* *102*, 956–963.
- Bradbury, A., and Plückthun, A. (2015). Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* *518*, 27–29.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* *177*, 265–275.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* *303*, 1532–1535.
- Busconi, L., Bauer, J.W., Tumang, J.R., Laws, A., Perkins-Mesires, K., Tabor, A.S., Lau, C., Corley, R.B., Rothstein, T.L., Lund, F.E., et al. (2007). Functional outcome of B cell activation by chromatin immune complex engagement of the B cell receptor and TLR9. *J. Immunol. Baltim. Md* *179*, 7397–7405.
- Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., and Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *186*, 5569–5579.
- Chan, M.P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G.N., and Miyake, K. (2015). DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* *6*, 5853.
- Chaturvedi, A., Dorward, D., and Pierce, S.K. (2008). The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* *28*, 799–809.
- Chiang, C.-Y., Engel, A., Opaluch, A.M., Ramos, I., Maestre, A.M., Secundino, I., De Jesus, P.D., Nguyen, Q.T., Welch, G., Bonamy, G.M.C., et al. (2012). Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* *11*, 306–318.
- Chockalingam, A., Brooks, J.C., Cameron, J.L., Blum, L.K., and Leifer, C.A. (2009). TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol. Cell Biol.* *87*, 209–217.
- Chockalingam, A., Rose, W.A., Hasan, M., Ju, C.-H., and Leifer, C.A. (2012). Cutting edge: a TLR9 cytoplasmic tyrosine motif is selectively required for proinflammatory cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md* *188*, 527–530.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* *25*, 417–428.
- Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S., and Cohen, P. (2011). The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the I κ B kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17093–17098.
- Dasari, P., Nicholson, I.C., Hodge, G., Dandie, G.W., and Zola, H. (2005). Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell. Immunol.* *236*, 140–145.

- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* 74, 181–189.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (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, 3645–3656.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97–101.
- Duramad, O., Fearon, K.L., Chang, B., Chan, J.H., Gregorio, J., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2005). Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 5193–5200.
- Eaton-Bassiri, A., Dillon, S.B., Cunningham, M., Ryczyn, M.A., Mills, J., Sarisky, R.T., and Mbow, M.L. (2004). Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 72, 7202–7211.
- Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M.C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* 33, 827–833.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 196, 1645–1651.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7867–7879.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7868–7878.
- Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658–662.
- Ewald, S.E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogoyo, M., and Barton, G.M. (2011). Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.* 208, 643–651.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944–950.
- Fillatreau, S., Gray, D., and Anderton, S.M. (2008). Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 391–397.
- Flannery, S., and Bowie, A.G. (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1981–1991.
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* 5, 173ra23.

- Fukui, R., Saitoh, S., Matsumoto, F., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Tabeta, K., Beutler, B., and Miyake, K. (2009). Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA-but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.* *206*, 1339–1350.
- Fukui, R., Saitoh, S.-I., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshida, N., et al. (2011a). Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* *35*, 69–81.
- Fukui, R., Saitoh, S.-I., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshida, N., et al. (2011b). Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* *35*, 69–81.
- Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., and Bryant, C.E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 546–558.
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 7779–7786.
- Gies, V., Schickel, J.-N., Jung, S., Joublin, A., Glauzy, S., Knapp, A.-M., Soley, A., Poindron, V., Guffroy, A., Choi, J.-Y., et al. (2018). Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *JCI Insight* *3*.
- Gilda, J.E., Ghosh, R., Cheah, J.X., West, T.M., Bodine, S.C., and Gomes, A.V. (2015). Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PloS One* *10*, e0135392.
- Goodman, S.L. (2018). The antibody horror show: an introductory guide for the perplexed. *New Biotechnol.*
- Grammer, A.C., and Lipsky, P.E. (2002). CD154-CD40 interactions mediate differentiation to plasma cells in healthy individuals and persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *46*, 1417–1429.
- Gray, M., Miles, K., Salter, D., Gray, D., and Savill, J. (2007). Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14080–14085.
- Green, N.M., and Marshak-Rothstein, A. (2011). Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. *Semin. Immunol.* *23*, 106–112.
- Guerrier, T., Pochard, P., Lahiri, A., Youinou, P., Pers, J.-O., and Jamin, C. (2014). TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J. Autoimmun.* *51*, 23–29.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.-D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* *203*, 1999–2008.
- Günthner, R., Kumar, V.R.S., Lorenz, G., Anders, H.-J., and Lech, M. (2013). Pattern-recognition receptor signaling regulator mRNA expression in humans and mice, and in transient inflammation or progressive fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 18124–18147.

- Gürsel, M., Verthelyi, D., Gürsel, I., Ishii, K.J., and Klinman, D.M. (2002). Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J. Leukoc. Biol.* *71*, 813–820.
- Hall, J.C., and Rosen, A. (2010). Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* *6*, 40–49.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* *1*, 475–482.
- Harris, D.P., Goodrich, S., Gerth, A.J., Peng, S.L., and Lund, F.E. (2005). Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6781–6790.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.
- Henault, J., Martinez, J., Riggs, J.M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M.M., Iwasaki, A., et al. (2012). Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* *37*, 986–997.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D., and Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* *199*, 1479–1489.
- Hjelm, B., Forsström, B., Igel, U., Johannesson, H., Stadler, C., Lundberg, E., Ponten, F., Sjöberg, A., Rockberg, J., Schwenk, J.M., et al. (2011). Generation of monospecific antibodies based on affinity capture of polyclonal antibodies. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *20*, 1824–1835.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035–1040.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4531–4537.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* *294*, 870–875.
- Hussain, S., and Delovitch, T.L. (2007). Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 7225–7232.
- Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. (2003). Toll signaling: the TIREless quest for specificity. *Nat. Immunol.* *4*, 105–106.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., and Fukuhara, S. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* *195*, 1507–1512.

- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Iwata, S., Yamaoka, K., Niiro, H., Nakano, K., Wang, S.-P., Akashi, K., and Tanaka, Y. (2012). Amplification of Toll-like receptor-mediated signaling through spleen tyrosine kinase in human B-cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1594–1601.e2.
- Iwata, S., Yamaoka, K., Niiro, H., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Wang, S.-P., Kondo, M., Yoshikawa, M., Akashi, K., and Tanaka, Y. (2015). Increased Syk phosphorylation leads to overexpression of TRAF6 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 24, 695–704.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530–541.
- Jabara, H.H., McDonald, D.R., Janssen, E., Massaad, M.J., Ramesh, N., Borzutzky, A., Rauter, I., Benson, H., Schneider, L., Baxi, S., et al. (2012). DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. *Nat. Immunol.* 13, 612–620.
- Kaisho, T., Hoshino, K., Iwabe, T., Takeuchi, O., Yasui, T., and Akira, S. (2002). Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int. Immunol.* 14, 695–700.
- Kaku, H., Cheng, K.F., Al-Abed, Y., and Rothstein, T.L. (2014). A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5904–5913.
- Kaltenmeier, C., Gawanbacht, A., Beyer, T., Lindner, S., Trzaska, T., van der Merwe, J.A., Härter, G., Grüner, B., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2015). CD4⁺ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 3768–3777.
- Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L. (1974). B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251, 550–551.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 4465–4474.
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., et al. (2005). Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 280, 8086–8093.
- Khoder, A., Sarvaria, A., Alsuliman, A., Chew, C., Sekine, T., Cooper, N., Mielke, S., de Lavallade, H., Muftuoglu, M., Fernandez Curbelo, I., et al. (2014). Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood* 124, 2034–2045.
- Kim, J., Huh, J., Hwang, M., Kwon, E.-H., Jung, D.-J., Brinkmann, M.M., Jang, M.H., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2013). Acidic amino acid residues in the juxtamembrane region of the nucleotide-sensing TLRs are important for UNC93B1 binding and signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 5287–5295.

- Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234–238.
- Kremlitzka, M., Mácsik-Valent, B., and Erdei, A. (2015). Syk is indispensable for CpG-induced activation and differentiation of human B cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 2223–2236.
- Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709–760.
- Krieg, A.M., and Vollmer, J. (2007). Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol. Rev.* 220, 251–269.
- Kuraoka, M., Snowden, P.B., Nojima, T., Verkoczy, L., Haynes, B.F., Kitamura, D., and Kelsoe, G. (2017). BCR and Endosomal TLR Signals Synergize to Increase AID Expression and Establish Central B Cell Tolerance. *Cell Rep.* 18, 1627–1635.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., et al. (2008a). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4763–4773.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderón Gómez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., et al. (2008b). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 4763–4773.
- Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., Boudinot, P., Anderton, S.M., and Fillatreau, S. (2010). Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol. Rev.* 233, 146–161.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 268–274.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5, 190–198.
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C.G., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., et al. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* 8, 772–779.
- Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., et al. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J. Exp. Med.* 202, 1171–1177.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D’Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461–470.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* 4, 1009–1015.

- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416, 603–607.
- Lee, B.L., and Barton, G.M. (2014). Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol.* 24, 360–369.
- Lee, B.L., Moon, J.E., Shu, J.H., Yuan, L., Newman, Z.R., Schekman, R., and Barton, G.M. (2013). UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife* 2, e00291.
- Lee, C.C., Avalos, A.M., and Ploegh, H.L. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 168–179.
- Lee, J., Mo, J.-H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A.N., Liu, Y.-T., Lee, H.-K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., et al. (2006). Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327–1336.
- Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J., and Segal, D.M. (2004). TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1179–1183.
- Leifer, C.A., Brooks, J.C., Hoelzer, K., Lopez, J., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., and Segal, D.M. (2006). Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J. Biol. Chem.* 281, 35585–35592.
- Leifer, C.A., Rose, W.A., and Botelho, F. (2013). Traditional biochemical assays for studying toll-like receptor 9. *J. Immunoassay Immunochem.* 34, 1–15.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J. Autoimmun.* 36, 228–238.
- Lenert, P., Brummel, R., Field, E.H., and Ashman, R.F. (2005). TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J. Clin. Immunol.* 25, 29–40.
- Li, D., De, S., Li, D., Song, S., Matta, B., and Barnes, B.J. (2016). Specific detection of interferon regulatory factor 5 (IRF5): A case of antibody inequality. *Sci. Rep.* 6, 31002.
- Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 73, 2468–2479.
- Liu, B., Yang, Y., Qiu, Z., Staron, M., Hong, F., Li, Y., Wu, S., Li, Y., Hao, B., Bona, R., et al. (2010). Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat. Commun.* 1, 79.
- Liu, J., Zhan, W., Kim, C.J., Clayton, K., Zhao, H., Lee, E., Cao, J.C., Ziegler, B., Gregor, A., Yue, F.Y., et al. (2014). IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PloS One* 9, e89236.

- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* *190*, 75–89.
- Lopez-Medina, M., Perez-Lopez, A., Alpuche-Aranda, C., and Ortiz-Navarrete, V. (2015). Salmonella induces PD-L1 expression in B cells. *Immunol. Lett.* *167*, 131–140.
- Lundy, S.K. (2009). Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* *58*, 345–357.
- Mañes, S., del Real, G., and Martínez-A, C. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 557–568.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., and Dittel, B.N. (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. Baltim. Md 1950* *178*, 3447–3456.
- Manzel, L., and Macfarlane, D.E. (1999). Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* *9*, 459–464.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 823–835.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 323–335.
- Maschalidi, S., Nunes-Hasler, P., Nascimento, C.R., Sallent, I., Lannoy, V., Garfa-Traore, M., Cagnard, N., Sepulveda, F.E., Vargas, P., Lennon-Duménil, A.-M., et al. (2017). UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells. *Nat. Commun.* *8*, 1640.
- de Masson, A., Bouaziz, J.-D., Le Buanec, H., Robin, M., O’Meara, A., Parquet, N., Rybojad, M., Hau, E., Monfort, J.-B., Branchtein, M., et al. (2015). CD24(hi)CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* *125*, 1830–1839.
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* *41*, 1040–1051.
- Matsumura, Y., Byrne, S.N., Nghiem, D.X., Miyahara, Y., and Ullrich, S.E. (2006). A role for inflammatory mediators in the induction of immunoregulatory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 4810–4817.
- Mauri, C., and Menon, M. (2015a). The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* *27*, 479–486.
- Mauri, C., and Menon, M. (2015b). The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* *27*, 479–486.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* *197*, 489–501.
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* *115*, 407–417.

- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *1*, 135–145.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.
- Menon, M., Blair, P.A., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2016). A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* *44*, 683–697.
- Miyagaki, T., Fujimoto, M., and Sato, S. (2015). Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *Int. Immunol.* *27*, 495–504.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Smith, R.N., Preffer, F.I., and Bhan, A.K. (1997). Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J. Exp. Med.* *186*, 1749–1756.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* *16*, 219–230.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F.I., and Bhan, A.K. (2000). Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* *12*, 597–605.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O’Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 683–765.
- Mouchess, M.L., Arpaia, N., Souza, G., Barbalat, R., Ewald, S.E., Lau, L., and Barton, G.M. (2011). Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* *35*, 721–732.
- Moulin, V., Andris, F., Thielemans, K., Maliszewski, C., Urbain, J., and Moser, M. (2000). B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J. Exp. Med.* *192*, 475–482.
- Murakami, Y., Fukui, R., Motoi, Y., Shibata, T., Saitoh, S.-I., Sato, R., and Miyake, K. (2017). The protective effect of the anti-Toll-like receptor 9 antibody against acute cytokine storm caused by immunostimulatory DNA. *Sci. Rep.* *7*, 44042.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* *278*, 1612–1615.
- Neta, R., and Salvin, S.B. (1974). Specific Suppression of Delayed Hypersensitivity: The Possible Presence of a Suppressor B Cell in the Regulation of Delayed Hypersensitivity. *J. Immunol.* *113*, 1716–1725.
- Neufert, C., Pai, R.K., Noss, E.H., Berger, M., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2001). Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 1542–1549.
- Nguyen, K.B., Watford, W.T., Salomon, R., Hofmann, S.R., Pien, G.C., Morinobu, A., Gadina, M., O’Shea, J.J., and Biron, C.A. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* *297*, 2063–2066.

- Nickerson, K.M., Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., and Shlomchik, M.J. (2010). TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 1840–1848.
- Nishizumi, H., Taniuchi, I., Yamanashi, Y., Kitamura, D., Ilic, D., Mori, S., Watanabe, T., and Yamamoto, T. (1995). Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* *3*, 549–560.
- Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J.O., and Hillion, S. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J. Autoimmun.* *59*, 53–60.
- Nündel, K., Busto, P., Debatis, M., and Marshak-Rothstein, A. (2013). The role of Bruton's tyrosine kinase in the development and BCR/TLR-dependent activation of AM14 rheumatoid factor B cells. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 865–875.
- O'Connor, R.A., Malpass, K.H., and Anderton, S.M. (2007). The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 958–966.
- O'Garra, A., Stapleton, G., Dhar, V., Pearce, M., Schumacher, J., Rugo, H., Barbis, D., Stall, A., Cupp, J., and Moore, K. (1990). Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.* *2*, 821–832.
- Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* *520*, 702–705.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- O'Neill, S.K., Veselits, M.L., Zhang, M., Labno, C., Cao, Y., Finnegan, A., Uccellini, M., Alegre, M.-L., Cambier, J.C., and Clark, M.R. (2009). Endocytic sequestration of the B cell antigen receptor and toll-like receptor 9 in anergic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 6262–6267.
- Onji, M., Kanno, A., Saitoh, S.-I., Fukui, R., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Lamichhane, A., Sato, S., Kiyono, H., et al. (2013). An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat. Commun.* *4*, 1949.
- Palliser, D., Ploegh, H., and Boes, M. (2004). Myeloid differentiation factor 88 is required for cross-priming in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 3415–3421.
- Parekh, V.V., Prasad, D.V.R., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A., and Mishra, G.C. (2003). B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 5897–5911.
- Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.-M., and Ploegh, H.L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *9*, 1407–1414.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033–1036.

- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* *560*, 11–18.
- Pauly, D., and Hanack, K. (2015). How to avoid pitfalls in antibody use. *F1000Research* *4*, 691.
- Pawaria, S., Moody, K., Busto, P., Nündel, K., Choi, C.-H., Ghayur, T., and Marshak-Rothstein, A. (2015). Cutting Edge: DNase II deficiency prevents activation of autoreactive B cells by double-stranded DNA endogenous ligands. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 1403–1407.
- Pelka, K., Phulphagar, K., Zimmermann, J., Stahl, R., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Spille, J.-H., Labzin, L.I., Agrawal, S., Kandimalla, E.R., et al. (2014). Cutting edge: the UNC93B1 tyrosine-based motif regulates trafficking and TLR responses via separate mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 3257–3261.
- Pelka, K., Shibata, T., Miyake, K., and Latz, E. (2016). Nucleic acid-sensing TLRs and autoimmunity: novel insights from structural and cell biology. *Immunol. Rev.* *269*, 60–75.
- Peter, M.E., Kubarenko, A.V., Weber, A.N.R., and Dalpke, A.H. (2009). Identification of an N-terminal recognition site in TLR9 that contributes to CpG-DNA-mediated receptor activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7690–7697.
- Piao, W., Song, C., Chen, H., Diaz, M.A.Q., Wahl, L.M., Fitzgerald, K.A., Li, L., and Medvedev, A.E. (2009). Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 863–875.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085–2088.
- Pone, E.J., Zhang, J., Mai, T., White, C.A., Li, G., Sakakura, J.K., Patel, P.J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z., et al. (2012). BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway. *Nat. Commun.* *3*, 767.
- Poovassery, J.S., Vanden Bush, T.J., and Bishop, G.A. (2009). Antigen receptor signals rescue B cells from TLR tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 2974–2983.
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C.J., et al. (2006). Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *116*, 456–464.
- Qian, L., Qian, C., Chen, Y., Bai, Y., Bao, Y., Lu, L., and Cao, X. (2012). Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}Fc γ IIb^{hi} regulatory B cells through IFN- β and CD40L. *Blood* *120*, 581–591.
- Rafei, M., Hsieh, J., Zehntner, S., Li, M., Forner, K., Birman, E., Boivin, M.-N., Young, Y.K., Perreault, C., and Galipeau, J. (2009). A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat. Med.* *15*, 1038–1045.
- Rawlings, D.J., Schwartz, M.A., Jackson, S.W., and Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 282–294.

- Rawlings, D.J., Metzler, G., Wray-Dutra, M., and Jackson, S.W. (2017). Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 421–436.
- Rogge, L., D'Ambrosio, D., Biffi, M., Penna, G., Minetti, L.J., Presky, D.H., Adorini, L., and Sinigaglia, F. (1998). The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 6567–6574.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2014). Regulatory B cells in experimental mouse models of arthritis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1190*, 183–194.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* *42*, 607–612.
- Rosser, E.C., Oleinika, K., Tonon, S., Doyle, R., Bosma, A., Carter, N.A., Harris, K.A., Jones, S.A., Klein, N., and Mauri, C. (2014). Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat. Med.* *20*, 1334–1339.
- Rui, L., Vinuesa, C.G., Blasioli, J., and Goodnow, C.C. (2003). Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat. Immunol.* *4*, 594–600.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G.B., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2541–2550.
- Saikh, K.U., Kissner, T.L., Sultana, A., Ruthel, G., and Ulrich, R.G. (2004). Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 7426–7434.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2760–2769.
- Santiago-Raber, M.-L., Dunand-Sauthier, I., Wu, T., Li, Q.-Z., Uematsu, S., Akira, S., Reith, W., Mohan, C., Kotzin, B.L., and Izui, S. (2010). Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J. Autoimmun.* *34*, 339–348.
- Sartor, R.B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* *126*, 1620–1633.
- Sasai, M., Linehan, M.M., and Iwasaki, A. (2010). Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* *329*, 1530–1534.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *6*, 1087–1095.
- Saze, Z., Schuler, P.J., Hong, C.-S., Cheng, D., Jackson, E.K., and Whiteside, T.L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* *122*, 9–18.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.

- Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Müller-Hermelink, H.-K., and Eck, M. (2004). Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* *136*, 521–526.
- Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *2*, 947–950.
- Schneider, P., Takatsuka, H., Wilson, A., Mackay, F., Tardivel, A., Lens, S., Cachero, T.G., Finke, D., Beermann, F., and Tschoop, J. (2001). Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J. Exp. Med.* *194*, 1691–1697.
- Schubert, R.D., Hu, Y., Kumar, G., Szeto, S., Abraham, P., Winderl, J., Guthridge, J.M., Pardo, G., Dunn, J., Steinman, L., et al. (2015). IFN- β treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 2110–2116.
- Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L., and Manoury, B. (2009). Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* *31*, 737–748.
- Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willimsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D.E., et al. (2015). Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* *521*, 94–98.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Freeman, G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* *8*, 239–245.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366–370.
- Sonoda, K.-H., and Stein-Streilein, J. (2002). CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. J. Immunol.* *32*, 848–857.
- Stadler, C., Hjelmare, M., Neumann, B., Jonasson, K., Pepperkok, R., Uhlén, M., and Lundberg, E. (2012). Systematic validation of antibody binding and protein subcellular localization using siRNA and confocal microscopy. *J. Proteomics* *75*, 2236–2251.
- Sun, C.-M., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2005). Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* *22*, 467–477.
- Suzuki, N., Suzuki, S., and Yeh, W.-C. (2002). IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol.* *23*, 503–506.
- Swallow, M.M., Wallin, J.J., and Sha, W.C. (1999). B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* *11*, 423–432.
- Szili, D., Bankó, Z., Tóth, E.A., Nagy, G., Rojkovich, B., Gáti, T., Simon, M., Hérincs, Z., and Sármay, G. (2014). TGF β activated kinase 1 (TAK1) at the crossroad of B cell receptor and Toll-like receptor 9 signaling pathways in human B cells. *PloS One* *9*, e96381.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* *7*, 156–164.

- Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., et al. (2007). A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* *204*, 2963–2976.
- Takeshita, F., Leifer, C.A., Gursel, I., Ishii, K.J., Takeshita, S., Gursel, M., and Klinman, D.M. (2001). Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *J. Immunol.* *167*, 3555–3558.
- Tedder, T.F., and Matsushita, T. (2010). Regulatory B cells that produce IL-10: a breath of fresh air in allergic airway disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 1125–1127.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 1081–1089.
- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* *8*, 487–496.
- Tosello Boari, J., Amezcua Vesely, M.C., Bermejo, D.A., Ramello, M.C., Montes, C.L., Cejas, H., Gruppi, A., and Acosta Rodríguez, E.V. (2012). IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* *8*, e1002658.
- Tough, D.F., Sun, S., Zhang, X., and Sprent, J. (1999). Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. *Immunol. Rev.* *170*, 39–47.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 133–146.
- Tu, W., Lau, Y.-L., Zheng, J., Liu, Y., Chan, P.-L., Mao, H., Dionis, K., Schneider, P., and Lewis, D.B. (2008). Efficient generation of human alloantigen-specific CD4⁺ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood* *112*, 2554–2562.
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Mathisen, P.M., Johnson, J.M., and Kawczak, J.A. (2000). Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* *111*, 55–63.
- Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D.L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., et al. (2016). A proposal for validation of antibodies. *Nat. Methods* *13*, 823–827.
- Uray, K., Mizuno, M., Inazu, T., Goto, K., and Hudecz, F. (2014). The effect of glycosylation on the antibody recognition of a MUC2 mucin epitope. *Biopolymers* *102*, 390–395.
- Vanden Bush, T.J., and Bishop, G.A. (2008). TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation. *Eur. J. Immunol.* *38*, 400–409.
- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 1204–1212.

- Verthelyi, D., and Zeuner, R.A. (2003). Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends Immunol.* *24*, 519–522.
- Viglianti, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2003). Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* *19*, 837–847.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., et al. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* *34*, 251–262.
- Vollmer, S., Strickson, S., Zhang, T., Gray, N., Lee, K.L., Rao, V.R., and Cohen, P. (2017). The mechanism of activation of IRAK1 and IRAK4 by interleukin-1 and Toll-like receptor agonists. *Biochem. J.* *474*, 2027–2038.
- Voskuil, J. (2014). Commercial antibodies and their validation. *F1000Research* *3*, 232.
- Voskuil, J.L.A. (2017). The challenges with the validation of research antibodies. *F1000Research* *6*, 161.
- Walters, S., Webster, K.E., Sutherland, A., Gardam, S., Groom, J., Liuwantara, D., Mariño, E., Thaxton, J., Weinberg, A., Mackay, F., et al. (2009). Increased CD4+Foxp3+ T cells in BAFF-transgenic mice suppress T cell effector responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 793–801.
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* *20*, 633–641.
- Weller, M.G. (2016). Quality Issues of Research Antibodies. *Anal. Chem. Insights* *11*, 21–27.
- Weller, M.G. (2018). Ten Basic Rules of Antibody Validation. *Anal. Chem. Insights* *13*, 1177390118757462.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* *7*, 837–847.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* *78*, 1101–1115.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 2271–2278.
- Wu, X., and Peng, S.L. (2006). Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum.* *54*, 336–342.
- Wu, Y.-Y., Kumar, R., Haque, M.S., Castillejo-López, C., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2013). BANK1 controls CpG-induced IL-6 secretion via a p38 and MNK1/2/eIF4E translation initiation pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 6110–6116.
- Wu, Y.-Y., Kumar, R., Iida, R., Bagavant, H., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2016). BANK1 Regulates IgG Production in a Lupus Model by Controlling TLR7-Dependent STAT1 Activation. *PloS One* *11*, e0156302.

- Xu, Y., Harder, K.W., Huntington, N.D., Hibbs, M.L., and Tarlinton, D.M. (2005). Lyn tyrosine kinase: accentuating the positive and the negative. *Immunity* 22, 9–18.
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T., et al. (2008). PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 3220–3224.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639–650.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T.F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 7459–7472.
- Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M.K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., et al. (2009). HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462, 99–103.
- Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.-H., Xu, H., Zheng, B.-J., Cao, X., and Lu, L. (2010). Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3321–3325.
- Yang, Y., Huang, C.-T., Huang, X., and Pardoll, D.M. (2004). Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat. Immunol.* 5, 508–515.
- Yi, A.K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J., and Krieg, A.M. (1998). CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 4755–4761.
- Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D.J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E.I., Spolski, R., Poe, J.C., Leonard, W.J., and Tedder, T.F. (2012). Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491, 264–268.
- Yu, P., Wellmann, U., Kunder, S., Quintanilla-Martinez, L., Jennen, L., Dear, N., Amann, K., Bauer, S., Winkler, T.H., and Wagner, H. (2006). Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int. Immunol.* 18, 1211–1219.

Titre : Etude du TLR9 à la membrane plasmique des lymphocytes B - Caractérisation des anticorps anti-TLR9 commerciaux

Mots clés : Lymphocyte B régulateur, TLR9 à la membrane plasmique, anticorps commerciaux

Résumé : Des lymphocytes B (LB) appelés LB régulateurs (LB_{reg}) jouent un rôle primordial dans le contrôle de la réponse immunologique. Ces LB_{reg} peuvent être induits suite à une stimulation. Ainsi, le *Toll-like receptor* (TLR) 9, récepteur de l'immunité innée, participe à cette induction. La voie de signalisation du TLR9 est déficiente chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé qui souffrent d'hyper-inflammation chronique et dont les LB_{reg} sont défectueux. Pour étudier le TLR9, des anticorps commerciaux sont classiquement utilisés. Parmi eux, l'anticorps monoclonal de souris anti-TLR9 26C593.2 cible un épitope présent à la membrane plasmique des LB. De plus, cet anticorps active les LB *in vitro* et bloque l'effet du CpG-ODN, agoniste du TLR9 endosomal. Nous montrons dans ce travail que cinq anticorps anti-TLR9 commerciaux ne sont pas spécifiques du TLR9 et reconnaissent d'autres

antigènes. Quatre anticorps sont pourtant capables de reconnaître une protéine TLR9 recombinante commerciale. Afin de contourner le problème de spécificité de ces anticorps, nous avons construit un TLR9 chimérique tagué par une hémagglutinine (TLR9-HA). Trois anticorps reconnaissent cette protéine surexprimée dans des cellules transfectées. Cependant, aucun TLR9-HA ne semble être présent à la membrane plasmique des cellules transfectées. Cette approche nous a permis de démontrer que les anticorps anti-TLR9 se fixent à la membrane plasmique sur une autre cible que le TLR9. Il sera intéressant d'identifier cette protéine afin de mieux comprendre l'effet de l'anticorps anti-TLR9 monoclonal de souris sur l'activation et plus particulièrement sur l'acquisition des propriétés régulatrices des LB.

Title : Study of TLR9 at the B cell plasmic membrane - Commercial anti-TLR9 antibodies characterization

Keywords : Regulatory B cells, plasmic membrane located TLR9, commercial antibodies

Abstract: Regulatory B cells (B_{reg}) play a key role in regulating the immunological response. This regulatory behaviour can be induced by stimulation of the B cells. Toll-like receptor 9 (TLR9), an innate immune receptor, participate to that induction. TLR9 signalling pathway is deficient in B cells from systemic lupus erythematosus patients suffering from chronic hyper-inflammation and having defective B_{reg} cells. To study TLR9, commercial antibodies are commonly used. Among them, the anti-TLR9 monoclonal antibody 26C593.2 targets an epitope located at the plasma membrane of the B cells. Moreover, this particular antibody activates the B cells *in vitro* and blocks the CpG-ODN effects, an agonist of the endosomal TLR9. In this work, we show that five com-

mercial antibodies are not specific for the TLR9 protein and recognize other antigens. However, four tested antibodies can recognize recombinant TLR9 molecule. In order to avoid the specificity problem, we achieved to build a chimeric TLR9 protein expressing a hemagglutinin tag at its C-terminal region (TLR9-HA). Three antibodies efficiently target this overexpressed protein in transfected cells. However, no TLR9-HA molecule seems to be located at the plasma membrane of transfected cells. This approach allowed us to demonstrate that anti-TLR9 antibodies recognize another target than TLR9. It would of interest to identify that protein in order to better understand the mouse monoclonal anti-TLR9 antibody effect on B cell activation and B_{reg} properties.