



**HAL**  
open science

# Caractérisation des lymphocytes B régulateurs chez l'Homme

Quentin Simon

► **To cite this version:**

Quentin Simon. Caractérisation des lymphocytes B régulateurs chez l'Homme. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0062 . tel-01980363

**HAL Id: tel-01980363**

**<https://theses.hal.science/tel-01980363>**

Submitted on 14 Jan 2019

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

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



université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
*Mention : Biologie et Santé*  
**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Quentin SIMON**

préparée au sein de l'unité :  
Immunothérapies et pathologies  
lymphocytaires B.  
EA2216 - INSERM ESPRI – ERI29

# Caractérisation des lymphocytes B régulateurs chez l'Homme

**Thèse soutenue le 13/11/2015**

devant le jury composé de :

**Pr. Régis JOSIEN** : Rapporteur

**Dr. Jean-David BOUAZIZ** : Rapporteur

**Pr. Jacques-Olivier PERS** : Examinateur

**Dr. Sophie HILLION** : Directrice de thèse

« *Science sans conscience n'est que ruine de l'âme* »  
François Rabelais / Pantagruel (1532)

« *Il faut cultiver notre jardin* »  
Voltaire / Candide ou l'optimisme (1759)

# REMERCIEMENTS

La première personne que je souhaite remercier est Sophie Hillion. Cette thèse s'est faite avec une confiance mutuelle, qui m'a permis d'avancer, et de progresser pendant ces trois années. Merci à toi Sophie, pour tes idées et ton soutien, qui sont les fondements de ce travail.

Je dis aussi un grand merci au professeur Jacques-Olivier Pers. D'abord pour avoir été sous sa direction, mais aussi pour l'accompagnement qu'il propose aux étudiants du laboratoire.

Je n'oublie pas Alexandre, avec qui j'ai passé de très bons moments en master et en début de thèse.

Je remercie bien sûr tous mes copains étudiants, post-doctorants et autres : Thomas (Guerrier), Thomas, Patrice, Marjolaine, Marie, Audrey, Kahina, Tina, Pierre, Christelle, Ersie, Lucas, Achouak et Yosra.

Je fais aussi un coucou accompagné d'un merci, à tous les stagiaires avec qui j'ai apprécié travailler, dont Marina, Aloïs et Sally.

J'adresse un grand merci au service de néphrologie de la Cavale Blanche, pour la coopération efficace que nous avons eu. Merci donc au professeur Yannick Le Meur, à Isabelle et à Luca.

Je remercie tout particulièrement, Jean-David Bouaziz ainsi que Régis Josien, pour avoir accepté d'être rapporteurs pour cette thèse.

Je souhaite faire un clin d'œil tout particulier à Delphine, pour avoir ensoleillé nos journées, par le simple fait d'être là.

Je dis merci à Pierre Youinou, pour m'avoir accueilli à mes débuts.

Un gros merci à toutes les techniciennes (Sylvie, Nelly, Annie, Christine), à Christine, et aux secrétaires Geneviève et Simone.

Je remercie aussi Christophe, Yves et Laëtitia pour certains de leurs conseils et avis.

Pour finir, je souhaite embrasser ma famille, pour avoir été là comme toujours, pour parler et soutenir. Merci à vous Maxence, Julien, (et vos chéries), papa et maman, et les petits.

# **SOMMAIRE**

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
<b>I. LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.....</b>	<b>6</b>
<b>A. Phénotype et localisation des lymphocytes B transitionnels.....</b>	<b>6</b>
1) Chez la souris.....	6
2) Chez l'Homme.....	8
<b>B. Les voies de contrôle du développement des lymphocytes B transitionnels.....</b>	<b>11</b>
1) Réponses à la cytokine de survie BAFF .....	11
2) Engagement du récepteur d'antigène.....	12
3) Les voies des Toll-like receptors .....	14
<b>C. Les lymphocytes B transitionnels dans la tolérance immunologique .....</b>	<b>15</b>
1) Autoimmunité.....	15
2) Alloimmunité.....	17
<b>D. Devenir des lymphocytes B transitionnels .....</b>	<b>18</b>
1) Les lymphocytes B matures de la zone marginale .....	19
2) Les lymphocytes B folliculaires .....	19
3) Les centres germinatifs et la réponse antigène spécifique .....	20
4) Lymphocytes B mémoires et cellules sécrétrices d'anticorps.....	21
<b>II. LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS.....</b>	<b>22</b>
<b>A. Phénotypes et fonctions des lymphocytes B régulateurs .....</b>	<b>23</b>
1) Interleukine 10 et immunorégulation.....	23
2) Immunorégulation par d'autres molécules que l'interleukine 10.....	33
<b>B) Les signaux inducteurs d'interleukine 10 dans les lymphocytes B .....</b>	<b>36</b>
1) L'interleukine 10 sous l'influence des signaux innés, du récepteur à l'antigène, de CD40 et des autres cytokines ....	36
2) Les mécanismes moléculaires qui contrôlent la production et l'activité de l'interleukine 10 .....	40
<b>C) Lymphocytes B régulateurs et transitionnels en physiopathologie chez l'Homme .....</b>	<b>44</b>
1) Breg et autoimmunité .....	44
2) Breg et transplantation.....	48
<b>CONCLUSION GENERALE DE L'INTRODUCTION.....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>52</b>
<b>I. LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD24<sup>FORTS</sup> CD38<sup>FORTS</sup> : UNE POPULATION REGULATRICE HETEROGENE ET COMPLEXE.....</b>	<b>53</b>

<b>A) Phénotypes des lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> .....</b>	<b>54</b>
1) Matériel et méthode : analyse bioinformatique avec le programme FLOCK (FLOW Clustering without K).....	54
2) Identification et caractérisation des lymphocytes B transitionnels .....	55
<b>B) Fonctions des lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> .....</b>	<b>64</b>
1) Potentiel de survie des lymphocytes B T1, T2, T3 et CD27 <sup>+</sup> .....	64
2) Engagement du récepteur d'antigène.....	65
3) Réponse innée et engagement du TLR9 .....	67
4) Fonctions régulatrices des sous-populations de lymphocytes B transitionnels.....	69
5) Les lymphocytes B transitionnels T1, T2, T3 et CD27 <sup>+</sup> dans l'autoimmunité.....	76
<b>II. FONCTIONS SUPPRESSIVES DES LYMPHOCYTES B SUR LES CELLULES T .....</b>	<b>79</b>
<b>A) Inhibition de la prolifération T : une fonction régulatrice modulable des lymphocytes B .....</b>	<b>80</b>
1) Matériel et méthode : modèle de culture mixte et extraction d'ARNm .....	80
2) Modulation de l'inhibition de la prolifération T par les lymphocytes B.....	82
<b>B) Les lymphocytes B ont un comportement régulateur adapté aux types de cellules T .....</b>	<b>85</b>
1) Les lymphocytes B inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires et induisent leur mort .....	85
2) Comportement des lymphocytes B face aux lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires, naïfs et CD8 <sup>+</sup> .....	88
3) Un programme transcriptionnel spécifique pour les lymphocytes B suppresseurs ? .....	90
<b>III. LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS EN TRANSPLANTATION RENALE .....</b>	<b>94</b>
<b>A) Lymphocytes B transitionnels et alloimmunisation : étude BHL (B lymphocytes in humoral rejection and alloimmunisation).....</b>	<b>95</b>
1) Distribution des populations de lymphocytes B chez les patients alloimmunisés .....	98
2) Les cellules B des patients alloimmunisés sont-elles inhibitrices ? .....	100
<b>B) Suivi post-greffe des lymphocytes B transitionnels .....</b>	<b>105</b>
1) Les traitements de maintien immunosuppresseurs diminuent la fréquence des lymphocytes B transitionnels .....	107
2) Les patients atteints d'une maladie autoimmune pré-greffe n'ont pas une repopulation significative en cellules B transitionnelles à 12 mois .....	108
3) Les traitements d'induction pourraient conditionner la fréquence des cellules B transitionnelles observée à 12 mois post-greffe .....	109
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>112</b>
<b>I. CARACTERISATION DE POPULATIONS CELLULAIRES B REGULATRICES RARES</b>	<b>113</b>
<b>A) Identification des populations de cellules B .....</b>	<b>113</b>
1) Anomalies de distribution des cellules B transitionnelles.....	114
2) Identification de nouvelles populations de lymphocytes B transitionnels .....	115
<b>B) Du phénotype aux études fonctionnelles .....</b>	<b>117</b>



1) L'engagement du récepteur d'antigène.....	117
2) La réponse immune innée des lymphocytes B transitionnels .....	120
<b>C) Les populations régulatrices de lymphocytes B transitionnels.....</b>	<b>121</b>
1) Complexité moléculaire et biologique de l'interleukine 10 .....	121
2) La production d'interleukine 10 par les cellules B est-elle nécessairement associée avec une régulation de la réponse T ?	123
3) Réflexion sur l'hétérogénéité des lymphocytes B transitionnels et sur leur développement .....	128
<b>II. LES LYMPHOCYTES B SE POLARISENT-ILS EN CELLULES B REGULATRICES ?</b>	<b>131</b>
<b>A) Environnement moléculaire et cellularité : comment fonctionnent les Breg <i>in vitro</i> ? .....</b>	<b>131</b>
1) Les signaux solubles exogènes sont-ils indispensables pour que les cellules B régulent la réponse T ? .....	131
2) Les lymphocytes B sont des cellules particulièrement efficaces pour réguler la réponse T .....	132
3) Comment prolifèrent les cellules T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> en présence des lymphocytes B ? .....	133
<b>B) Les lymphocytes B régulent une cible de façon spécifique .....</b>	<b>134</b>
1) Ciblage cellulaire : l'inhibition de la prolifération est spécifique d'une population de lymphocytes T .....	134
2) L'induction de la mort des lymphocytes T par les cellules B « killers » .....	135
<b>C) Les lymphocytes B s'adaptent à leur cible cellulaire .....</b>	<b>136</b>
1) La prolifération et la survie des cellules B.....	136
2) Les lymphocytes B suppresseurs surexpriment les gènes <i>IL10</i> et <i>PRDM1</i> .....	137
<b>III. LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS ET REGULATEURS EN TRANSPLANTATION RENALE .....</b>	<b>139</b>
<b>A) Le rejet humoral chronique semble influencé par une perturbation du compartiment lymphocytaire B .....</b>	<b>139</b>
<b>B) Le suivi longitudinal est prometteur pour déterminer la cinétique d'apparition des anomalies de distribution .</b>	<b>141</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>143</b>

# LISTE DES FIGURES ET TABLES

<b>FIGURE 1 : PLACE DES CELLULES B TRANSITIONNELLES DANS L'ONTOGENESE B.....</b>	<b>3</b>
<b>FIGURE 2 : LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS PARTAGENT DES FONCTIONS IMMUNOMODULATRICES COMMUNES AVEC D'AUTRES TYPES CELLULAIRES. ....</b>	<b>4</b>
<b>FIGURE 3 : CONTROLE DU DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.. ....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURE 4 : LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS DANS LA TOLERANCE IMMUNOLOGIQUE.. ....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURE 5 : CHRONOLOGIE NON EXHAUSTIVE DES TRAVAUX SUR LA REGULATION DE L'INFLAMMATION PAR LES LYMPHOCYTES B ET PHENOTYPES DES CELLULES B10 MURINES.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURE 6 : CELLULES B PRODUCTRICES D'INTERLEUKINE 10 ET FONCTIONS REGULATRICES ASSOCIEES. ....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURE 7 : MECANISMES REGULATEURS IL-10 INDEPENDANTS DES LYMPHOCYTES B.. ....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURE 8 : DE NOMBREUSES VOIES DE SIGNALISATION, CROISEES OU UNIQUES, PEUVENT INDUIRE L'EXPRESSION DU GENE <i>IL10</i> DANS LES CELLULES B.....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURE 9 : TRANSDUCTION DE SIGNAL ET CONTROLE DE L'EXPRESSION DU GENE <i>IL10</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURE 10 : LES POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B REGULATEURS DANS LES PATHOLOGIES AUTO ET ALLOIMMUNES. ....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURE 11 : PROCEDURE MANUELLE POUR LA SELECTION DE POPULATIONS CELLULAIRES A PARTIR DE DONNEES MULTIPARAMETRIQUES DE CYTOMETRIE EN FLUX. ....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURE 12 : COMPARAISON DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD24<sup>FORTS</sup> CD38<sup>FORTS</sup> ENTRE LES TEMOINS ET LES PATIENTS. ....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURE 13 : REPRESENTATION PAR FLOCK DES CLUSTERS QUI COMPOSENT LA POPULATION DES LB TRANSITIONNELS.....</b>	<b>57</b>

<b>FIGURE 14 : LA POPULATION DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS PEUT ETRE SEPARÉE EN DE MULTIPLES SOUS-POPULATIONS.</b> .....	58
<b>FIGURE 15 : EXPRESSION DE CD27, CD21, CD32, CD10, CD5, DE L'IGM ET DE L'IGD PAR LES 8 CLUSTERS DE CELLULES B CD19<sup>+</sup> CD24<sup>FORTES</sup> CD38<sup>FORTES</sup></b> .....	59
<b>FIGURE 16 : STRATEGIE DE REGROUPEMENT DES CLUSTERS POUR FORMER 4 SOUS-POPULATIONS DISTINCTES.</b> .....	60
<b>FIGURE 17 : EXPRESSION PROTEIQUE PAR LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B CD24<sup>FORTS</sup> CD38<sup>FORTS</sup></b> .....	61
<b>FIGURE 18 : EXPRESSION BASALE DE BCL-2 PAR LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS T1, T2, T3 ET CD27<sup>+</sup></b> .....	64
<b>FIGURE 19 : L'ENGAGEMENT DU BCR INDUIT LA MORT DES LB T1 TANDIS QUE LES LB TR. CD27<sup>+</sup> MEURENT EN CULTURE <i>IN VITRO</i>.</b> .....	65
<b>FIGURE 20 : LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS REPONDENT DIFFEREMMENT A L'ENGAGEMENT DU BCR.</b> .....	66
<b>FIGURE 21 : TRI CELLULAIRE DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS T1, T2, T3 ET CD27<sup>+</sup> PAR CYTOMETRIE EN FLUX.</b> .....	67
<b>FIGURE 22 : LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD27<sup>+</sup> ET T1 INITIENT UNE REPOSE HUMORALE INNEE APRES ENGAGEMENT DU TLR9.</b> .....	68
<b>FIGURE 23 : SECRETION D'IL-10 PAR LES CELLULES B CD24<sup>FORTES</sup> CD38<sup>FORTES</sup> ET CD24<sup>FORTES</sup> CD27<sup>+</sup></b> .....	69
<b>FIGURE 24 : LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD27<sup>+</sup> ET T2 SECRETENT L'INTERLEUKINE 10.</b> .....	70
<b>FIGURE 25 : LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD27<sup>+</sup> SE DETACHENT PAR UNE FORTE EXPRESSION D'INTERLEUKINE 10.</b> .....	71
<b>FIGURE 26 : EXPRESSION RELATIVE DE L'ARNM DU GENE <i>IL10</i> DANS LES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES B CD24<sup>FORTES</sup> CD38<sup>FORTES</sup></b> .....	72

<b>FIGURE 27 : L'ENGAGEMENT DU TLR9 FAVORISE LA SECRETION D'INTERLEUKINE 10 PAR LES LYMPHOCYTES B T3.</b> .....	73
<b>FIGURE 28 : REGULATION DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES INFLAMMATOIRES PAR LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.</b> .....	74
<b>FIGURE 29 : REGULATION DE LA REPOSE PROLIFERATIVE DES LYMPHOCYTES T PAR LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.</b> .....	75
<b>FIGURE 30 : LES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD27<sup>+</sup> SONT AUGMENTES DANS LES MALADIES AUTOIMMUNES, TANDIS QUE LES LB T3 Y SONT SOUS-REPRESENTES.</b> .....	76
<b>FIGURE 31 : PARADIGME SUR LES STADES DE MATURATION ET LES FONCTIONS REGULATRICES DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.</b> .....	77
<b>FIGURE 32 : SCHEMA EXPLICATIF DE LA METHODE EMPLOYEE POUR COMPARER LES PROFILS TRANSCRIPTIONNELS ET LE POTENTIEL SUPPRESSEUR DES LYMPHOCYTES B.</b> .....	81
<b>FIGURE 33 : PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T EN PRESENCE DES LYMPHOCYTES B AVEC OU SANS CPG-ODN.</b> .....	82
<b>FIGURE 34 : INFLUENCE DE LA CELLULARITE SUR LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T.</b> .....	83
<b>FIGURE 35 : LORSQU'ILS SONT CULTIVES CONJOINTEMENT, LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> ET CD8<sup>+</sup> EST SIMILAIREMENT INHIBEE PAR LES LYMPHOCYTES B.</b> .....	84
<b>FIGURE 36 : LES CELLULES B INDUISENT LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> NAÏFS ET CD8<sup>+</sup>, TANDIS QU'ILS INHIBENT CELLE DES CD4<sup>+</sup> MEMOIRES.</b> .....	86
<b>FIGURE 37 : LES LYMPHOCYTES B INDUISENT FORTEMENT LA MORT DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> MEMOIRES PAR NECROSE.</b> .....	87
<b>FIGURE 38 : LES LYMPHOCYTES B PROLIFERENT FORTEMENT LORSQU'ILS SONT EN PRESENCE DE LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> MEMOIRES.</b> .....	88
<b>FIGURE 39 : EN PRESENCE DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> NAÏFS, MEMOIRES ET CD8<sup>+</sup>, LES CELLULES B SURVIVENT DE LA MEME MANIERE.</b> .....	89

<b>FIGURE 40 :</b> ETUDE DE L'EXPRESSION DE <i>NFKB1</i> , <i>BCL6</i> , <i>PRDM1</i> ET <i>IL10</i> PAR LES CELLULES B ISOLEES APRES AVOIR ETE CULTIVEES AVEC DES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> MEMOIRES ET NAÏFS. ....	91
<b>FIGURE 41 :</b> « HEAT MAP » REPRESENTANT L'EXPRESSION DE <i>NFKB1</i> , <i>BCL6</i> , <i>PRDM1</i> ET <i>IL10</i> PAR LES CELLULES B CULTIVEES AVEC LES LYMPHOCYTES T MEMOIRES EN COMPARAISON AUX LYMPHOCYTES T NAÏFS. ....	92
<b>FIGURE 42 :</b> LES LYMPHOCYTES B INHIBENT LES FONCTIONS DE PROLIFERATION ET DE SURVIE DES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> MEMOIRES, POSSIBLEMENT VIA UNE SUREXPRESSION DE <i>PRDM1</i> ET <i>IL10</i> .....	93
<b>FIGURE 43 :</b> LES ETAPES DU REJET HUMORAL CHRONIQUE.....	95
<b>FIGURE 44 :</b> CLASSIFICATION DES PATIENTS DSA <sup>+</sup> DE L'ETUDE BHL, EN FONCTION DES OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES FAITES SUR LES BIOPSIES DE REIN. ....	97
<b>FIGURE 45 :</b> DISTRIBUTION DES LYMPHOCYTES B DANS LES GROUPES DE PATIENTS DE L'ETUDE BHL. ..	98
<b>FIGURE 46 :</b> LES PATIENTS ALLOIMMUNISES ONT UN POURCENTAGE DE LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS INFERIEUR A CELUI DES PATIENTS STABLES. ....	99
<b>FIGURE 47 :</b> REPRESENTATION DES TROIS EFFETS POSSIBLES DES LYMPHOCYTES B SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES T DE PATIENTS ALLOIMMUNISES.....	100
<b>FIGURE 48 :</b> REPRESENTATION DE L'IMPACT DES CELLULES B DE 33 PATIENTS ALLOIMMUNISES SUR LA PROLIFERATION DE LEURS LYMPHOCYTES T.....	102
<b>FIGURE 49 :</b> CORRELATION ENTRE LE POURCENTAGE DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS ET L'INHIBITION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES T DES PATIENTS ALLOIMMUNISES. ....	103
<b>FIGURE 50 :</b> LES CELLULES B DES PATIENTS ATTEINTS D'UN REJET HUMORAL CHRONIQUE N'INHIBENT PAS LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T.....	104
<b>FIGURE 51 :</b> POURCENTAGES A T0, M3 ET M12 DES LYMPHOCYTES B TOTAUX ET TRANSITIONNELS DANS LES 48 PATIENTS GREFFES.....	107
<b>FIGURE 52 :</b> POURCENTAGES DE LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS A T0, M3 ET M12 DANS LES PATIENTS AYANT UNE MALADIE AUTOIMMUNE CAUSE DE LA DYSFONCTION RENALE.....	108

<b>FIGURE 53 : POURCENTAGE DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS A T0, M3 ET M12, EN FONCTION DU TRAITEMENT PAR ANTICORPS ANTI-IL-2R OU PAR THYMOGLOBULINES.</b> .....	109
<b>FIGURE 54 : IMPLICATION DES LYMPHOCYTES B DANS L'HISTOIRE NATURELLE DU REJET HUMORALE CHRONIQUE.</b> .....	110
<b>FIGURE 55 : IMPACT D'UNE SECONDE INFECTION SUR LA CAPACITE DU SYSTEME A LIMITER L'INFLAMMATION.</b> .....	126
<b>FIGURE 56 : CHEZ L'HOMME, LES STADES DE MATURATION DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS NE SONT PAS ENCORE CLAIREMENT DEFINIS.</b> .....	128
<b>FIGURE 57 : ALLER VERS L'INFINIMENT PETIT POUR DECOUVRIR LA PARTIE IMMERGEE DE L'ICEBERG ET DETERMINER L'HETEROGENEITE CELLULAIRE DES LB TR. CD24<sup>FORTS</sup> CD38<sup>FORTS</sup>.</b> .....	130
<b>FIGURE 58 : REPRESENTATION DE LA PLASTICITE DES LYMPHOCYTES B AU TRAVERS DES FONCTIONS REGULATRICES OU EFFECTRICES QU'ELLES EXERCENT SUR LES CELLULES T CD4<sup>+</sup> MEMOIRES ET NAÏVES.</b> .....	137
<b>TABLE 1 : PHENOTYPE ET LOCALISATION DES LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS.</b> .....	7
<b>TABLE 2 : LISTE DES AC COUPLES A DES FLUOROCHROMES UTILISES POUR L'ANALYSE 10-COULEURS DE CYTOMETRIE EN FLUX.</b> .....	55
<b>TABLE 3 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PHENOTYPES OBSERVES POUR LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS CD24<sup>FORTS</sup> CD38<sup>FORTS</sup>.</b> .....	63
<b>TABLE 4 : CARACTERISTIQUES DES PATIENTS DE L'ETUDE BHL.</b> .....	96
<b>TABLE 5 : CRITERES HISTOLOGIQUES ET SCORES DES LESIONS, DEFINIS PAR LA CLASSIFICATION DE BANFF.</b> .....	97
<b>TABLE 6 : NEPHROPATHIES ET TRAITEMENTS D'INDUCTION POUR LES PATIENTS TRANSPLANTES RENAUX DE L'ETUDE LONGITUDINALE.</b> .....	106

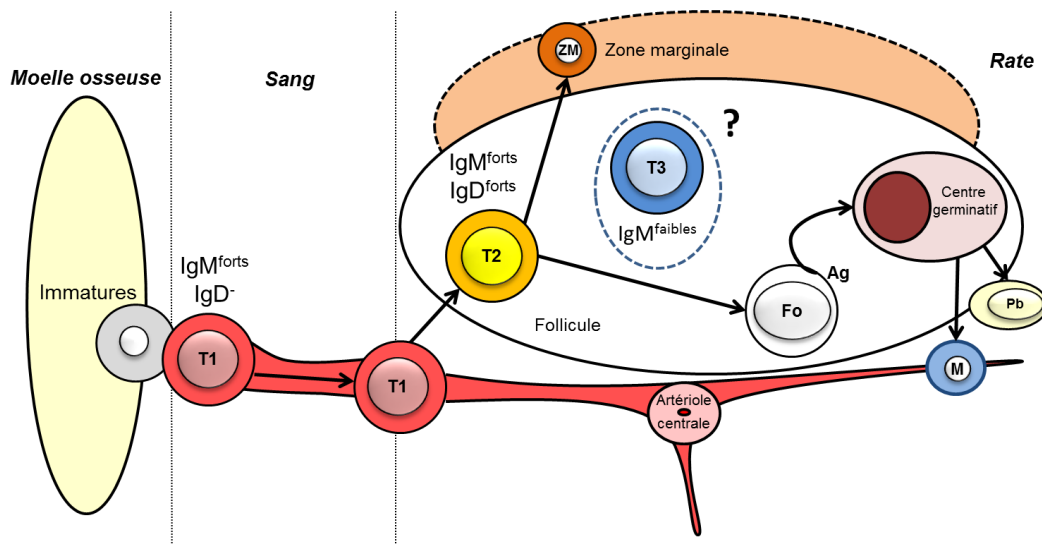
# LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette	Lyn : Lck/Yes novel tyrosine kinase
Ac : anticorps	MAP : Mitogen activated protein
Ag : antigène	MDDCs : Monocyte-derived dendritic cells
AID : Activation induced cytidine deaminase	miR : micro-ARNs
ANCA : Ac anti-cytoplasme des polynucléaires	MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein
β2m : beta-2 microglobuline	MTG : Mitotracker®
B10 : IL-10 <sup>+</sup> B cell	MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88
BAFF : B-cell activating factor belonging to the TNF family	NFAT : Nuclear factor of activated T cells
Bcl-6 : B-cell lymphoma 6 protein	NFκB : Nuclear factor kappa B
BCR : B cell receptor	NK : Natural killer
BHL : B lymphocytes in humoral rejection and alloimmunisation	NOD : Non-obese diabetic
BLIMP-1 : B lymphocyte induced maturation protein-1	NP : Nitrophenylacetyl hapten
Breg : Regulatory B cell	PAMPs : Pathogen associated molecular patterns
Btk : Bruton's tyrosine kinase	PBMCs : Peripheral blood mononuclear cells
cABMR : chronic antibody mediated rejection	PDCD4 : Programmed cell death protein 4
CD : Cluster of differentiation	PD-L1 : Programmed cell death 1 ligand 1
CECs : Cellules endothéliales cardiaques	PI3K : phosphoinositol 3-kinase
cg : glomérulopathie d'allogreffe	PIP3 : Phosphatidylinositol triphosphate
cGVHD : Maladie chronique du greffon contre l'hôte	PKRD : Polykystose rénale autosomique dominante
CPA : Cellule présentatrice d'Ag	PLC : progéniteurs lymphoïdes communs
CpG-ODN : CpG-oligodeoxynucleotide	PLCγ2 : Phospholipase C gamma 2
CRF2 : Récepteurs cytokiniques de classe II	PR : Polyarthrite rhumatoïde
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	pSS : primary Sjögren syndrom
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor 4	proB10 : Progéniteurs de B10
DC : Dendritic cell	PTC : Capillarite péritubulaire
DIO : Diet-induced obese	RA : Rheumatoid arthritis
DSA : Donor specific antibodies	RAG : Recombination activating gene
EAE : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale	RE : Reticulum endoplasmique
EBV : Epstein-Barr virus	RISC : RNA-induced silencing complex
eIF4 : eukaryotic translation initiation factor 4	SAC : Staphylococcus aureus Cowan 1
Erk : Extracellular signal regulated kinase	SEP : Sclérose en plaque
FLOCK : FLOW Clustering without K	SGS : Syndrome de Gougerot Sjögren
Fo : Folliculaire	SHU : Syndrome hémolytique et urémique
FS : Forward scatter	SLE : Systemic lupus erythematosus
g : glomérulite	SPA : Staphylococcal protein
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	SPADE : Spanning-tree progression analysis of density-normalized events
GAS : IFN-γ activation sequence	ST : Patients stables
GB : maladie de Graves Basedow	STAT : Signal transducers and activators of transcription
GNMP : Glomérulopathie membranoproliférative	STIM : Stromal interaction molecule
GrB : Granzyme B	Syk : Spleen tyrosine kinase
GRR : IFN-γ response region	T2-MZP : T2-précurseur de la ZM
HAS : Heat stable antigen	TACI : Transmembrane activator and CAML interactor
HC : Healthy controls	TCR : T cell receptor
HEL : Hen egg lysozyme	Tfh : Lymphocyte T folliculaire helper
HIV : Human immunodeficiency virus	TGF-β : Transforming growth factor-beta
HSF : Hyalinose segmentaire et focale	TIM-1 : T cell Ig domain and mucin domain protein-1
IDO : Indoléamine 2,3 dioxygénase	TLR : Toll-like receptor
IFN : Interferon	TNF : Tumor necrosis factor
Ig : Immunoglobuline	Treg : Regulatory T cell
IL : Interleukine	Tr. : Transitionnels
IMF : Intensité moyenne de fluorescence	Tyk : Tyrosine kinase
Infra : Groupe infraclinique	ZM : Zone marginale
Jak : Janus kinase	
KO : Knockout	
LAP : Peptide de latence	
LB : lymphocyte B	
LLC : Leucémie lymphoïde chronique	
LPS : Lipopolysaccharides	
LT : Lymphocyte T	

# **INTRODUCTION**



Le développement des lymphocytes B (LB) comprend de nombreux stades de maturation, durant lesquels les LB présentent des fonctions caractéristiques. Les cellules B immatures de la moelle osseuse expriment un récepteur à l'antigène (BCR) fonctionnel, par lequel elles reconnaissent des antigènes (Ag) qui peuvent être endogènes (autoAg). C'est là qu'intervient la tolérance immunologique, qui repose sur des mécanismes de contrôle de l'autoréactivité des cellules B. Parmi eux sont distingués l'édition du récepteur (remplacement d'un BCR autoréactif), la délétion clonale (élimination des clones autoréactifs) et l'anergie (état de silence fonctionnel des cellules B autoréactives ayant un BCR de faible affinité pour l'autoAg).

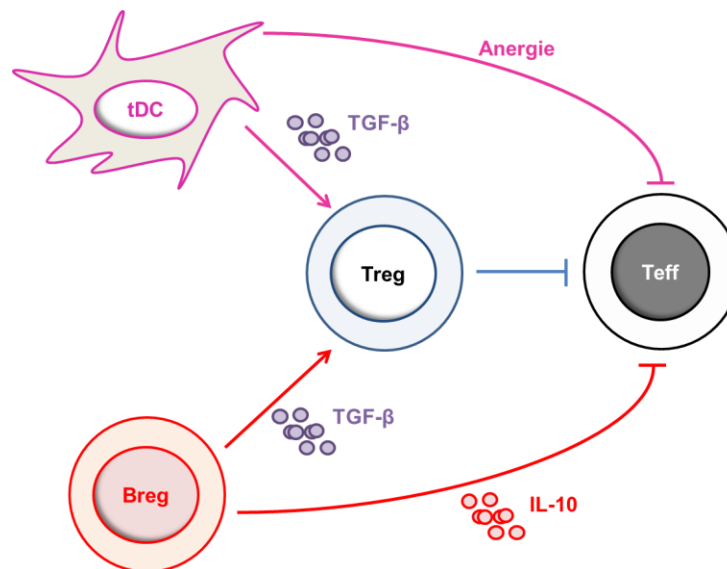


**Figure 1 : Place des cellules B transitionnelles dans l'ontogénèse B.** Les LB T1 issus des cellules B immatures de la moelle osseuse transitent vers la rate où ils se différencient en LB T2, qui sont les précurseurs du pool B matures. Les LB T3 représentent une population particulière dont le stade de maturation ne peut être clairement établi.

Les LB immatures de la moelle osseuse se différencient en cellules B transitionnelles de type 1 (LB T1), localisées chez la souris au niveau de la moelle osseuse, du sang, et de la rate. Ces cellules B qui ont un BCR principalement d'isotype IgM sont soumises à la délétion clonale du fait de leur prédisposition à l'autoréactivité. Les LB T1 migrent vers la rate et s'y différencient en LB T2 qui expriment un BCR au double-isotype IgD et IgM. Ces cellules B T2 sont à l'initiation du répertoire des cellules B matures folliculaire (Fo) (FIG. 1). Ces dernières présentent l'Ag aux cellules T avant de débiter la formation des centres germinatifs. Au sein des centres

germinatifs, les LB se multiplient et modifient l'affinité et potentiellement l'isotype de leur BCR, afin d'engager une réponse mémoire ou humorale spécifique de l'Ag reconnu au niveau folliculaire. Notons que chez la souris, un troisième type de LB transitionnel (LB Tr.) a été décrit au niveau de la rate. Ces cellules nommées LB T3 ont été présentées comme anergiques et expriment faiblement l'IgM à la membrane.

Les cellules B transitionnelles représentent un stade central dans le développement des LB, puisqu'elles font le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et celles matures présentes dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette population est hétérogène et est composée des LB T1, T2 et T3. Les LB Tr. sont des acteurs essentiels pour le maintien de la tolérance périphérique. Cette tolérance est également soutenue par plusieurs autres types cellulaires du système immunitaire, ayant une activité inhibitrice de la réponse immunitaire des cellules T. Par exemple, les cellules dendritiques (DC) tolérogènes peuvent orienter les LT effecteurs (Teff) vers un état anergique ou induire des LT régulateurs (Treg) au travers de la production de molécules immunomodulatrices comme TGF- $\beta$  (Tumor growth factor- $\beta$ ) (Maldonado and von Andrian 2010). Quant à eux, les Treg sont capables d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires provenant des Teff (Takakubo and Kontinen 2012).



**Figure 2 : Les lymphocytes B régulateurs partagent des fonctions immunomodulatrices communes avec d'autres types cellulaires.**

Les LB ont également été décrits comme ayant des fonctions régulatrices tolérogènes. En opposition aux Treg caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3, les LB régulateurs (Breg) n'appartiennent pas à une population unique de cellules B. Cependant, il a été décrit que les LB Tr. sont particulièrement efficaces pour supprimer certaines fonctions effectrices des cellules T, notamment au travers de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (interleukine-10) (Rosser and Mauri 2015) (FIG. 2).

Chez l'Homme, la population des LB Tr. est caractérisée par une forte expression des marqueurs CD24 et CD38 à la membrane. Cependant, les données collectées sur les fonctions et les phénotypes des cellules B transitionnelles humaines sont encore restreintes et nécessitent d'être complétées par de nouvelles études. Dans l'introduction qui va suivre, nous allons décrire les étapes de maturation des populations de cellules B transitionnelles. Nous présenterons également les éléments qui contrôlent le développement de ces cellules et qui font que les LB Tr. sont essentiels au maintien de la tolérance vis-à-vis des Ag endogènes. Les LB Tr. sont aussi décrits comme des cellules ayant des propriétés immunorégulatrices. Dans une seconde partie, nous traiterons du phénotype et des fonctions des Breg murins et humains, avant de nous concentrer sur l'IL-10. Nous terminerons d'introduire les cellules B régulatrices et transitionnelles en traitant de leur distribution en transplantation rénale et de leur probable implication dans la physiopathologie des maladies autoimmunes.

Notre travail a eu pour objectif de caractériser les phénotypes et les fonctions (notamment régulatrices) des LB Tr., afin de mieux comprendre le développement des cellules B chez l'Homme. Puis, nous avons étudié les fonctions suppressives des LB sur les cellules T. Enfin, dans une étude clinique, nous avons souhaité évaluer quels pourraient-être les mécanismes dépendants des LB à l'origine du rejet humoral chronique.

## **I. Les lymphocytes B transitionnels**

Les LB transitionnels (Tr.) ont d'abord été décrits chez la souris au niveau de la rate, tandis que chez l'Homme, ils sont décrits en périphérie. Cependant, des similitudes phénotypiques et fonctionnelles ont été observées entre les LB Tr. murins et humains. Ainsi, faire le parallèle entre les LB Tr. spléniques murins et ceux circulants humains n'est pas dénué de sens. Pour définir les cellules B transitionnelles, nous allons d'abord décrire les phénotypes qui caractérisent les différentes sous-populations de LB Tr. (humaines et murines), et qui expliquent l'hétérogénéité cellulaire de cette population centrale dans le développement des LB.

### **A. Phénotype et localisation des lymphocytes B transitionnels**

#### **1) Chez la souris**

##### *Les stades transitionnels de type 1 et 2*

Les premières études chez la souris présentent les LB Tr. comme des cellules immatures précurseurs des LB matures. L'ensemble des LB Tr. a d'abord été caractérisé par une forte expression de l'IgM à la membrane. D'autres marqueurs additionnels ont permis une description plus précise. Ainsi, les LB Tr. expriment un plus faible niveau de B220 (isoforme de CD45) que les LB matures. De plus, l'expression de CD24 (anciennement HSA : Heat Stable Antigen) est particulièrement élevée parmi les LB Tr. immatures ([Carsetti, Kohler et al. 1995](#)) (Table 1)

**Table 1 : Phénotype et localisation des lymphocytes B transitionnels.**

Types de LB transitionnels	Phénotype		Localisation		Références	
	Souris	Homme	Souris	Homme	Souris	Homme
Totaux	B220 <sup>faibles</sup> IgM <sup>forts</sup> CD24 <sup>forts</sup> AA4 <sup>+</sup>	CD24 <sup>forts</sup> CD38 <sup>forts</sup> ABCB1 <sup>-</sup>	Moelle osseuse Rate	Moelle osseuse Sang	Carsetti (1995) Allman (2001)	Carsetti (2004) Wirhth (2005) Cuss (2006)
T1	IgM <sup>forts</sup> IgD <sup>-</sup> CD21 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup>	IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+++</sup> CD24 <sup>+++</sup> CD23 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup> CD21 <sup>faibles</sup>	Moelle osseuse Rate Sang	Moelle osseuse Sang de cordon Sang	Loder (1999)	Sims (2005) Suryani (2010)
T2	IgM <sup>forts</sup> IgD <sup>forts</sup> CD21 <sup>forts</sup> CD23 <sup>forts</sup>	CD10 <sup>+</sup> CD21 <sup>forts</sup> CD38 <sup>++</sup> CD24 <sup>++</sup>	Rate	Sang Rate	Loder (1999)	Palanichamy (2009) Suryani (2010)
T3	IgM <sup>faibles</sup> CD23 <sup>+</sup> AA4 <sup>+</sup>	IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> ABCB1 <sup>-</sup>	Rate	Sang Rate	Allman (2001)	Palanichamy (2009)

Par la suite, les LB Tr. ont été séparés en deux populations sur la base de l'expression de l'IgD, de CD21 et accessoirement de CD23. D'abord, les LB transitionnels de type 1 (T1) ont été caractérisés par une absence d'expression de l'IgD, de CD21 et de CD23. A l'inverse, les LB T2 expriment fortement les IgM et IgD, CD21, et sont positifs pour CD23 (Loder, Mutschler et al. 1999). Enfin, la molécule AA4 (CD93), protéine membranaire de type 1, a également été utilisée pour la détection des LB Tr. parmi les cellules ayant des immunoglobulines à la membrane. Son expression est limitée aux cellules B de la moelle osseuse, et à celles immatures transitionnelles de la rate (Allman, Lindsley et al. 2001). En bilan, les expressions de l'IgM, de CD24 et de l'AA4 sont identiques entre les LB T1 et T2. Ces deux populations peuvent être séparées par l'expression différentielle qu'elles ont pour l'IgD, CD21 et CD23.

Tout comme le phénotype, la localisation des cellules B est liée à leur stade de développement. Les LB T1 sont localisés dans la moelle osseuse d'où ils migrent vers la circulation sanguine, ainsi que dans le manchon périartériolaire de la rate. Quant à eux, les T2 sont retrouvés dans les follicules primaires de la rate (Loder, Mutschler et al. 1999; Chung, Silverman et al. 2003) (Table 1).

### *Les lymphocytes B transitionnels de type 3*

L'identification des LB T3 a suivi celle des LB T1 et T2. Ils se différencient des autres LB Tr. par leur faible expression de l'IgM à la membrane. Tout comme les LB T1 et T2, les LB T3 sont AA4<sup>+</sup>, mais contrairement au LB T1, ils expriment CD23 (Allman, Lindsley et al. 2001). Chez la souris, les études portant sur les LB T3 ont été restreintes à la rate.

## **2) Chez l'Homme**

Initialement, la plupart des connaissances sur le développement des cellules B ont été acquises suite à des études réalisées chez la souris. Mais était-il faisable de transposer les étapes de maturation qui le composent à l'Homme ? Afin de répondre à cette question, les premières caractérisations phénotypiques sur les LB humains circulants du sang se sont reposées sur l'expression de marqueurs communs aux deux espèces.

### *Les lymphocytes B transitionnels de type 1 et 2*

Les LB Tr. étant décrits comme des cellules immatures chez la souris, la première approche fut de trouver des marqueurs d'immaturité B chez l'Homme. Judicieusement, la moelle osseuse et le sang de cordon ont été les premiers compartiments choisis pour l'identification de ces marqueurs. Ainsi, les LB CD21 et CD23 négatifs ont été décrits comme CD10<sup>+</sup>, CD38<sup>forts</sup> et CD24<sup>forts</sup>. Puis, dans le sang périphérique les cellules CD38<sup>fortes</sup> et IgD positives ont montré des caractéristiques phénotypiques proches des LB T1 murins, avec une faible expression des CD21 et CD23, et une plus forte expression de l'IgM et de CD24 que les cellules B matures (Sims, Ettinger et al. 2005). Par la suite, d'autres expériences ont visé à déterminer de nouveaux marqueurs pour distinguer les cellules B Tr. des autres populations du sang. Dans cette optique, l'étude de l'activité du transporteur d'ATP ABCB1 de la famille ABC (ATP-binding cassette), a montré son intérêt. En effet, parmi les LB CD27 négatifs, il a été observé que les LB Tr. ont une absence d'activité pour l'ABCB1, contrairement aux LB matures (Wirhth and Lanzavecchia 2005). Cependant, l'analyse de l'activité de l'ABCB1 ne permet pas de séparer les LB T1 des LB T2.

Dans le sang périphérique, l'expression de CD24 et de CD38 est une autre combinaison efficace pour identifier les LB Tr. Ces derniers sont considérés comme CD24<sup>forts</sup> et CD38<sup>forts</sup> (Carsetti, Rosado et al. 2004). Cette distinction phénotypique a été appliquée à d'autres types de tissus. Des cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> ont également été détectées dans le sang de cordon, la moelle osseuse, la rate, les amygdales et dans les ganglions lymphatiques. En outre, les LB Tr. définis selon la forte expression de CD24 et de CD38 semblent représenter un des premiers stades de différenciation lymphocytaire B en périphérie. En effet, suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques chez des patients immunodéficients, la reconstitution du compartiment lymphocytaire B débute par les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup>. Ces-dernières sont ensuite progressivement remplacées par des cellules B mémoires au cours de la repopulation B (Cuss, Avery et al. 2006). Ces observations constituent un argument fort pour associer le phénotype CD19<sup>+</sup> CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> aux LB Tr. périphériques. Tout comme chez la souris, lorsque l'on souhaite étudier les populations de LB Tr. dans la rate humaine, il est admis d'utiliser des marqueurs tels que l'IgM, CD21, CD24 et CD23 (Palanichamy, Barnard et al. 2009; Benitez, Weldon et al. 2014).

Chez l'Homme, la première distinction LB T1/T2 dans le sang périphérique s'est faite sur la base d'une expression différentielle de CD24 et de CD38. Ainsi, bien que l'ensemble des LB Tr. expriment fortement ces deux marqueurs, il a été défini qu'en comparaison aux LB T2, les LB T1 ont à leur surface des niveaux supérieurs de CD24 et de CD38 (Palanichamy, Barnard et al. 2009). La seconde distinction LB T1/T2 s'est faite en utilisant le marqueur d'immaturité CD10 et le CD21. Ce choix alternatif à l'utilisation de CD24 et de CD38 s'est justifié par le fait que les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> sont majoritairement CD10 positifs. Ainsi, les cellules B CD27<sup>-</sup> CD10<sup>+</sup> ont été considérées comme immatures transitionnelles. Parmi elles ont été mises en évidence des cellules CD21<sup>faibles</sup> proches des LB T1, et des LB Tr. CD21<sup>forts</sup> proches des LB T2. Il a été également remarqué que le développement des LB Tr. CD21<sup>faibles</sup> précède celui des Tr. CD21<sup>forts</sup> chez les patients immunodéficients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Suryani, Fulcher et al. 2010).

### *Les lymphocytes B transitionnels de type 3*

La révélation d'une troisième population de LB Tr. chez l'Homme s'est faite par des études phénotypiques sur le sang de patients déplétés en LB suite à un traitement avec un Ac monoclonal anti-CD20 (rituximab). Au cours de la reconstitution du compartiment lymphocytaire B, il a été observé en périphérie une diminution globale de l'expression des marqueurs CD10, CD24 et CD38 à la surface des LB, suggérant un passage progressif d'un stade immature vers mature, allant des LB T1 vers les LB T2, jusqu'au LB matures. Une nouvelle population de LB matures naïfs CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> a alors été identifiée. Celle-ci ne présentait pas d'activité pour le transporteur ABCB1, contrairement aux cellules B matures déjà décrites. Alors, il a été supposé que cette nouvelle population de LB matures naïfs correspondrait à un stade tardif de développement des LB Tr., nommé T3. Des analyses sur le phénotype des LB T3 ont également été réalisées dans le sang de cordon et la rate ([Palanichamy, Barnard et al. 2009](#)).

Enfin, il a été proposé un schéma, dans lequel le stade des LB T2 CD21<sup>fortes</sup> CD10<sup>+</sup> CD5<sup>fortes</sup> précéderait celui des cellules B pre-naïves CD21<sup>fortes</sup> CD10<sup>-</sup> CD5<sup>faibles</sup> (assimilables à des LB T3), desquelles sont issues les cellules B matures conventionnelles ([Suryani, Fulcher et al. 2010](#)).

Les études réalisées chez la souris ont considéré les LB T3 comme des cellules immatures. Chez l'Homme en revanche, les LB T3 ont été nommés comme des LB transitionnels tardifs, exhibant un phénotype intermédiaire entre les stades LB T2 et mature. Cependant, aucune expérimentation fonctionnelle ne permet d'affirmer que les LB T3 dérivent des LB T2. La classification, la localisation et la reconnaissance des LB T3 chez l'Homme ne sont pas claires et nécessitent des investigations supplémentaires (Table 1).

Les différents phénotypes décrits précédemment sont caractéristiques de stades de maturation. Le passage d'un stade de maturation à un autre repose sur la capacité des cellules à répondre à des signaux antigéniques ou de survie. Dans le chapitre suivant, nous allons décrire les points de contrôle, qui régulent le développement des cellules B transitionnelles.



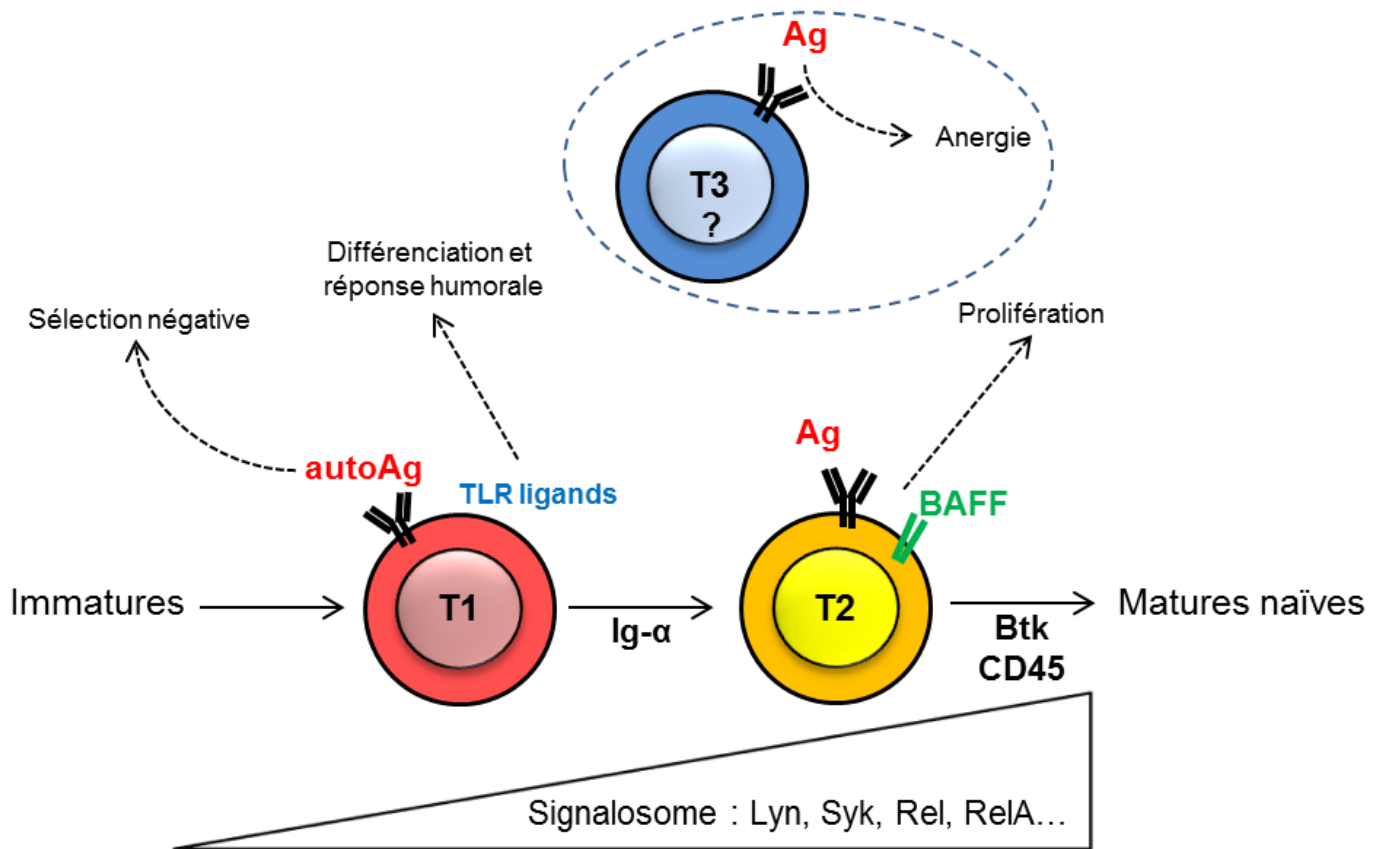
## **B. Les voies de contrôle du développement des lymphocytes B transitionnels**

La forte expression de l'IgM à la membrane des LB Tr., la détection du récepteur de mort Fas à leur surface, ainsi que leur faible expression de Bcl-2 sont des caractéristiques compatibles avec le fait que les LB Tr. sont des cellules sensibles à la sélection négative, tout comme le sont les LB immatures de la moelle osseuse (Carsetti, Kohler et al. 1995).

### **1) Réponses à la cytokine de survie BAFF**

Les LB T1 ont une plus faible expression de Bcl-2 et du BAFF (B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) family) récepteur (BR3) que les LB T2. Les expériences sur le potentiel de survie des LB Tr. ont montré qu'une stimulation unique par BAFF ne permet pas la survie des LB T1, mais favorise celle des LB T2. En lien avec cet effet, il a été observé une augmentation importante des LB T2 dans un modèle murin BAFF transgénique (Batten, Groom et al. 2000; Sims, Ettinger et al. 2005). Egalement, une population de LB T2 a été caractérisée par une expression intermédiaire du CD21. Elle est issue des LB T1 et a été montrée comme étant particulièrement sensible à la cytokine BAFF, qui participe à sa prolifération *in vivo* (Meyer-Bahlburg, Andrews et al. 2008). De plus, il a été démontré *in vitro* que BAFF augmente la différenciation des LB immatures en LB Tr. Enfin, l'expression de Bcl-2 serait capable de suppléer à l'absence de BAFF pour la génération de LB Tr. de type T1 (Rowland, Leahy et al. 2010).

Les voies engagées par la liaison de BAFF semblent à elles seules pouvoir induire une réponse fonctionnelle des LB Tr., mais cette réponse peut aussi être combinée avec l'engagement du BCR. En effet, les stimulations conjointes du BCR et des récepteurs de BAFF favorisent la différenciation des LB T2 en LB matures *in vitro* (Batten, Groom et al. 2000) (FIG. 3).



**FIGURE 3 : Contrôle du développement des lymphocytes B transitionnels.** Les LB T1 immatures sont sujets à la sélection négative suite à la reconnaissance d'un autoAg et peuvent se différencier en cellules sécrétrices d'Ac suite à l'activation des TLRs. La queue cytoplasmique Ig- $\alpha$  est nécessaire à leur différenciation en LB T2. Ces derniers sont sensibles à BAFF pour leur survie et leur prolifération, en association avec l'engagement du BCR. Leur différenciation en cellules B matures est sous le contrôle de Btk, de CD45 et de l'efficacité du signalosome composé des kinases Lyn et Syk. Le stade de développement des LB T3 ne peut être localisé, seule sa capacité d'entrer en anergie est réellement décrite chez la souris.

## 2) Engagement du récepteur d'antigène

Les cellules B immatures sont soumises à la sélection négative lors de la reconnaissance d'autoAg, mais sont également sous l'influence d'une sélection positive en présence d'Ag étrangers, qui repose sur l'activité des kinases de la voie du BCR ainsi que sur les co-récepteurs de ce dernier (Goodnow, Brink et al. 1991; Cyster, Healy et al. 1996; Cornall, Cyster et al. 1998).

L'une des kinases sollicitée pour la transduction de signaux de la voie BCR est Lyn. Cette tyrosine kinase de la famille Src peut exercer un rôle inhibiteur sur la réponse antigénique. Par exemple, il a été démontré que les LB *lyn*<sup>-/-</sup> ont une prolifération plus importante que les LB sauvages suite à une stimulation de leur IgM de membrane. Cette réponse est accompagnée d'un engagement accru de la voie MAP kinase (Chan, Meng et al. 1997). D'autres kinases sont également à considérer dans le développement des LB. Par exemple, il a été démontré qu'une mutation du gène *syk* dans les LB immatures issus de la moelle osseuse inhibe leur différenciation en LB matures, malgré une migration possible vers la rate (Turner, Gulbranson-Judge et al. 1997). Enfin, la maturation des LB est aussi sous le joug de l'expression des facteurs de transcription Rel et RelA, acteurs essentiels de la survie des cellules B en périphérie au travers de la surexpression de Bcl-2 (Grossmann, O'Reilly et al. 2000) (FIG. 3).

Par la suite, des études plus ciblées sur les LB Tr. ont démontré qu'après une stimulation de leur BCR, les LB T1 semblent être particulièrement sensibles à la sélection négative. En effet, ils ont une faible capacité à entrer dans le cycle cellulaire, une baisse drastique de leur survie et ne prolifèrent pas (Petro, Gerstein et al. 2002; Sims, Ettinger et al. 2005). A l'inverse, les LB T2 prolifèrent et ont la particularité de se différencier en cellules matures suite à l'engagement du récepteur à l'Ag. Ces manifestations fonctionnelles sont le résultat de l'activité de sérines/thréonine kinases telles que ERK, p38 et Akt (Petro, Gerstein et al. 2002; Su and Rawlings 2002). La tyrosine kinase Btk est également essentielle pour le développement des cellules B. En effet, une délétion au niveau du gène codant pour Btk est à l'origine d'une déficience lymphocytaire B liée à l'X, appelée agammaglobulinémie (Vetrie, Vorechovsky et al. 1993). Plus précisément, des modèles murins ont permis d'observer que la différenciation des LB T2 en LB matures nécessitait la protéine Btk, mais également CD45. Quant au passage des LB T1 vers T2, il est entre autre dépendant de la présence de la queue cytoplasmique de l'Ig- $\alpha$  (Loder, Mutschler et al. 1999; Petro, Gerstein et al. 2002).

Les LB T2 sont considérés comme les initiateurs du répertoire BCR mature et représentent une étape de sélection dans le développement des LB périphériques. Ainsi, la stabilité du signalosome du BCR est croissante des LB T1 jusqu'au LB matures en passant par les LB T2 (FIG. 3).

Les voies de signalisation du BCR sont également importantes pour l'émergence des LB T3. En effet, dans une souris déficiente pour la kinase Btk, le nombre de LB T3 est drastiquement diminué (Allman, Lindsley et al. 2001). A l'inverse des LB T1 et T2, l'engagement du BCR des LB T3 n'entraîne qu'une faible mobilisation du calcium, et démontre un défaut global de phosphorylation protéique. Suite à une stimulation du BCR, et en présence de BAFF, les LB T3 ne se différencient pas en cellules B matures contrairement aux LB T2 (Teague, Pan et al. 2007; Liubchenko, Appleberry et al. 2012). De plus, l'incapacité de répondre à une activation antigénique définit l'état anergique d'une cellule B et peut être dans certains cas associée à une faible expression de l'IgM à la membrane (Quach, Manjarrez-Orduno et al. 2011). Initialement, il a été montré que les cellules B autoréactives tolérantes expriment peu l'IgM (Goodnow, Crosbie et al. 1988), ce qui est une caractéristique phénotypique des LB T3. Ces particularités fonctionnelles font que les LB T3 de la souris ont été considérés comme des cellules anergiques. Enfin, notons que dans la rate, le turnover des LB T3 est moins important que celui des LB T1 et LB T2, mais il l'est plus que celui des LB matures (Allman, Lindsley et al. 2001).

### 3) Les voies des Toll-like récepteurs

L'activité des kinases de la voie BCR et de ses co-récepteurs ainsi que la liaison de BAFF sont des paramètres indispensables qui contrôlent le développement des LB Tr., mais les signaux de l'immunité innée influencent également leur maturation.

En comparaison aux cellules B matures et mémoires, les LB Tr. expriment plus fortement le Toll-Like receptor 9 (TLR9). Des expériences *in vitro* ont montré qu'en réponse aux motifs CpG-ODN bactériens, ligands du TLR9, les LB Tr. du sang sont capables de se différencier en plasmablastes. Les LB Tr. issus du sang de cordon peuvent également se différencier et ont été observés comme étant des cellules sécrétrices d'IgM anti-polysaccharides, mais également d'IgG, en association avec une induction de l'expression de l'AID et du gène *prdm1* qui code pour BLIMP1 (B lymphocyte induced maturation protein-1). En parallèle de cette réponse humorale, une partie des LB Tr. prolifèrent suite à une stimulation de leur TLR9 (Capolunghi, Cascioli et al. 2008).

Le TLR7, qui lie les ARNs simple brin, est un autre récepteur de l'immunité innée exprimé par les cellules B. Dans un modèle murin transgénique, il a été montré qu'une surexpression du TLR7 augmente la prolifération des LB T1 au niveau de la pulpe rouge de la rate, et ce sous l'influence d'un engagement du BCR *via* des autoAg. De plus, ces LB T1 mutants ont été décrits comme producteurs d'IgM mais aussi d'IgG, accompagnés de fortes intensités d'expression de l'AID et de T-bet (Giltiay, Chappell et al. 2013).

L'engagement du BCR, des TLRs et de BR3 participent au développement des cellules B et ont un rôle prépondérant sur les cellules B autoréactives, et par conséquent dans la tolérance immunologique (FIG. 3). Nous allons maintenant souligner l'importance des LB Tr. pour le maintien de cette tolérance, en traitant des anomalies de distribution observées dans les pathologies auto et alloimmunes.

## **C. Les lymphocytes B transitionnels dans la tolérance immunologique**

Un système immunitaire fonctionnel doit maintenir sa capacité de reconnaissance d'une grande diversité d'Ag exogènes tout en minimisant l'autoréactivité.

En fonction du stade de maturation des LB et des signaux apportés par d'autres cellules comme les lymphocytes T (LT) helper, la présentation antigénique peut aboutir à l'élimination des cellules B autoréactives ou bien à la prolifération et à la différenciation de LB spécifiques d'Ag étrangers. Il est estimé que 55 à 75% des cellules B néo-formées sont autoréactives (Wardemann, Yurasov et al. 2003). Les mécanismes de contrôle sont particulièrement influents sur ces cellules B immatures, ce qui place les LB Tr. à un stade critique, à la fois dans le maintien de la tolérance immunologique et dans la diversité du répertoire. Cependant, cette tolérance peut être rompue, aboutissant à des manifestations pathologiques auto ou alloimmunes.

### **1) Autoimmunité**

La survie aberrante de cellules B autoréactives peut, entre autre, s'expliquer par la présence de taux excessifs de la cytokine BAFF. Les souris transgéniques pour BAFF présentent une hyperplasie B et des caractéristiques de la physiopathologie de deux maladies autoimmunes : le lupus érythémateux disséminé (SLE)

et le syndrome de Gougerot Sjögren (SGS). En effet, dans les souris surexprimant BAFF, il a été observé une splénomégalie, des taux élevés de facteurs rhumatoïdes, la production d'Ac anti-ADN ainsi que des dépôts d'immunoglobulines dans les reins (Mackay, Woodcock et al. 1999; Groom, Fletcher et al. 2007). De plus, les souris BAFF transgéniques âgées développent un syndrome proche du SGS, avec une infiltration lymphocytaire B dans les glandes salivaires, liée à l'inflammation et à l'augmentation de leur taille (Groom, Kalled et al. 2002). Dans la rate des souris BAFF transgéniques, il a été observé un nombre élevé de LB T2 précurseurs des LB de la zone marginale (LB ZM). De plus, les LB T1 des souris mutantes exprimaient plus fortement CD21 et plus faiblement l'IgM que les LB T1 des souches sauvages. Ces données sous-entendaient une accélération de la maturation de ces derniers en LB T2. Il a été proposé un schéma dans lequel BAFF favoriserait l'échappement à l'apoptose de LB T2 autoréactifs pouvant se différencier en LB de la ZM. Ces derniers seraient à l'initiation de la production d'autoAc, soit par une différenciation extra-folliculaire en plasmocytes ou bien *via* un passage par les centres germinatifs (Batten, Groom et al. 2000).

Enfin, l'état anergique des LB T3 leur confère probablement un rôle dans le maintien de la tolérance immunologique. Il est intéressant de noter que dans des souris prédisposées à développer un lupus, les LB T3 sont sous-représentés en comparaison aux LB T1 et LB T2 (Teague, Pan et al. 2007).

Dans le cas du SLE, l'une des options thérapeutiques choisie est l'immunosuppression B par un Ac monoclonal anti-CD20. Les patients qui présentent une réponse clinique prolongée (sans rechute) ont une expansion des LB Tr. circulants au cours de la reconstitution B plus importante que ne l'ont ceux qui sont répondeurs à court terme (avec rechute) (Anolik, Barnard et al. 2007). Il a également été montré que les patients atteints de SLE présentaient une particularité dans la distribution de leurs lymphocytes B, avec une proportion plus grande des LB T2 en comparaison aux témoins (Landolt-Marticorena, Wither et al. 2011). De plus, cette augmentation corrélait avec les taux de BAFF sérique. En ce qui concerne les LB T1, les données sont controversées. Ils ont à la fois été montrés comme sur-représentés dans les patients lupiques, ou bien équivalents en comparaison aux contrôles sains (Sims, Ettinger et al. 2005; Landolt-Marticorena, Wither et al. 2011).

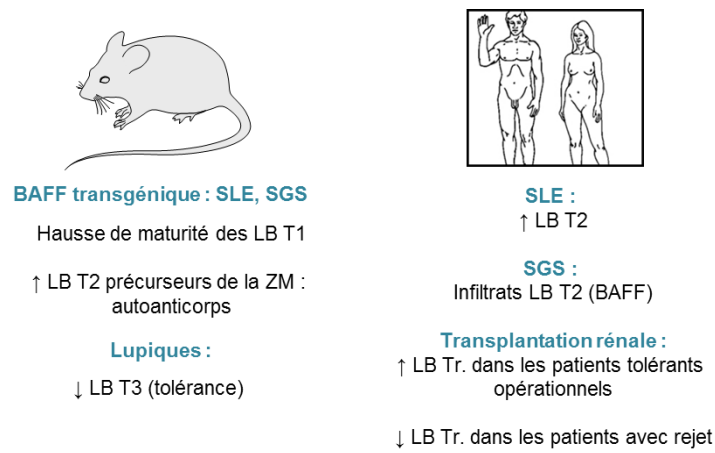
En outre, dans les glandes salivaires de patients atteints du SGS, il a été observé par microscopie une infiltration de LB ayant un phénotype assimilable à celui des LB T2. En effet, ces cellules B exprimaient l'IgD, l'IgM, CD21 et CD23. De plus, la présence de la cytokine BAFF a été observée dans les zones où se situaient ces LB T2 (Daridon, Pers et al. 2006) (FIG. 4). Enfin, il a été montré que le nombre de LB Tr. était diminué chez les personnes âgées saines en comparaison aux témoins jeunes. Ce déficit pourrait être associé à une perte de tolérance progressive, synonyme de sénescence immunologique (Duggal, Upton et al. 2013).

## 2) Alloimmunité

La transplantation est considérée comme la meilleure option thérapeutique pour remplacer la dysfonction d'organes vitaux. Cependant, la survie à long terme du transplant est limitée par le rejet de greffe, qui est la conséquence d'une réponse immune du receveur, dirigée spécifiquement contre les alloAg du donneur. Pouvoir maintenir la tolérance de l'allogreffe à long terme en évitant le rejet et sans utiliser d'immunosuppression en continue, représente un objectif thérapeutique majeur en transplantation.

Plusieurs cohortes de patients transplantés ayant une fonction rénale stable sans traitement d'immunosuppression depuis au moins un an ont été décrites. Ils sont considérés comme tolérants opérationnels (Brouard, Dupont et al. 2005; Newell and Larsen 2006). Chez ces patients, il a été observé un pourcentage supérieur de LB Tr. en comparaison aux patients bénéficiant d'une immunosuppression et ayant une fonction rénale stable (Newell, Asare et al. 2010). Egalement, les patients qui présentent une dysfonction rénale accompagnée d'un rejet, ont un pourcentage de LB Tr. diminué en comparaison aux patients dont la fonction rénale est altérée mais sans qu'il n'y ait de rejet du transplant (Cherukuri, Rothstein et al. 2014). De plus, le pourcentage de cellules B Tr. est drastiquement diminué pour les patients qui développent un rejet humoral chronique en comparaison aux patients stables (Nouel, Segalen et al. 2014). Enfin, il a été démontré qu'une faible fréquence de LB Tr. était associée avec un risque accru de développer un rejet aigu (Shabir, Girdlestone et al. 2015) (FIG. 4).

En conclusion, les LB Tr. semblent avoir un effet bénéfique en transplantation, puisque leur nombre est augmenté chez les patients tolérants et diminué au sein des patients qui rejettent leur greffon. Dans l'autoimmunité, ce sont principalement les LB T2, dont certains sont autoréactifs, qui ont été décrits comme sensibles à la cytokine BAFF impliquée dans leur expansion. Que ce soit dans un contexte pathologique ou normal, ces LB T2 ont plusieurs destins cellulaires, et leur maturation conditionne la formation ainsi que la composition du pool de LB matures.



**FIGURE 4 : Les lymphocytes B transitionnels dans la tolérance immunologique.** Les LB T2 sont particulièrement sensibles à la cytokine BAFF et sont augmentés dans le lupus. Ils sont à l'origine d'une augmentation du nombre de LB ZM autoréactifs. A l'inverse, les LB Tr. peuvent être associés au maintien de la tolérance périphérique, notamment suite à une transplantation. La population des LB T3 semble avoir un rôle protecteur particulier.

#### D. Devenir des lymphocytes B transitionnels

Parmi les LB T2 sont distinguées deux populations aux destins cellulaires différents. D'une part, les LB T2 précurseurs des LB matures folliculaires et de l'autre les LB T2 précurseurs des LB matures de la ZM. La rencontre d'un Ag conduit au recrutement de cellules Ag-spécifiques issues du pool de LB matures. Dès lors, les LB peuvent posséder des fonctions effectrices variées comme la présentation d'un Ag aux LT et/ou la génération de plasmocytes producteurs d'Ac. Cependant, le schéma de l'initiation de la réponse humorale n'est pas si simple. Une hétérogénéité cellulaire et fonctionnelle est retrouvée parmi le pool de LB matures spléniques. Y sont distingués les LB ZM et les LB folliculaires (LB Fo) (Kumararatne and MacLennan 1981; Pillai and Cariappa 2009).



## 1) Les lymphocytes B matures de la zone marginale

Les LB ZM, exclusivement présents dans la rate, sont  $IgM^{\text{forts}}$   $IgD^{\text{faibles}}$   $CD21^{\text{forts}}$   $CD23^{\text{faibles}}$  (Oliver, Martin et al. 1997). Dans une souris adulte, ils représentent entre 5 et 10% des cellules B matures spléniques. Leur génération ainsi que leur localisation dans le sinus marginal sont indépendantes de la liaison avec le LT au travers du CD40 (Oliver, Martin et al. 1999). Ainsi, les LB ZM ne représentent probablement pas une population post-centre germinatif. En effet, à l'instar des cellules B1 du péritoine, les LB ZM ont la capacité de se différencier en cellules sécrétrices d'Ac sous l'influence de *stimuli* polyclonaux T-indépendants et participent ainsi à la réponse immune précoce (Balazs, Martin et al. 2002). Ces cellules B de la ZM ont la particularité phénotypique d'exprimer fortement les récepteurs du complément CD21 et CD35, et sont ainsi capables de fixer des Ag opsonisés (Martin and Kearney 2002). Enfin, les LB ZM sont capables de faire la navette vers les follicules où ils peuvent présenter l'Ag préalablement rencontré dans la ZM (Cinamon, Zachariah et al. 2008; Arnon, Horton et al. 2013).

## 2) Les lymphocytes B folliculaires

La majorité des cellules B matures sont des LB circulants qui migrent au sein des follicules présents dans les organes lymphoïdes secondaires, et sont alors nommés LB Fo. Dans une souris adulte, ils représentent entre 80 et 90% des cellules B matures spléniques. Deux types de cellules B Fo sont distingués. Ceux de type 1 sont majoritaires et se caractérisent par une forte expression de l'IgD et de faibles niveaux d'IgM. Quant à eux, les LB Fo de type 2 expriment fortement ces deux immunoglobulines à la membrane. Ces derniers se distinguent des LB ZM par une faible expression de CD21 (Cariappa, Boboila et al. 2007). La différenciation des LB T2 en LB Fo de type 1 est dépendante d'un signal antigénique fort apporté au BCR. Dans les follicules, ces cellules se situent dans une position adjacente à l'aire des LT, ce qui à la fois, facilite une réponse antigénique T-dépendante, et promeut la formation des centres germinatifs. Différemment, la voie vers les LB Fo de type 2 est sous la responsabilité des signaux (Cariappa, Boboila et al. 2007) toniques du BCR et de la cytokine BAFF. Ces derniers composeraient une

possible source cellulaire pouvant alimenter la ZM, et ainsi participer à une réponse T-indépendante extra-folliculaire (Pillai and Cariappa 2009).

### **3) Les centres germinatifs et la réponse antigène spécifique**

Après avoir fait le « processing » d'un Ag, les LB matures activés deviennent compétents pour présenter cet Ag aux LT CD4<sup>+</sup>. Ces LT alors amorcés, peuvent se différencier en cellules effectrices dont font partie les LT folliculaires helper (Tfh) (Barnett, Simkins et al. 2014). Ces derniers sont essentiels à l'initiation et au maintien du centre germinatif. La structure du centre germinatif est représentée en deux zones. La première, appelée zone sombre, est formée par des LB nommés centroblastes. A ce stade, les cellules B diminuent l'expression de leur BCR à la membrane, prolifèrent et subissent des hypermutations somatiques sur la région variable des gènes d'immunoglobulines (Jacob, Kelsoe et al. 1991; Pascual, Liu et al. 1994). La finalité de ces mécanismes est de former des Ac de plus forte affinité pour l'Ag. Puis, les centroblastes arrêtent leur prolifération et migrent vers la zone claire où ils réexpriment leur BCR (Caron, Le Gallou et al. 2009). Ils sont alors appelés centrocytes. Ces derniers sont exposés aux Ag qui sont incorporés dans les complexes immuns à la surface des cellules dendritiques (DC) folliculaires. Si l'affinité du BCR est faible, les centrocytes ne recevront pas de signaux de survie et vont entrer en apoptose. A l'inverse, si les mutants ont un BCR de forte affinité, ils survivent et ont trois destins cellulaires possibles. D'abord, ils peuvent retourner dans la zone sombre pour proliférer et subir des hypermutations somatiques supplémentaires. Sinon, les LB entrent en contact avec les Tfh, après quoi ils peuvent opérer une commutation de classe (switch) par recombinaison somatique de l'ADN, contrôlée par l'AID (Honjo, Muramatsu et al. 2004; Heesters, Myers et al. 2014). Ils passent ainsi de l'expression d'un BCR à IgM et IgD vers d'autres régions constantes d'immunoglobulines (IgG, IgA ou IgE), afin de générer des Ac ayant des fonctions effectrices différentes. Les LB sortent alors du centre germinatif et deviennent soit des plasmocytes ou bien des cellules B mémoires (Camacho, Kosco-Vilbois et al. 1998; Caron, Le Gallou et al. 2009).

#### 4) Lymphocytes B mémoires et cellules sécrétrices d'anticorps

La littérature propose de définir une cellule B mémoire par l'expression à la membrane de CD27. Cette expression corrèle avec des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la présentation antigénique ainsi que la différenciation en cellules sécrétrices d'Ac (Tangye, Liu et al. 1998).

Parmi les cellules B mémoires CD27<sup>+</sup> sont distinguées celles IgD et IgM négatives qui ont procédé à la commutation de classe, celles IgD et IgM double positives qui n'ont pas changé l'isotype de leur BCR, et les LB mémoires « IgM-only » ou « IgD-only » (Kaminski, Wei et al. 2012). Les cellules B mémoires IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> représentent 15% des LB circulants dans le sang périphérique. Elles sont issues des LB de la zone marginale ou bien des centres germinatifs, et présentent de forts taux d'hypermutations somatiques sur les régions variables des gènes d'immunoglobulines (Klein, Rajewsky et al. 1998; Weller, Braun et al. 2004). Quant à elles, les cellules B mémoires « IgM-only » représentent environ 10% des LB circulants. La majeure partie d'entre elles portent des régions variables mutées et sont semblables aux cellules B mémoires ayant commuté de classe. Enfin, Les cellules B mémoires « IgD-only » sont largement minoritaires et représentent moins de 1% du pool B circulants (Klein, Kuppers et al. 1997; Klein, Rajewsky et al. 1998).

La majorité des cellules circulantes CD19<sup>+</sup> CD27<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> sécrétrices d'Ac sont considérées comme des plasmablastes. Certaines études suggèrent qu'une partie des plasmablastes serait précurseur des plasmocytes. Le terme « plasmocyte » est utilisé lorsque l'on parle des cellules sécrétrices d'Ac ayant atteint le stade ultime de différenciation. Elles sont alors caractérisées par un programme transcriptionnel spécifique, par l'expression de la molécule d'adhésion CD138, une forte expression de CD38 et ne possèdent peu ou pas d'immunoglobulines à la surface. Au niveau de la rate, deux voies de développement plasmocytaire sont décrites. Ceux provenant des centres germinatifs sont surtout destinés à être des plasmocytes à longue durée de vie résidant dans la moelle osseuse. A l'inverse, ceux issus d'une origine extra-folliculaire seront des plasmocytes à courte durée de vie et ne migreront pas vers cet organe lymphoïde primaire (Smith, Hewitson et al. 1996; Oracki, Walker et al. 2010).

L'environnement cytokinique est indispensable pour une différenciation terminale des LB en plasmocytes effecteurs. L'une d'entre-elles est l'interleukine 21 (IL-21) sécrétée par les Tfh. Par exemple, les souris *il21<sup>-/-</sup>* ou *il21r<sup>-/-</sup>*, possèdent des centres germinatifs mais ont une défaillance pour la production d'IgG spécifiques de l'Ag (Ozaki, Spolski et al. 2002). Egalement, Stat3, qui agit en aval dans les voies engagées par l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-21, est capable d'induire l'expression de *blimp1* en entrant en compétition avec Bcl6. Blimp-1 est un facteur de transcription essentiel pour la différenciation terminale des LB en plasmocytes (Oracki, Walker et al. 2010).

Les cellules B Tr. ont une position centrale dans l'ontogénèse B, au travers de leur implication dans la tolérance périphérique et dans le contrôle de la maturation des LB. La tolérance repose sur le contrôle de la réponse humorale vis-à-vis d'Ag endogènes, mais aussi sur des fonctions immunorégulatrices que présentent les LB. Parmi elles sont principalement distinguées l'inhibition de la prolifération des LT, l'induction de LT régulateurs (Treg) ainsi que l'inhibition de la différenciation des LT en cellules pro-inflammatoires. Ces fonctions régulatrices sont notamment sous l'influence de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Quels-sont les phénotypes et les fonctions des LB régulateurs ?

## II. Les lymphocytes B régulateurs

La première preuve d'une suppression de la réponse inflammatoire par les LB fut apportée en 1974 dans des modèles de rongeurs souffrant d'une réaction d'hypersensibilité retardée au niveau de la peau. La première étude s'est basée sur l'utilisation de cochons d'inde immunodéplétés suite à une injection de cyclophosphamide. Ces rongeurs ont ensuite été immunisés avec de l'ovalbumine. Puis, quelques jours plus tard, ces derniers ont reçu : soit un pool de cellules spléniques déplétées en LB, ou bien des splénocytes totaux ; provenant dans ces deux cas de donneurs immunisés par l'ovalbumine. Ces expériences ont montré que les cochons d'inde receveurs de cellules non B avaient une réaction cutanée accentuée en comparaison aux receveurs de splénocytes totaux (Katz, Parker et al. 1974; Neta and Salvin 1974).

Les études évoquées précédemment ont encouragé les travaux ciblant spécifiquement les LB et leur rôle dans le contrôle de l'inflammation. En 1996, Wolf *et al.* ont utilisé un modèle de souris  $\mu$ MT présentant une délétion de la région transmembranaire de la chaîne  $\mu$ , impliquant une déficience en LB. Les souris déficientes et celles « contrôle » (non déficientes) ont été immunisées par le peptide MBP (myelin basic protein) afin d'induire une encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) orchestrée par les LT CD4<sup>+</sup>. Suite à cette immunisation, les souris « contrôle » et  $\mu$ MT ont développé une réponse lymphocytaire de type T helper 1 (Th1), avec une sécrétion d'interféron (IFN)- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-2. A 40 jours, il a été observé que les souris  $\mu$ MT (dont la fréquence et la fonction des LT CD4<sup>+</sup> sont normales) ont une forte sévérité de la maladie et n'entrent pas en rémission, contrairement aux souris « contrôle » (Wolf, Dittel *et al.* 1996).

L'ensemble de ces travaux présente des LB « suppresseurs » de l'inflammation et de l'autoimmunité. Le terme « régulateur » ne sera utilisé que plus tard, lorsque les études se sont intéressées aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette suppression.

## **A. Phénotypes et fonctions des lymphocytes B régulateurs**

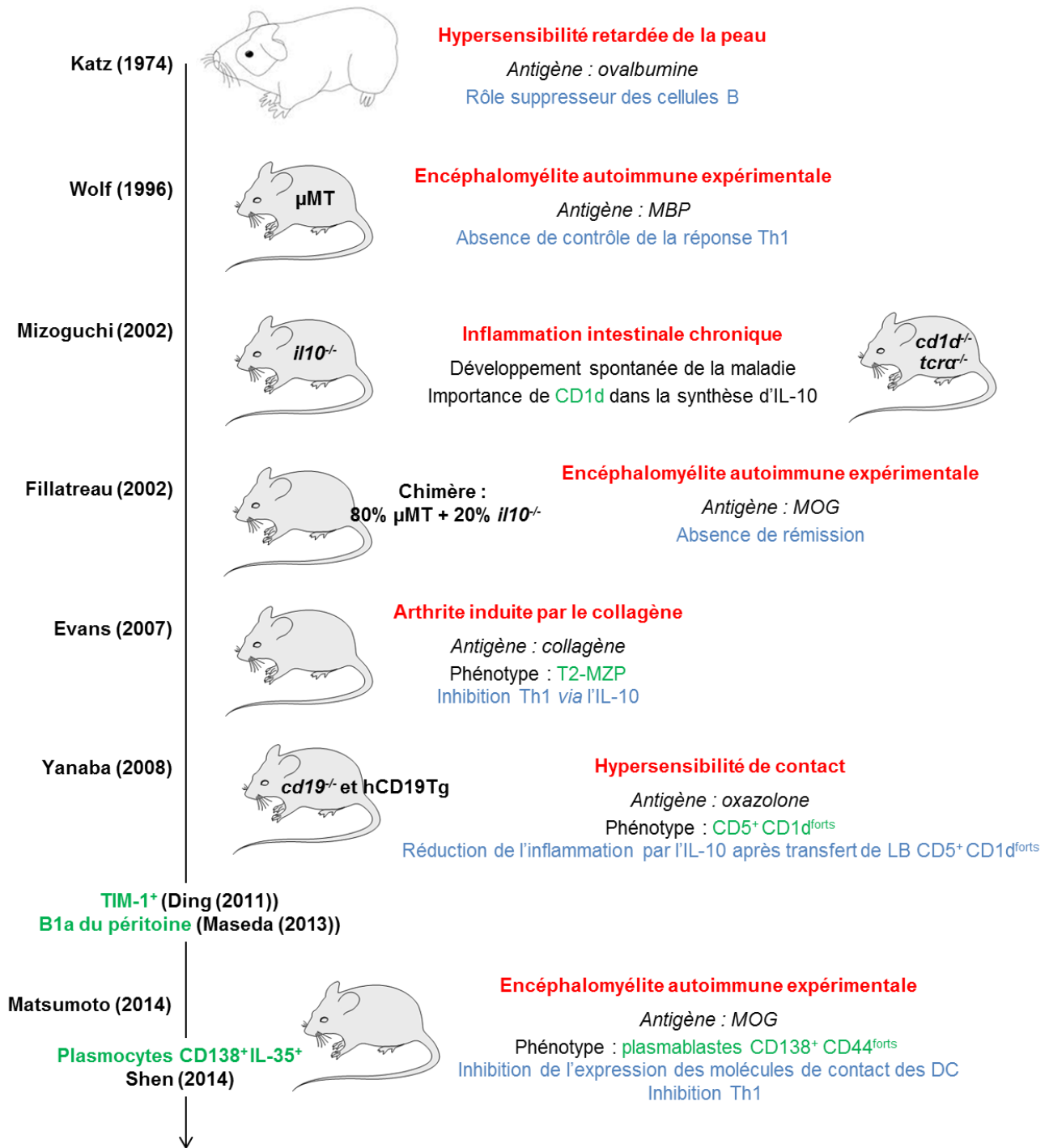
### **1) Interleukine 10 et immunorégulation**

L'IL-10 a initialement été décrite comme étant sécrétée par des clones de lymphocytes Th2 murins, et a été associée à l'inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  par des clones Th1 (Fiorentino, Bond *et al.* 1989). *In vivo*, les principales sources d'IL-10 sont les monocytes, les macrophages et les lymphocytes Th. Cependant, cette cytokine est également synthétisée par les LB, les DCs, les LT cytotoxiques, les Treg de type 1, les cellules natural killers (NK), les mastocytes, et les polynucléaires neutrophiles (Sabat, Grutz *et al.* 2010). L'effet de l'IL-10 sur les LT peut être direct en inhibant la production d'IFN- $\gamma$ . Il peut aussi être indirect, au travers d'une limitation de la synthèse d'IL-12 par les cellules présentatrices d'Ag (CPA), ce qui conduit ensuite à une inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  par les LT (D'Andrea, Aste-Amezaga *et al.* 1993). En plus d'agir sur la réponse Th1, l'IL-10 agit sur les fonctions immunes des monocytes. Elle inhibe entre autre la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-6 par les monocytes activés avec des lipopolysaccharides (LPS : ligands du TLR4), et agit de façon autocrine en limitant leur expression du CMHII (de Waal Malefyt, Abrams *et al.* 1991). Enfin, il a été

observé un nombre élevé de cellules productrices d'IL-10 dans les patients atteints de SLE ainsi que chez leurs parents au premier degré. Ces données sous entendent que cette forte production d'IL-10 pourrait en partie être expliquée par des facteurs génétiques. L'environnement semble aussi impacter sur la production d'IL-10 puisque les conjoints des patients lupiques possèdent eux-aussi un nombre élevé de cellules qui sécrètent cette cytokine en comparaison aux témoins (Grondal, Kristjansdottir et al. 1999). A l'inverse, il a été montré une déficience en IL-10 dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), expliquant entre autre l'activation persistante du système immunitaire (Katsikis, Chu et al. 1994).

### *Les lymphocytes B sécrètent l'interleukine 10 et limitent l'inflammation*

La première étude sur la régulation B *via* l'IL-10 fut réalisée dans l'inflammation intestinale chronique. Les souris ayant eu un « knockout (KO) » pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur des cellules T (*tcr $\alpha$ KO*) et celles *il10KO* développent spontanément cette maladie. Il a été observé entre ces deux mutants, une différence dans l'expression de la glycoprotéine CD1d à la surface des LB issus des ganglions lymphatiques mésentériques de l'intestin. En effet, en comparaison aux souris IL-10KO, la protéine CD1d est plus fortement exprimée par les LB des souris *tcr $\alpha$ KO* (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 2002). Il est intéressant de noter que la queue cytoplasmique de CD1d est associée aux cascades de signalisation impliquées dans la transcription du gène *il10* (Colgan, Hershberg et al. 1999). De plus, lorsque CD1d n'est pas exprimé, l'inflammation intestinale développée est bien plus sévère (FIG. 5).



**FIGURE 5 : Chronologie non exhaustive des travaux sur la régulation de l'inflammation par les lymphocytes B et phénotypes des cellules B10 murines.** La régulation de la réponse T par les cellules B a surtout été observée dans des modèles physiopathologiques dépendants d'un Ag. Les B10 ont été décrits parmi les LB spléniques T2-MZP,  $CD5^+ CD1d^{forts}$  ainsi que dans la population des plasmablastes.

Ce rôle régulateur des LB producteurs d'IL-10, nommés B10 (Iwata, Matsushita et al. 2011), a par la suite été confirmé dans deux études basées sur des modèles murins déficients en IL-10. Fillatreau *et al.* ont étudié les LB régulateurs (Breg) dans l'EAE induite par la « myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ». Dans cette étude, des souris sauvages ont été irradiées puis reconstituées à 80% avec de la moelle osseuse de souris  $\mu$ MT déficientes en LB, et à 20% avec de la moelle de souris *il10KO*. En conséquence, ces souris chimériques ne contiennent pas de LB producteurs d'IL-10, mais 80% des autres CPA et 80% des LT expriment cette cytokine. Les souris sauvages immunisées par MOG ont un pic du score de l'EAE à 20 jours puis entrent en rémission. Comme il a déjà été démontré par Wolf *et al.*, l'absence de LB ne permet pas cette rémission. Cependant, les souris possédant des LB *il10KO*, n'entrent également pas dans cette phase de rémission. Enfin, des LB de souris sauvages dont la production d'IL-10 a été induite par MOG ont été purifiés *ex vivo*, puis transférés dans des souris chimériques dont les LB sont *il10KO*. Il a alors été observé que les souris chimériques malades sont entrées en rémission, contrairement aux souris qui n'ont pas reçu de B10 (Fillatreau, Sweenie et al. 2002). Ce rôle protecteur des cellules B10 a également été décrit dans l'arthrite induite par le collagène de type II, puisqu'elles y permettent une inhibition des réponses Th1 et Th17 (Mauri, Gray et al. 2003; Carter, Rosser et al. 2012) (FIG. 5).

La communauté scientifique s'est accordée pour définir les LB ayant un phénotype IL-10<sup>+</sup> comme des LB régulateurs, et ce, quel que soit le modèle pathologique utilisé. Dès lors, les études ont eu pour objectif de perfectionner ce phénotype B10 en tentant de déterminer précisément les populations de LB impliquées dans la sécrétion l'IL-10.

### *Les populations de cellules B murines productrices d'IL-10*

Dans l'arthrite induite par le collagène, il a été observé que les splénocytes des souris en rémission expriment plus l'IL-10 que ceux des souris étant dans une phase aiguë de la maladie. Puis, il a été montré que ces cellules B10 étaient majoritairement CD21<sup>fortes</sup>, CD23<sup>+</sup> et IgM<sup>fortes</sup>, ce qui correspond aux phénotypes des LB T2 précurseurs des LB ZM (T2-MZP). Après un transfert des LB T2-MZP dans des souris syngéniques immunisées par le collagène de type II, le score clinique de l'arthrite observé était moins élevé que pour les souris ayant reçu des LB Fo ou LB ZM. De plus, les LB T2-MZP inhibent la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> *via* la sécrétion



d'IL-10. Les auteurs ont également démontré que l'inhibition de la réponse Th1 était indépendante du contact cellulaire (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007). Les souris *il10*KO ont plus de lymphocytes Th sécréteurs des cytokines inflammatoires IFN- $\gamma$  et IL-17, et possèdent moins de Treg que les souris sauvages. Carter *et al.* ont démontré que la balance entre les lymphocytes Th1/Th17 et les Treg pouvait être rétablie après un transfert de LB T2-MZP issus de souris *il10*<sup>+/+</sup> dans les souris *il10*<sup>-/-</sup> (Carter, Vasconcellos et al. 2011). Comme il a été présenté précédemment, l'expression de la glycoprotéine CD1d est une des caractéristiques phénotypiques des B10. Yanaba *et al.* ont étudié le potentiel régulateur des LB CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact. Cette réaction inflammatoire est orchestrée par les LT sous la dépendance de l'Ag, qui est présenté aux LT par les cellules de Langerhans de la peau ayant migré dans les ganglions lymphatiques drainants. Dans ce modèle aussi, la présence des LB permet de limiter l'inflammation. En comparaison aux souris sauvages ou *cd19*<sup>-/-</sup>, la production d'IL-10 par les cellules B de la rate et de la cavité péritonéale activées par des LPS est plus élevée dans les souris transgéniques qui surexpriment CD19. Les cellules B spléniques IL-10<sup>+</sup> ont ensuite été caractérisées comme étant majoritairement CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup>. Il a été démontré que le transfert de LB CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> spléniques dans des souris sauvages déplétées en LB réduit l'inflammation menée par les LT. Ces résultats étaient similaires, que le transfert ait été réalisé avant ou après la sensibilisation par l'Ag (Yanaba, Bouaziz et al. 2008). De même, les cellules B CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> issues de souris donneuses CD20<sup>-/-</sup> limitent les symptômes de l'EAE après avoir été transférées dans des souris sauvages déplétées en LB suite à une immunosuppression par un Ac monoclonal anti-CD20 (les LB *cd20*<sup>-/-</sup> sont résistants à la déplétion par l'Ac anti-CD20). A l'inverse, les LB CD20<sup>-/-</sup> transférés qui ne sont pas CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> ne régulent pas la progression de la maladie (Matsushita, Yanaba et al. 2008).

La molécule TIM-1 (T cell Ig domain and mucin domain protein-1) a également été utilisée pour établir un phénotype B10. TIM-1 est une molécule de costimulation qui module la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs. Les cellules B qui l'expriment sont enrichies en B10 et leur transfert dans des souris ayant reçu une greffe d'îlots de Langerhans permet une meilleure survie du transplant, dépendante de l'IL-10 (Ding, Yeung et al. 2011). De plus, notons que les cellules B CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> sont particulièrement enrichies en LB TIM-1<sup>+</sup>. Enfin, il a également été décrit que les cellules B1a (CD11b<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>) du péritoine représentent une population enrichie en

B10 en comparaison aux B1b (CD11b<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup>), et limitent l'inflammation présente lors de la colite intestinale (Maseda, Candando et al. 2013). En conclusion, il est important de considérer que les phénotypes utilisés pour identifier les B10 ont des redondances, et ce malgré des différences de localisation, puisqu'ils sont retrouvés dans la rate, le sang, les ganglions lymphatiques, et le péritoine. En effet, les LB T2-MZP expriment CD1d, une partie des cellules CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> expriment TIM-1, et les B1a sont positifs pour CD5.

Les cellules B ayant atteint un stade terminal de différenciation en plasmablaste/plasmocyte possèdent la capacité de sécrétion de l'IL-10. Les souris 10BiT expriment la protéine Thy 1.1 (CD90.1) sous le contrôle des éléments régulateurs d'une construction chromosomale bactérienne codant un transgène *il10*. Ainsi, l'expression à la surface de Thy1.1 est le reflet de la production d'IL-10 (Maynard, Harrington et al. 2007). En utilisant ce modèle murin, Maseda *et al.* ont pu séparer *ex vivo* les cellules B IL-10<sup>+</sup> (Thy.1.1<sup>+</sup>) induites *in vivo* par des LPS. Il a alors été démontré qu'en comparaison aux LB IL-10<sup>-</sup>, les LB IL-10<sup>+</sup> sont capables de sécréter des IgM, en lien avec une surexpression des gènes *blimp1*, *xbp1* et *irf4*. De plus, les auteurs ont observé que ces B10 peuvent également produire des Ac Ag-spécifiques ainsi que des autoAc (Maseda, Smith et al. 2012). Dans l'EAE, Matsumoto *et al.* ont démontré que les plasmablastes CD138<sup>+</sup> CD44<sup>forts</sup> sont les principales cellules qui sécrètent l'IL-10. Ces plasmablastes IL-10<sup>+</sup> sont particulièrement observés dans les ganglions lymphatiques drainants et réduisent l'inflammation dans l'EAE induite par MOG. De plus, l'expression d'IRF4 est essentielle pour la production d'IL-10 par les plasmablastes. Enfin, il a été démontré que les plasmablastes réduisent l'expression des molécules de contact CD80 et CD86 à la surface des DC, ainsi que leur expression des gènes *il6* et *il12a*. Les auteurs ont expérimenté une culture mixte avec : des DC, des LT CD4<sup>+</sup> exprimant un TCR spécifique de MOG, et des plasmablastes *il10*<sup>+/+</sup> ou *il10*<sup>-/-</sup>. Il a été constaté que lorsque cette culture a été réalisée avec des plasmablastes *il10*<sup>+/+</sup>, la production d'IFN- $\gamma$  par les LT était inhibée. En revanche cette régulation n'a pas été observée lorsque la culture mixte a été faite avec des plasmablastes *il10*<sup>-/-</sup>. Le potentiel régulateur des plasmablastes IL-10<sup>+</sup> s'explique notamment par leur capacité à inhiber l'activité des DC à l'origine de la génération de LT autoréactifs (Matsumoto, Baba et al. 2014). Enfin, Shen *et al.* ont observé au court d'une infection par *Salmonella*, la présence de plasmocytes CD138<sup>forts</sup> producteurs d'IL-10 et d'IL-35. Les auteurs ont démontré que, tout comme l'IL-10, l'IL-35 est nécessaire pour que les souris atteinte d'EAE entrent en rémission (Shen, Roch et al. 2014) (FIG. 5).

## *Les populations de lymphocytes B humains producteurs d'interleukine 10*

La tolérance immunologique ainsi que la régulation de la réponse inflammatoire sont deux notions complémentaires. Chez l'Homme, les LB Tr. semblent être impliqués dans le contrôle de l'auto et de l'alloimmunité notamment par rapport à la sélection qu'ils subissent. Mais au-delà de leur situation centrale dans le développement lymphocytaire B, les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> sont également considérés comme des Breg.

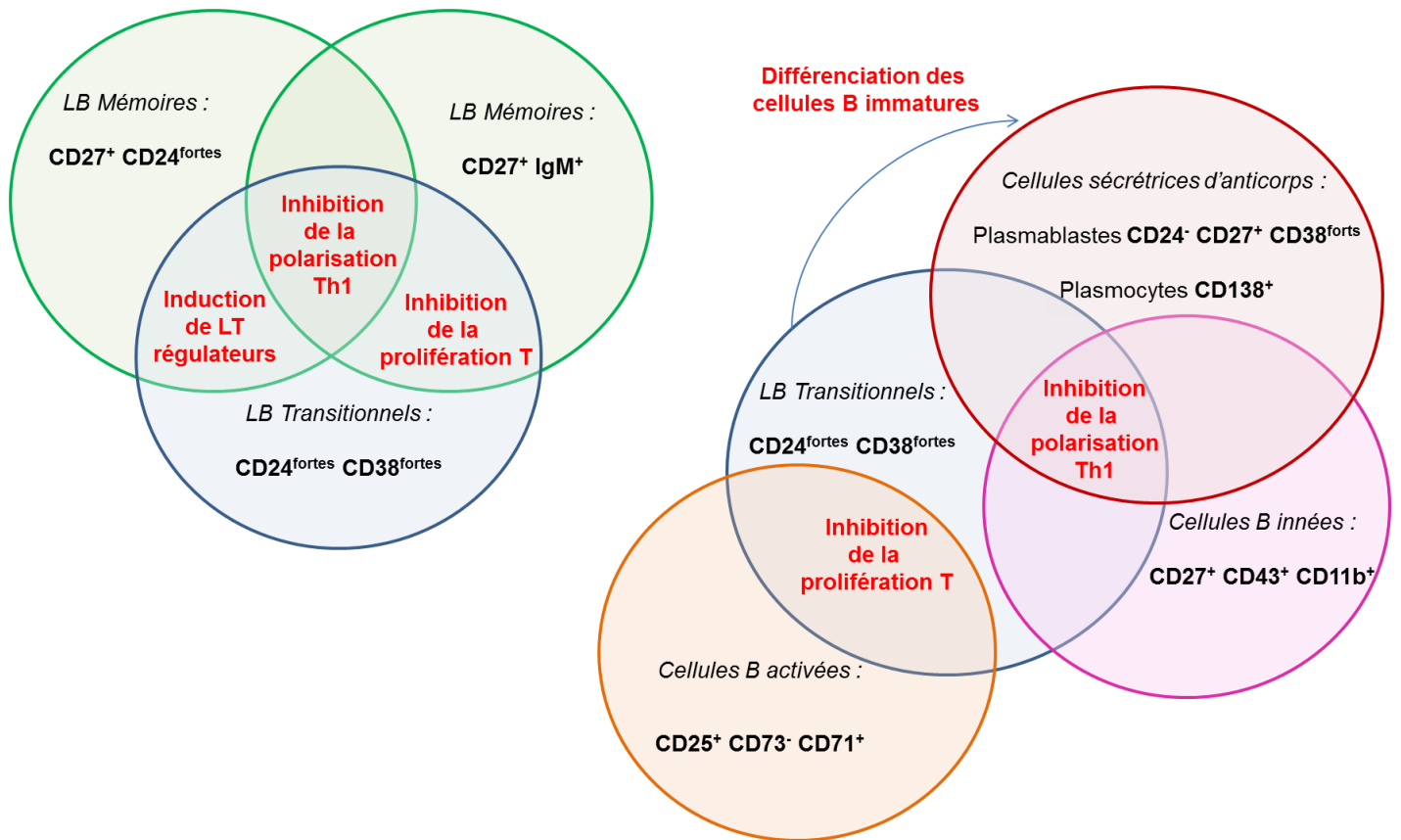
Blair *et al.* ont montré que la majorité des cellules B CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> circulant dans le sang chez l'Homme sont également des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> et CD38<sup>forts</sup>. De plus, après avoir été triés *ex vivo*, les LB Tr. sont capables d'inhiber la différenciation des LT conventionnels en LT positifs pour le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . En outre, la capacité des LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> à inhiber la réponse inflammatoire des LT CD4<sup>+</sup> s'explique en partie par leur capacité à produire l'IL-10. Cette fonction régulatrice est exacerbée suite à l'engagement du CD40, faisant intervenir une voie de signalisation dans laquelle le facteur de transcription STAT3 est impliqué (Blair, Norena *et al.* 2010).

Les LB répondent à des signaux de contact cellulaire, à l'Ag, à des molécules d'origines bactériennes ou virales, ainsi qu'à des cytokines pour produire l'IL-10. Certaines cellules B sont capables d'exprimer et de sécréter l'IL-10 de façon « spontanée ». En revanche suite à certaines stimulations, la production d'IL-10 peut être induite dans des LB qui ne l'exprimaient pas initialement. Ces derniers sont appelés proB10, progéniteurs de B10 (Iwata, Matsushita *et al.* 2011).

Les LB Tr. ne représentent pas la seule population cellulaire B humaine capable de produire l'IL-10. En effet, la population B CD24<sup>forte</sup> CD27<sup>+</sup> contient des B10 et des proB10. Ces cellules sécrètent (sans stimulation) plus d'IL-10 que les LB CD24<sup>faibles</sup> CD27<sup>-</sup>. En comparaison à ces derniers, les LB CD24<sup>forts</sup> CD27<sup>+</sup> répondent plus efficacement à l'engagement de CD40, aux LPS, et aux CpG-ODN pour sécréter l'IL-10. De plus, la stimulation par un Ac anti-CD40 ajoutée à celle apportée par des motifs CpG-ODN a été montrée comme étant particulièrement performante pour induire la production de l'IL-10 parmi les proB10, et probablement de l'exacerber parmi les B10. De plus, il a été démontré *in vitro* que les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> ont la capacité

de limiter la production de TNF- $\alpha$  des monocytes, et cela de façon IL-10 dépendante (Iwata, Matsushita et al. 2011).

En 2014, Khoder *et al.* ont confirmé la capacité qu'ont les LB Tr. à sécréter l'IL-10. Les auteurs ont également mis en évidence une nouvelle population IgM<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> capable de produire cette cytokine. Contrairement aux LB matures et LB mémoires IgM, les cellules B mémoires à IgM ont été décrites comme compétentes pour inhiber la production d'INF- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup>. De plus, les LB mémoires à IgM ainsi que les LB Tr. limitent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> notamment au travers de la sécrétion d'IL-10. En effet, l'utilisation d'un Ac bloquant le récepteur à l'IL-10 réduit leur potentiel régulateur. En outre, le contact cellulaire est un élément impliqué dans l'inhibition de la prolifération et offre un effet additionnel à celui de l'IL-10 (Khoder, Sarvaria et al. 2014) (FIG. 6). Bouaziz *et al.* avaient déjà démontré cet apport de l'IL-10 pour réguler la prolifération T. En effet, les auteurs ont utilisés des surnageants de culture contenant l'IL-10 sécrétée par des LB activés. Après ajout des surnageants dans la culture de LT conventionnels, il a été observé une inhibition de la prolifération de ces derniers. Cette inhibition était diminuée lorsque l'activité de l'IL-10 fut bloquée par un Ac bloquant (Bouaziz, Calbo et al. 2010). Notons aussi que l'inhibition de la prolifération des LT n'est pas nécessairement dépendante de l'IL-10, mais peut nécessiter un contact cellulaire notamment *via* l'interaction entre les molécules CD80/CD86 des LB et CD28 des LT (Lemoine, Morva et al. 2011).



**FIGURE 6 : Cellules B productrices d'interleukine 10 et fonctions régulatrices associées.** La production d'IL-10 principalement décrite pour les cellules B mémoires et transitionnelles peut être associée à trois fonctions régulatrices : l'induction de Treg, l'inhibition de la différenciation T en LT  $TNF-\alpha^+$   $IFN-\gamma^+$  et l'inhibition de la prolifération T. Les cellules sécrétrices d'Ac ainsi que des populations moins décrites de LB innés et activés sont également capables de produire l'IL-10 et d'inhiber la réponse T. Enfin, les cellules B immatures (notamment transitionnelles) sont particulièrement compétentes pour se différencier en cellules sécrétrices d'Ac, productrices d'IL-10 et inhibitrices de l'activation des DC et ainsi de la polarisation Th1 (chez la souris).

Toujours dans le sang périphérique, les plasmablastes  $CD24^- CD27^{fortes} CD38^{fortes}$  ont été montrés comme producteurs d'IL-10. Au travers d'un modèle de différenciation *in vitro*, il a été observé que les plasmablastes ainsi que les plasmocytes  $CD138^+$  induits en culture expriment fortement l'IL-10 (de Masson, Bouaziz et al. 2015). De plus, les cellules  $IL-10^+$  induites par une stimulation du CD40, par des CpG-ODN et de l'IL-4, présentent un profil transcriptionnel proche de celui des plasmablastes avec une induction des gènes *AICDA*, *IRF4*, *PRDM1* ainsi qu'une baisse d'expression de *BCL6*. Une fois triés et remis en culture, les B10 induits se différencient et sécrètent plus d'IgM et d'IgG que les cellules B  $IL-10^-$ , via un effet autocrine de l'IL-10 (Heine, Drozdenko et al. 2014). Enfin, il a été démontré que des LB  $CD27^+ CD38^+$  obtenus après différenciation *in vitro*

sont capables de sécréter des IgM et l'IL-10. De plus, les cellules B immatures transitionnelles CD27<sup>-</sup> sont les plus compétentes pour se différencier en plasmablastes CD27<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> sécréteur d'IL-10 (Matsumoto, Baba et al. 2014).

Chez la souris, les cellules B1a ont été décrites comme B10. Griffin et Rothstein, ont cherché à identifier leurs homologues humains. En se basant sur un phénotype B1 (CD20<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>) déjà décrit chez l'Homme (Griffin, Holodick et al. 2011), les auteurs ont pu mettre en évidence une population rare de B1 exprimant le CD11b et ayant un fort potentiel pour sécréter l'IL-10 en comparaison aux cellules matures et mémoires CD43<sup>-</sup> et aux B1 CD11b<sup>-</sup>. Les B1 CD11b<sup>+</sup> sont capables de limiter la production de TNF- $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup> de façon IL-10 dépendante (Griffin and Rothstein 2012) (FIG. 6).

L'étude de l'IL-10 dans un environnement allergique a permis de mettre en évidence des mécanismes cellulaires T et B impliqués dans la tolérance immunologique. Elle favorise la production d'IgG4 tandis qu'elle inhibe la commutation de classe vers l'IgE induite par l'IL-4 (Jeannin, Lecoanet et al. 1998). Il est décrit que les IgG4 ont des propriétés anti-inflammatoires, expliquées par une faible affinité pour les Fc $\gamma$  récepteurs (Fc $\gamma$ R) (van der Neut Kolfshoten, Schuurman et al. 2007). Enfin, les IgG4 ne peuvent pas former de complexes immuns et n'activent pas la cascade du complément (van der Zee, van Swieten et al. 1986; Bindon, Hale et al. 1988).

Les études portant sur la régulation B décrites précédemment se sont concentrées sur l'expression de l'IL-10 par les LB en ciblant une population cellulaire particulière avec une démarche *a priori*. Van De Veen *et al.* ont choisi une approche différente en réalisant une étude d'un ensemble de gènes exprimés par les cellules qui sécrètent l'IL-10. Techniquement, les auteurs ont pu isoler les cellules sécrétrices d'IL-10 à l'aide d'un outil permettant la capture de la cytokine en sortie des vésicules d'exocytose. De nombreux gènes ont été montrés surexprimés par les LB IL-10<sup>+</sup> en comparaison aux LB IL-10<sup>-</sup>, dont *IL2Ra* (codant CD25), *NT5E* (codant CD73) et *TFRC* (codant CD71). Ainsi, les cellules B IL-10<sup>+</sup> ont été décrites comme CD25<sup>+</sup> CD73<sup>-</sup> et CD71<sup>+</sup> et inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> spécifique de l'Ag. Les auteurs ont aussi montré que des IgG4 étaient sécrétées par les cellules IL-10<sup>+</sup> suite à une stimulation de leur TLR9. Il a été observé que les cellules B spécifiques de l'allergène ont des taux élevés des transcrits de l'IgG4 et de l'IL-10. De plus, les patients allergiques contaminés par le venin

d'abeille possèdent plus de B10 que les patients ayant reçu une immunothérapie spécifique du venin (van de Veen, Stanic et al. 2013). En conclusion, les LB IL-10<sup>+</sup> semblent avoir un rôle dans la tolérance aux allergènes au travers de la production d'IgG4, soutenant ainsi la notion de plasmocytes régulateurs.

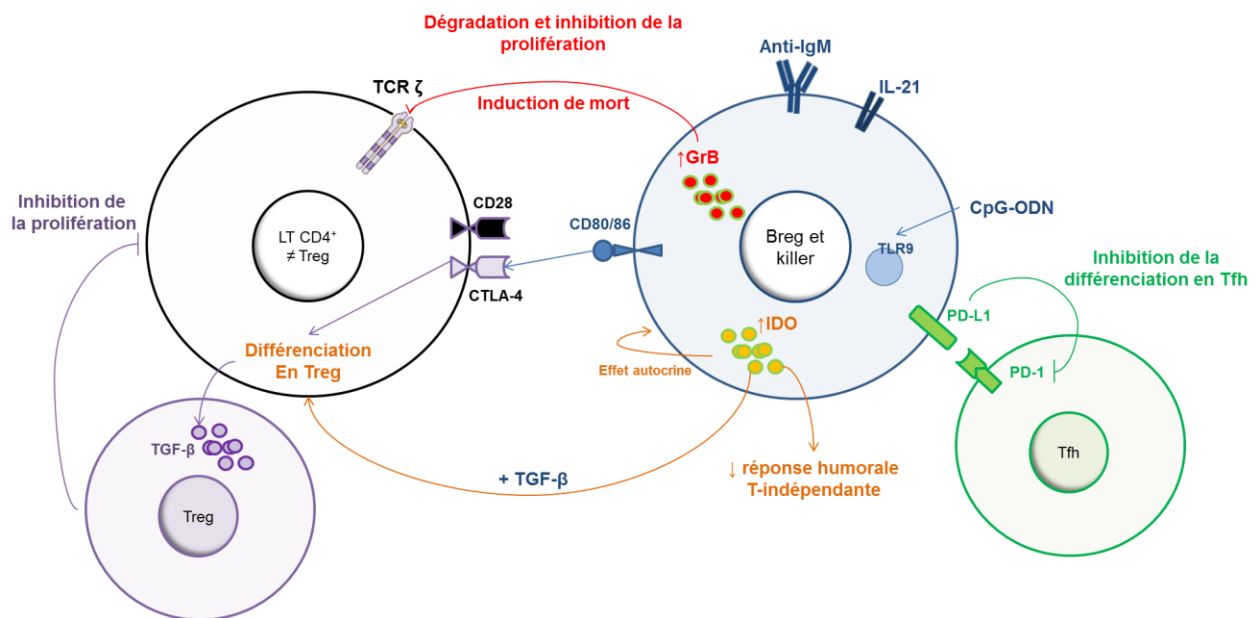
Les études chez l'Homme ont cherché à identifier les cellules B qui ont la capacité intrinsèque de produire l'IL-10. Une autre approche a été envisagée afin de déterminer les conséquences phénotypiques et fonctionnelles d'une surexpression de l'IL-10 induite dans les LB par transfection d'un plasmide codant le gène *IL10*. Stanic et al. ont observé que les LB transfectés surexprimant l'IL-10 sécrètent plus d'antagonistes de l'IL-1R et plus de VEGF (vascular endothelial growth factor) en comparaison aux LB transfectés avec un plasmide « contrôle ». De plus, ces cellules B ont des niveaux de transcrits de PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1), de CD40 et de CD25 supérieurs aux LB qui ne surexpriment pas l'IL-10. Ainsi, cette surexpression semble induire l'expression de protéines impliquées dans l'activation et le contact cellulaire, ainsi que dans la sécrétion de molécules anti-inflammatoires. En outre, cette induction de l'expression d'IL-10 induit une transcription des gènes *IRF4* et *XBPI* impliqués dans la différenciation terminale en plasmocytes. Au niveau fonctionnel, la surexpression de l'IL-10 dans les LB leur permet d'inhiber la différenciation des MDDCs (monocyte-derived dendritic cells) ainsi que la sécrétion de la cytokine inflammatoire IL-12p70. Enfin lorsque des PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) sont cultivées avec des LB surexprimant l'IL-10, leur prolifération est d'avantage inhibée que lorsque la culture est faite avec des LB non transfectés (Stanic, van de Veen et al. 2015).

## **2) Immunorégulation par d'autres molécules que l'interleukine 10**

### *Le granzyme B sous le contrôle de l'interleukine 21*

Le granzyme B (GrB) est une sérine protéase principalement produite par les cellules NK et les LT cytotoxiques. Elle induit l'apoptose des cellules ciblées. Par exemple, les Treg induisent la mort des cellules T effectrices et peuvent aussi en inhiber la prolifération. Ces mécanismes sont indépendants de la perforine et font intervenir le GrB ainsi qu'un contact cellulaire (Gondek, Lu et al. 2005). Les DC plasmacytoïdes sont également capables de produire le GrB et d'inhiber la prolifération des LT (Jahrsdorfer, Vollmer et al. 2010).

L'IL-21 induit la différenciation des LB en plasmocytes sous l'influence d'une stimulation de CD40 (Ettinger, Sims et al. 2005). Lorsque la stimulation des LB par l'IL-21 est appliquée conjointement à l'engagement du BCR, la production de GrB est induite, et cela, de façon plus prononcée dans les LB naïfs que mémoires (Hagn, Schwesinger et al. 2009). De plus, Les stimulations par l'IL-21 et par un Ac anti-IgM ont été démontrées comme efficaces pour induire des LB GrB<sup>+</sup>, majoritairement CD5<sup>+</sup>, capables d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Cette suppression pourrait s'expliquer par le fait que les LB GrB<sup>+</sup> dégradent la chaîne ζ du TCR. Il a été montré que l'induction de la production de GrB dans les cellules B par l'IL-21 et l'engagement du BCR est accompagnée par une hausse de l'expression d'autres molécules immunorégulatrices : l'IL-10 et l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) (Lindner, Dahlke et al. 2013). IDO est une enzyme qui réduit la quantité de tryptophane dans le milieu. Son activité conduit à un arrêt de la prolifération des LT et favorise l'émergence de Treg (Munn, Sharma et al. 2005; Sharma, Huang et al. 2013). Enfin, il a été montré dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) que la double stimulation par l'IL-21 et des motifs CpG-ODN induit la sécrétion de GrB par les LB. Ces derniers dévoilent alors une activité cytotoxique et sont capables de tuer les cellules autologues. Ils sont considérés comme des LB suppresseurs (Jahrsdorfer, Blackwell et al. 2006) (FIG. 7).



**FIGURE 7 : Mécanismes régulateurs IL-10 indépendants des lymphocytes B.** L'engagement du BCR et la liaison de l'IL-21 induisent la production de GrB dans les cellules B. Cette protéase est capable de dégrader la chaîne ζ du TCR, et est associée à l'inhibition de la prolifération des LT et induit la mort cellulaire. Les LB



stimulés par des motifs CpG-ODN expriment IDO qui leur permet de contrôler leur différenciation en plasmocytes et d'induire des Treg en association avec la production de TGF- $\beta$ . Le co-récepteur inhibiteur du TCR CTLA-4 est également important pour la différenciation de LT conventionnels en Treg producteurs de TGF- $\beta$ . Enfin, la forte expression de PD-L1 permet aux cellules B de limiter la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Tfh (Khan, Hams et al. 2015).

### *Le CTLA-4 dans l'axe TGF- $\beta$ /IDO*

La protéine CTLA-4 a un rôle inhibiteur et bloque le signal qui s'établit entre les molécules CD80/CD86 exprimées à la surface des CPA, et le CD28 des LT. Il a été démontré que la protéine de fusion soluble composée du CTLA-4 associé à une immunoglobuline (CTLA-4-Ig) induit la production d'IFN- $\gamma$  par les DC (Grohmann, Orabona et al. 2002). La reconnaissance du CTLA-4 par les DC favorise l'activité d'IDO. De plus, les Treg activés produisent de l'IFN- $\gamma$ , qui module la production d'IDO par les DC. L'expression constitutive de CTLA-4 par les Treg est impliquée dans leur capacité à maintenir la tolérance, au travers de leur activité sur les DC (Fallarino, Grohmann et al. 2003; Grohmann, Fallarino et al. 2003). Egalement, CTLA-4 est nécessaire à l'activité d'une autre molécule immunomodulatrice : le transforming growth factor (TGF)- $\beta$ . En effet, CTLA-4 est capable d'induire la différenciation des LT conventionnels de souris sauvages en Treg (Zheng, Wang et al. 2006).

Chez l'Homme, les LB activés par des CpG-ODN sont capables d'induire des Treg Foxp3<sup>+</sup>, des LT CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, ainsi que des LT CD4<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup>. De plus, L'IL-10 est impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , et le TGF- $\beta$  dans la limitation de la prolifération des LT. IDO peut également être produite par les LB activés *in vitro*. En association avec l'activité du TGF- $\beta$ , IDO amplifie l'inhibition de la prolifération des LT par les LB, possiblement au travers de l'induction de Treg. Enfin, le CTLA-4 est un acteur essentiel pour la production d'IDO par les LB, pour l'inhibition de la prolifération des LT, ainsi que pour l'émergence de Treg (Nouel, Pochard et al. 2015) (FIG. 7).

En conclusion, l'IL-10, IDO, le TGF- $\beta$  et le GrB représentent des facteurs solubles essentiels aux activités régulatrices que possèdent les LB. Egalement, les signaux perçus suite au contact cellulaire représentent une part importante du potentiel inhibiteur des Breg. En effet, CD40, CD80 et CD86 sont des molécules impliquées, parfois en association avec la sécrétion de cytokines, dans la régulation des réponses proliférative et inflammatoire T.

## B) Les signaux inducteurs d'interleukine 10 dans les lymphocytes B

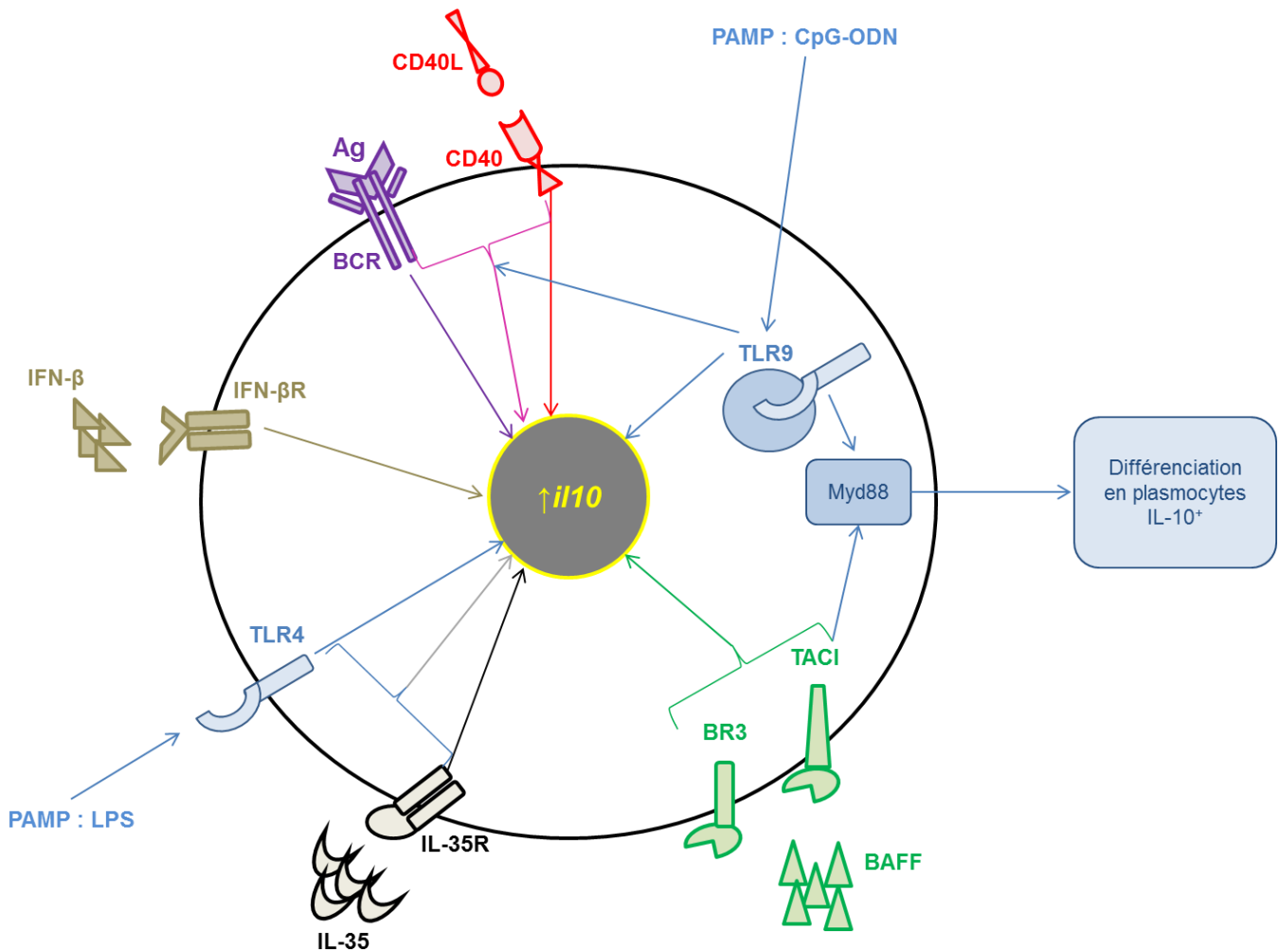
Parmi les LB spléniques CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> ont été identifiés des B10 et des proB10. Yoshizaki *et al.* ont élégamment démontré dans l'EAE que les LB CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> provenant de souris *il21r*<sup>-/-</sup>, *cd40*<sup>-/-</sup> ou *mhcII*<sup>-/-</sup>, transférés dans des souris *cd19*<sup>-/-</sup> immunisées avec MOG, ne sont pas capables de limiter la sévérité de la maladie en comparaison aux B10 et proB10 issus de souris sauvages (Yoshizaki, Miyagaki *et al.* 2012). En conséquence, la présentation antigénique, la reconnaissance de l'IL-21, le contact *via* l'interaction CD40/CD40L et les signaux de l'immunité innée semblent être des paramètres importants pour la production d'IL-10 et pour l'inhibition de la réponse inflammatoire T-dépendante.

### 1) L'interleukine 10 sous l'influence des signaux innés, du récepteur à l'antigène, de CD40 et des autres cytokines

#### *Les lipopolysaccharides et les motifs CpG-ODN*

Les types de *stimuli* et les réponses cellulaires qui en découlent influent sur l'expression et la production de l'IL-10. Certains motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) favorisent la différenciation des LB en plasmocytes et, par-là, la réponse humorale (Krieg 2007). Les LPS et les motifs CpG-ODN font partie des PAMPs, et la transduction des signaux suite à l'engagement de leurs récepteurs respectifs nécessite l'activité de la protéine adaptatrice Myd88. En 2011, Neves *et al.* ont étudié ces cellules productrices d'Ac au cours d'une infection bactérienne par *Salmonella typhimurium*. *Salmonella* induit des plasmocytes spléniques CD19<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>, et l'ARNm de l'IL-10 n'a pas été observé dans les cellules B CD138<sup>-</sup>. De plus, le nombre de plasmocytes ainsi que le niveau d'ARNm IL-10 sont diminués lorsque les LB n'expriment pas Myd88. Suite à une infection bactérienne, les LB nouvellement différenciés en plasmocytes produisent l'IL-10 impliquée dans la suppression de l'inflammation présente lors de la réponse innée, et ce sous l'influence de l'expression de Myd88 (Neves, Lampropoulou *et al.* 2010). Notons qu'en opposition à la souris, l'expression du TLR4 par les LB humains est quasi nulle, même après activation cellulaire. A l'inverse ils expriment le TLR9 (Bourke, Bosisio *et al.* 2003). Cette différence inter-espèces justifie l'utilisation plus fréquente des LPS pour stimuler les LB murins, et des

motifs CpG-ODN pour activer les cellules B humaines. Par exemple, stimuler les cellules B murines par des LPS et par l'IL-21 permet la sécrétion d'IL-10 (Yanaba, Bouaziz et al. 2008; Yoshizaki, Miyagaki et al. 2012) (FIG. 8).



**FIGURE 8 : De nombreuses voies de signalisation, croisées ou uniques, peuvent induire l'expression du gène *il10* dans les cellules B.** L'activation du BCR, de CD40, des TLR9/4, de l'IL-35R et de l'IFN-βR entraîne une production d'IL-10 par les LB. La « puissance » de cette induction semble dépendre des combinaisons de stimulations perçues par la cellule. Par exemple, une double stimulation par un Ac anti-IgM et CD40L est plus efficace qu'une stimulation simple du BCR pour induire l'IL-10. Les TLRs sont au centre de ces combinaisons et participent à l'amplification des signaux BCR, CD40, TACI et BR3. Enfin, Myd88 qui est indispensable à la transduction des signaux des voies TLR9/4, est impliquée dans la différenciation terminale en plasmocytes producteurs d'IL-10.

En outre, chez l'Homme, la différenciation *in vitro* de cellules B en plasmocytes sécréteurs d'IL-10 implique des étapes de stimulations spécifiques. De Masson *et al.* ont utilisé un protocole d'activation séquentiel avec des CpG-ODN, l'IL-15, l'IL-10, l'IL-2, l'IL-6, CD40L, et l'IFN- $\gamma$  (de Masson, Bouaziz *et al.* 2015).

### *L'engagement du CD40*

Les stimulations combinées par un Ac monoclonal anti-CD40 et des motifs CpG-ODN ont été montrées comme plus efficaces qu'une stimulation unique par CpG-ODN pour induire des B10 et proB10 (Iwata, Matsushita *et al.* 2011). Dans un modèle murin d'EAE induite par MOG, il a été montré que les souris sauvages irradiées puis reconstituées avec une moelle osseuse chimérique (80%  $\mu$ MT / 20% *cd40*<sup>-/-</sup>) n'entrent pas en rémission. Le contact cellulaire *via* l'interaction CD40/CD40L semble, en plus de la sécrétion d'IL-10, essentiel pour inhiber la réponse inflammatoire des LT (Fillatreau, Sweenie *et al.* 2002). Poe *et al.* ont étudié l'importance de la voie CD40 dans l'émergence des B10 en utilisant un modèle murin double-transgénique surexprimant *cd40l* et *cd22*<sup>-/-</sup>. L'absence de CD22 est responsable d'une hyperactivation des cellules B. Les LB *cd22*KO ont une prolifération aberrante suite à une stimulation de leur CD40. De plus, les deux types de souris *cd40l*-transgéniques ou *cd22*KO produisent des autoAc. Les auteurs ont observé que le nombre de B10 était particulièrement élevé dans les souris *cd40l*-transgéniques/*cd22*KO en comparaison aux souris uniquement *cd22*KO ou *cd40l*-transgéniques. Ces derniers étaient majoritairement CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup>, et leur transfert dans des souris sauvages limite le score de l'EAE induite par une immunisation par MOG. De plus, les souris *cd40l*-transgéniques/*cd22*KO ont une production plus faible d'autoAc IgG que celles *cd22*KO (Poe, Smith *et al.* 2011). Enfin, il a été démontré que l'engagement du CD40 favorise l'expression de l'IL-10 par les cellules B, suite à la phosphorylation de STAT3 (Blair, Norena *et al.* 2010) (FIG. 8).

### *L'engagement du récepteur d'antigène*

La majorité des modèles murins qui ont été utilisés pour évaluer l'importance de l'IL-10 dans la régulation B sont dépendants de l'Ag (FIG. 5). L'engagement du BCR est une des options qui a été envisagée pour induire la production d'IL-10, entre autre dans les LB de souris NOD (non-obese diabetic). Ces souris

développent un diabète de type 1 autoimmun orchestré par les LT, caractérisé par une destruction des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques produisant l'insuline. Il a été démontré qu'en présence de LT, les LB des souris NOD produisent plus d'IL-10 lorsqu'ils sont stimulés par un Ac anti-IgM. De plus, les souris NOD transfusées par des LB de souris NOD stimulés au niveau de leur BCR ont une incidence de la maladie plus faible que les souris NOD recevant des LB stimulés issus de souris NOD.*il10*<sup>-/-</sup> (Hussain and Delovitch 2007).

### *La cytokine BAFF et ses récepteurs*

Enfin, il a été récemment démontré chez l'Homme un rôle de la cytokine BAFF dans la production d'IL-10 par les LB. Saulep-Easton *et al.* ont remarqué qu'une stimulation par BAFF augmente la sécrétion d'IL-10 par les LB provenant de volontaires sains, ou bien de patients atteints de LLC. L'ajout d'Ac bloquants anti-TACI et anti-BAFF-R (récepteurs de BAFF) réduit la sécrétion d'IL-10 par les LB de témoins ou de patients LLC stimulés par BAFF et des CpG-ODN. De plus, les souris déficientes pour TACI et BAFF-R ne sécrètent que peu ou pas d'IL-10. Enfin, les souris KO pour TACI ne sécrètent pas d'IL-10 en réponse aux stimulations par des LPS, des CpG-ODN et par BAFF (Saulep-Easton, Vincent *et al.* 2015). Il est intéressant de noter que TACI, et les TLRs ont en commun la protéine adaptatrice Myd88 lors de la transduction des signaux initiée suite à leur engagement.

### *L'interleukine 35*

L'IL-35 est le dernier membre décrit de la famille des cytokines hétérodimériques IL-12. Elle est produite par les Treg naturels et participe à leur activité suppressive (Collison, Workman *et al.* 2007). Elle est composée d'une chaîne  $\beta$  Ebi3 (EBV induced gene 3) codée par le gène *il27b*, et d'une chaîne  $\alpha$  IL-12p35 codée par le gène *il12a*. L'IL-35 induit des LB producteur d'IL-10 capables d'inhiber la prolifération de LB non régulateurs. Les LB spléniques stimulés par des LPS deviennent compétent pour produire l'IL-35, mais l'IL-35 elle-même entraîne d'avantage la production d'IL-35 par les LB. De plus, les LB IL-35<sup>+</sup> sont particulièrement enrichis parmi les LB CD19<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>. En outre, le transfert adoptif de Breg induit avec de l'IL-35 recombinante dans des souris atteintes d'uvéite autoimmune permet d'améliorer le score de la maladie (Wang, Yu *et al.* 2014). Il a également été démontré que l'IL-35 peut être sécrétée après une stimulation du TLR4 et de CD40. (Shen, Roch *et al.* 2014).

## *Les cytokines interféron de type I*

De façon générale, les IFNs de type I sont décrits comme des acteurs de l'inflammation. Ces derniers induisent la production de BAFF, activent les LB et favorisent la production d'autoAc (Krumbholz, Faber et al. 2008; Kiefer, Oropallo et al. 2012). Malgré ces caractéristiques, l'IFN- $\beta$  est utilisé comme thérapie dans sclérose en plaque (SEP) (Panitch, Goodin et al. 2005). Paradoxalement, l'IFN- $\beta$  a montré un rôle protecteur de l'inflammation, notamment dans l'EAE où il altère les fonctions des LT (Liu, Carlsson et al. 2014). Schubert *et al.* ont tenté de préciser par quels mécanismes l'IFN- $\beta$  agit pour limiter l'inflammation présente dans le système nerveux central au cours de la SEP. Que ce soit chez les patients atteints de SEP traités par IFN- $\beta$  ou bien chez les témoins, il a été observé que le pourcentage de B10 était plus important parmi les LB Tr., que dans les LB matures ou mémoires. De plus, la stimulation par l'IFN- $\beta$  (en plus d'Ac anti-BCR, anti-CD40, et de CpG-ODN) augmente la sécrétion d'IL-10 par les PBMCs provenant de volontaires sains, en comparaison aux cellules qui n'ont pas reçu d'IFN- $\beta$ . Enfin, la présence des LB est nécessaire pour que le traitement par IFN- $\beta$  appliqué à des souris EAE soit efficace. En effet, l'absence de LB dans les souris  $\mu$ MT, ne permet pas d'observer la diminution de l'infiltrat de LT CD4<sup>+</sup> dans la moelle épinière, qui est vue dans les souris sauvages. La production d'IL-10 sous traitement par l'IFN- $\beta$  est largement dépendante de la présence des LB (Schubert, Hu et al. 2015) (FIG. 8).

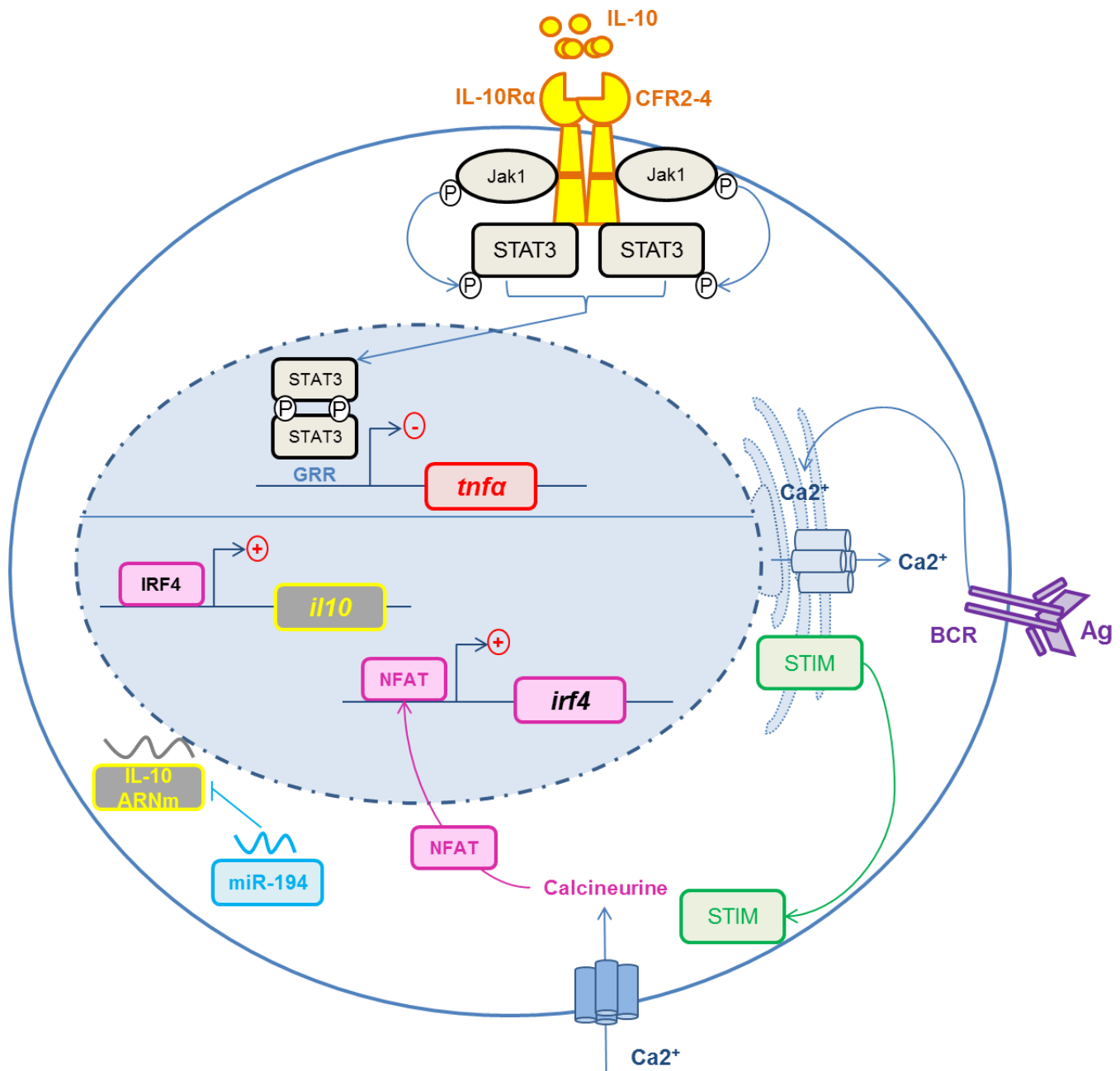
## **2) Les mécanismes moléculaires qui contrôlent la production et l'activité de l'interleukine 10**

L'IL-10 interagit spécifiquement avec un récepteur de surface, composé de deux sous-unités qui appartiennent à la famille des récepteurs cytokiniques de classe II (CRF2), dont font également partie l'IFN- $\gamma$ R et l'IFN- $\alpha$ R (Bazan 1990; Ho, Liu et al. 1993). Sont distinguées la sous-unité IL-10R $\alpha$  qui joue un rôle dans la liaison de forte affinité et la transduction de signal, ainsi que la sous-unité  $\beta$  (ou CRF2-4). Les cellules CRF2-4 déficientes répondent aux IFN de type I et II mais pas à l'IL-10. De plus, les souris déficientes pour CRF2-4 développent une colite chronique accompagnée d'une splénomégalie, et montrent un phénotype assimilable à celui des souris *il10*KO. Cette sous-unité  $\beta$  de l'IL-10R est donc un élément essentiel pour l'activité de l'IL-10, au travers de la transduction du signal qu'elle apporte (Spencer, Di Marco et al. 1998).

## *Transduction de signaux : la voie des kinases Jak/tyk et des facteurs de transcription STATs*

Lorsque des cytokines comme les IFNs et les interleukines engagent leurs récepteurs, il en découle l'activation de protéines tyrosine kinases de types Jak et tyk. L'activation de ces kinases est à l'origine de la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille STAT, qui transloquent de la membrane vers le noyau où ils se fixent sur les éléments « enhancer » des promoteurs de l'ADN. La majorité des protéines STATs forment des multimères et se fixent aux éléments « enhancer » GAS (IFN- $\gamma$  activation sequence) ou GRR (IFN- $\gamma$  response region) (Pearse, Feinman et al. 1991).

Dans les monocytes et les LT, il a été démontré que l'IL-10 induit la fixation d'un complexe (dont font partie STAT1 $\alpha$  et STAT3) sur la région GRR. Cette liaison est le résultat de la phosphorylation sur les tyrosines des protéines kinases tyk2 et Jak1 (Finbloom and Winestock 1995). Riley *et al.* ont démontré que les protéines STAT3 et Jak1 sont nécessaires pour la fonction anti-inflammatoire de l'IL-10. Les auteurs ont pré-traité des souris *stat3*<sup>-/-</sup> et *jak1*<sup>-/-</sup> avec de l'IL-10 avant d'en extraire les macrophages. Il a été observé qu'après une stimulation par des LPS, les macrophages de ces souris mutantes pour *stat3* et *jak1* n'inhibent pas leur production de TNF- $\alpha$ . A l'inverse, les macrophages de souris *stat1*<sup>-/-</sup> et sauvages sont capables d'inhiber leur production de TNF- $\alpha$  sous l'influence de l'IL-10. De plus, il a été constaté que la voie Jak/STAT est certes nécessaire pour observer l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10, mais qu'elle ne représente probablement pas le seul impératif. En effet, l'IL-6, dont l'activité dépend aussi de cette voie Jak/STAT, n'inhibe pas la production de TNF- $\alpha$  dans des lignées cellulaires de macrophages et de LB (Riley, Takeda et al. 1999). Enfin, l'IP-10 et l'ISG54 sont deux molécules induites lors de la réponse précoce à l'IFN- $\gamma$  et à l'IFN- $\alpha$ . Il a été démontré que l'IL-10 est capable d'inhiber l'induction de leur expression, en inhibant la phosphorylation des tyrosines de STAT1 qui se manifestent en présence d'IFN (Ito, Ansari et al. 1999) (FIG. 9).



**FIGURE 9 : Transduction de signal et contrôle de l'expression du gène *il10*.** Après liaison à son récepteur, l'IL-10 implique la phosphorylation de la kinase Jak1 puis du facteur de transcription STAT3. Ce dernier transloque dans le noyau et se fixe sur la région « enhancer » GRR, pour inhiber l'expression du gène codant TNF- $\alpha$ . L'engagement du BCR entraîne le relargage du calcium (Ca<sup>2+</sup>) contenu dans le réticulum endoplasmique. Cet effet conduit au déplacement des molécules « senseurs » STIMs à la membrane. Il en suit une entrée du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire qui permet à la calcineurine d'activer NFAT. Ce facteur de transcription induit l'expression d'*irf4* codant lui-même un facteur de transcription important pour la transcription du gène *il10*. Enfin, la traduction de l'ARNm IL-10 peut être inhibée par le micro-ARN non codant miR-194 (Harris-Arnold, Arnold et al. 2015).



En conclusion, il est intéressant de noter la dualité existante entre les cytokines de type IFN et l'IL-10. En effet, le récepteur de l'IL-10 est semblable à ceux des IFNs (Ho, Liu et al. 1993), et la structure de l'IL-10 est proche de celle de l'IFN- $\gamma$  (Savan, Ravichandran et al. 2009). Pour autant, l'IL-10 a un rôle anti-inflammatoire qui s'oppose à celui de l'IFN- $\gamma$ . L'effet de l'IL-10 repose probablement sur une compétition qu'elle exerce sur les autres cytokines, en limitant la phosphorylation des facteurs de transcription STATs communs aux voies pro et anti-inflammatoires.

### *Les senseurs du calcium*

La hausse du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire est une réponse majeure des cellules B suite à l'engagement du BCR. Elle conduit à l'activation de nombreux facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes (Feske 2007). L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol repose sur deux mécanismes principaux. Sont distingués : l'entrée du calcium extracellulaire traversant la membrane plasmique, et le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique (RE). Le second mécanisme nécessite l'activité des senseurs du calcium STIMs (stromal interaction molecules) 1 et 2, qui détectent la déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE (Oh-Hora, Yamashita et al. 2008). Matsumoto *et al.* ont démontré qu'une déficience en STIM1 et STIM2 altère la production d'IL-10 par les LB. De plus, il a été observé que les LB de souris déficientes pour les protéines STIMs ont un défaut de production d'IL-10 suite à une stimulation de leur BCR car ils ne sont pas capables d'activer NFAT (nuclear factor of activated T cells). Enfin, la production d'IL-10 par les LB dépendante des STIMs permet la suppression de l'EAE (Matsumoto, Fujii et al. 2011) (FIG. 9).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire incontournable dans l'activité régulatrice exercée par les Breg. Cependant, les populations qui sécrètent préférentiellement l'IL-10, comme les LB Tr. ou les LB  $\text{CD24}^{\text{forts}} \text{CD27}^+$ , sont parfois anormalement distribuées dans des pathologies allo ou autoimmunes. Dans le dernier chapitre de l'introduction qui suit, nous ferons une revue de la littérature concernant la répartition des populations de Breg en pathologie chez l'Homme.

## C) Lymphocytes B régulateurs et transitionnels en physiopathologie chez l'Homme

### 1) Breg et autoimmunité

#### *Le lupus érythémateux disséminé*

Le SLE est une maladie auto-immune complexe non spécifique d'organe. Le rôle important des cellules B autoréactives et hyperactivées dans la pathogénèse du SLE a été prouvé par le succès clinique du traitement par rituximab (Lipsky 2001).

Les cellules B provenant de patients atteints de SLE et activées par l'engagement de CD40 et du TLR9 sont défaillantes pour inhiber la prolifération des LT autologues en culture *in vitro* (Lemoine, Morva et al. 2011). Ce défaut intrinsèque de régulation ne semble pas provenir d'un défaut de réponse des LT de patients. En effet, Gao *et al.* ont observé que les LB de témoins activés par le super-Ag SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan 1) inhibent la prolifération des LT autologues, ainsi que celle de LT hétérologues de patients SLE. De plus, les LB activés des patients lupiques ne sont pas capables d'inhiber la prolifération des LT de volontaires sains (Gao, Dresel et al. 2014).

Les patients atteints de SLE ont des pourcentages de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> et de LB mémoires CD24<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> respectivement supérieur et inférieur à ceux des volontaires sains. Cependant, les cellules B Tr. de ces patients sont défaillantes pour inhiber la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Th1 producteurs d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . En amont, cette anomalie fonctionnelle s'explique par le fait que les LB Tr. des patients lupiques ne sécrètent que peu d'IL-10 suite à l'engagement de leur CD40. Cette non réponse est due à un défaut de phosphorylation de STAT3 (Blair, Norena et al. 2010) (FIG. 10).

Yang *et al.* ont distingué deux groupes de patients sur des critères cliniques, en considérant des patients ayant un lupus en phase active *versus* ceux qui souffrent d'un SLE inactif. Les auteurs ont observé que le pourcentage de LB CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> est augmenté dans les patients ayant un lupus actif, en comparaison aux témoins et aux patients ayant un SLE inactif. De plus, il a été détecté des infiltrats de LB IL-10<sup>+</sup> dans les tissus de

la peau des patients. Les LB CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> des patients souffrant d'un SLE actif produisent d'avantage d'IL-10 que ceux des patients avec un SLE en phase inactive. En parallèle de cette augmentation de cellules B au phénotype Breg, les patients SLE actif ont un pourcentage accru de Tfh circulants dans le sang, ainsi qu'une concentration plus forte d'IL-21 dans le serum, qui corrèle avec celle de l'IL-10. Enfin, lorsque les LB sont stimulés avec des surnageants de culture de Tfh de patients lupiques, ils sécrètent d'avantage d'IL-10 en comparaison à la condition où ils reçoivent des surnageants provenant d'une culture de Tfh de témoin (Yang, Yang et al. 2014).

### *La polyarthrite rhumatoïde*

La PR est associée à une perte de mobilité due à une atteinte articulaire. Le rôle des LB est crucial dans le développement de cette pathologie autoimmune, au travers de la production d'autoAc comme les facteurs rhumatoïdes et les Ac anti-protéines citrullinées (Kuhn, Kulik et al. 2006) .

Flores-Borja *et al.* ont étudié le comportement régulateur des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> dans les patients souffrant de PR. Il a été démontré en culture *in vitro* que les LB Tr. des patients inhibent la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les LT conventionnels CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> aussi efficacement que les LB Tr. de volontaires sains. En revanche, les cellules B Tr. des patients PR n'étaient pas efficaces pour limiter la différenciation des LT naïfs CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> en Th17 sécréteurs d'IL-17. En outre, les LB Tr. de patients ne sont pas capables d'inhiber la différenciation des LT mémoires (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) en Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ou en Th17. Notons aussi que les LB Tr. de témoins ne sont pas efficaces pour inhiber la différenciation des LT mémoires en Th17, mais sont capables d'induire plus de Treg Foxp3<sup>+</sup> que les LB Tr. des patients atteints de PR. Cette propriété régulatrice est encouragée par la sécrétion d'IL-10, mais ne semble pas, dans cette étude, faire intervenir le TGF- $\beta$ , ni un contact cellulaire *via* CD80/CD86. Il a été observé que les LT CD4<sup>+</sup> des patients souffrant de PR n'ont pas un défaut intrinsèque de réponse aux *stimuli* émis par les LB Tr. En effet, les LB Tr. des volontaires sains sont performants pour induire des Treg à partir de LT provenant des patients. Les auteurs ont séparé les patients de leur étude en deux groupes, suivant qu'ils souffrent de PR inactive ou active. Les patients ayant une PR active ont une fréquence des LB Tr. inférieure à ceux des patients avec une PR inactive. Les volontaires sains possèdent plus de

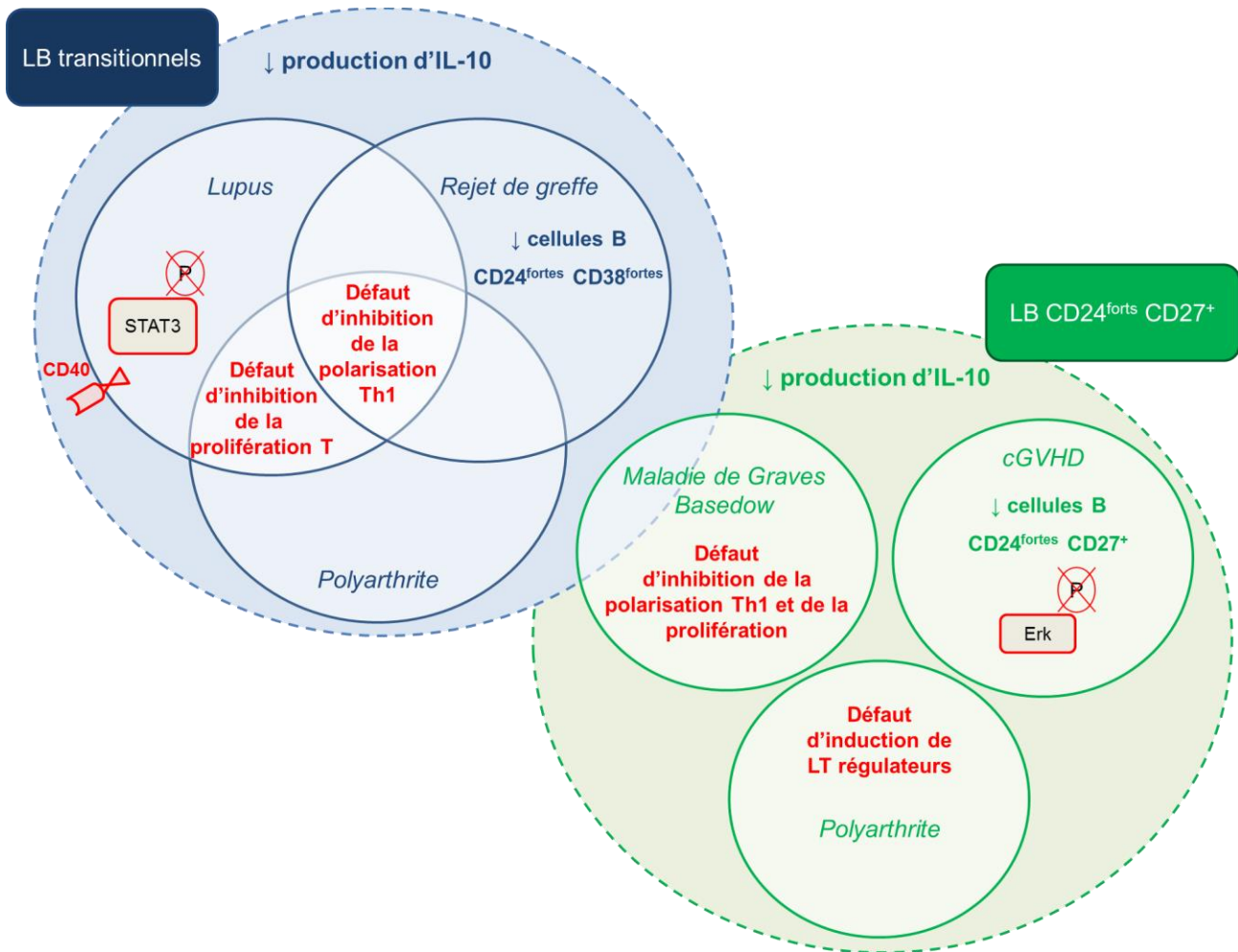
cellules Tr. que les patients avec une PR inactive, ce qui est balancé par une fréquence plus faible de LB CD24<sup>-</sup> CD38<sup>fortes</sup> de type plasmablastes. Il a été constaté que les patients atteints de PR ont un pourcentage réduit de LB CD1d<sup>fortes</sup> CD5<sup>+</sup> ainsi que de LB IL-10<sup>+</sup> en comparaison aux témoins. Enfin, il est intéressant de souligner que la fréquence des LB Tr. des patients est modifiée en fonction de l'activité de la maladie, d'autant qu'en parallèle d'une diminution des LB Tr. circulants dans le sang des patients, il a été vu une accumulation de LB Tr. dans le liquide synovial (Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

Daien *et al.* ont confirmé dans leur cohorte de patients PR le défaut qu'ont leurs LB à produire l'IL-10. Cependant, cette anomalie n'a pas été observée pour les patients ayant une PR depuis plus de cinq ans. Les auteurs ont statistiquement démontré que le taux de facteurs rhumatoïdes, ainsi que l'activité de la maladie sont inversement corrélés avec le pourcentage de B10. Dans cette étude, les pourcentages que représentent les populations de cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> et Tr. ont été observés comme similaires entre les témoins et les patients souffrant de PR. Enfin, il a été démontré que les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> ont, comme les LB Tr., la capacité d'induire des Treg à partir de cellules de volontaires sains. En revanche, aucune de ces deux populations n'est capable d'exercer cette propriété régulatrice dans les cultures faites avec des cellules de patients atteints de PR (Daien, Gailhac et al. 2014) (FIG. 10).

### *La maladie de Graves Basedow*

La maladie de Graves Basedow (GB) est une maladie autoimmune spécifique d'organe causée par une perte de tolérance immunologique à l'origine de la production d'autoAc dirigés contre les récepteurs de la thyroïdostimuline. Il en résulte une hyperthyroïdie, soutenue par des infiltrats de cellules T et B (Brent 2008). Zha *et al.* ont constaté que les patients atteints de GB ont moins de B10 que ceux étant en rémission. Les auteurs se sont concentrés sur l'étude des LB CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> décrits comme enrichis en proB10 et B10 (Iwata, Matsushita et al. 2011). Il a été observé qu'en comparaison aux patients en rémission et aux témoins, les patients nouvellement atteints par la maladie possèdent moins de LB CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup>. Isolée des volontaires sains, cette population est capable d'inhiber la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup> de façon IL-10 dépendante, ainsi que la prolifération de ces derniers de façon IL-10 indépendante. En revanche, les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> des

patients GB, qu'ils soient en rémission ou malades, ne sont pas capables d'inhiber la prolifération et la différenciation en Th1 des LT CD4<sup>+</sup> (Zha, Wang et al. 2012). Enfin, une autre équipe a observé que la stimulation des LB de patients GB par des thyroglobulines (autoAg) y augmentent le pourcentage de B10 (Kristensen, Hegedus et al. 2015) (FIG. 10).



**FIGURE 10 : Les populations de lymphocytes B régulateurs dans les pathologies auto et alloimmunes.** Les cellules B Tr. de patients atteints de SLE ont un défaut de production d'IL-10 et n'inhibent pas la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Th1, ce qui a aussi été observé dans le rejet de greffe rénale et la PR. De plus les LB Tr. des patients souffrant de PR et de SLE ne peuvent inhiber la prolifération des LT. La population enrichie en B10 CD24<sup>forte</sup> CD27<sup>+</sup> est également fonctionnellement altérée dans les pathologies où la tolérance est rompue. En effet, elle n'est pas capable d'inhiber la polarisation Th1 et la prolifération des LT de patients atteints de GB. De plus, dans la cGVHD, les LB ont un défaut de production d'IL-10 expliqué par un manque de phosphorylation d'Erk. Enfin, les cellules B régulatrices CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> ont un défaut d'induction de Treg dans les patients atteints de PR.

## 2) Breg et transplantation

### *Le rejet de greffe rénale*

Le rejet humoral chronique (cABMR : chronique antibody mediated rejection) est en premier lieu caractérisé par le développement d'Ac spécifiques du donneur ainsi que par des dommages histologiques, impliqués dans la perte de fonction du transplant. Nouël *et al.* ont démontré que les fonctions régulatrices des LB des patients qui développent un cABMR sont altérées. En effet, en comparaison aux témoins et aux patients stables, les cellules B des patients cABMR sont défailantes pour inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> en culture mixte autologue. De plus, les LB des patients qui rejettent le greffon ne sont pas capables d'inhiber la production de TNF- $\alpha$  et induisent la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT. En outre, les LB Tr. CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> sont largement sous représentés dans le cABMR. Il a été observé que les LB totaux de patients cultivés avec des LT autologues parviennent difficilement à atteindre une forte expression de CD24 et de CD38. A l'inverse, les pools lymphocytaires B des témoins et des patients stables sont capables au cours de la culture de modifier leur phénotype et s'enrichissent en cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> (Nouel, Segalen *et al.* 2014; Nouel, Simon *et al.* 2014) (FIG. 10 et annexe 1 = Nouel, Simon *et al.* 2014).

Cherukuri *et al.* ont confirmé que les LB Tr. sont quantitativement altérés dans le rejet de greffe rénale. En effet, les patients qui ont une dysfonction rénale mais qui ne font pas de rejet ont un pourcentage et un nombre absolu de LB CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> supérieurs aux patients qui ont développé un rejet. Les auteurs se sont intéressés à la production simultanée de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  par les LB, afin d'établir un ratio qui reflète la balance protection/inflammation. Ainsi, ils ont constaté que les cellules B stimulées de patients avec un rejet de greffe ont un ratio IL-10/TNF- $\alpha$  inférieur aux patients qui ne rejettent pas le transplant. De plus, les LB Tr. des patients qui ont déclenché un rejet n'inhibent pas la production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les LT conventionnels, mais inhibent l'expression d'IL-4. En conséquence, ils favorisent une différenciation en Th1 et empêche la réponse Th2. Il a été démontré que cette anomalie fonctionnelle n'est pas le résultat d'un défaut d'induction de Treg dans la culture. Enfin, les auteurs ont expliqué qu'utiliser le ratio IL-10/TNF- $\alpha$  (pour les LB Tr.) est une approche relevante pour

distinguer les patients avec une greffe stable des patients qui ont un rejet. Après un suivi de trois ans des patients avec une dysfonction rénale, il a été constaté qu'un ratio faible IL-10/TNF- $\alpha$  dans les LB Tr. n'est pas un bon pronostique, car il est associé avec une hausse de la créatinine et parfois à une perte du greffon (Cherukuri, Rothstein et al. 2014) (FIG. 10).

Les patients tolérants opérationnels possèdent d'avantage de LB Tr. en comparaison aux patients qui nécessitent un traitement immunosuppresseur pour tolérer leur rein transplanté (Newell, Asare et al. 2010). De plus, une anomalie de distribution qui touche les LB Tr. semble être un facteur qui favorise le développement d'un rejet de greffe aigu (Shabir, Girdlestone et al. 2015). Outre leur rôle essentiel dans le développement des cellules B et dans le contrôle de l'expansion de LB autoréactifs, les LB Tr. semblent avoir un rôle important dans la tolérance immunologique face à des alloAg.

### *La maladie chronique du greffon contre l'hôte*

La maladie chronique du greffon contre l'hôte (cGVHD) est une cause majeure de morbidité et de mortalité suite au transfert allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Si prévenir la cGVHD *via* le transfert adoptif de Treg et l'induction *in vivo* de Treg est une approche intéressante, le rôle des Breg dans la cGVHD demande à être compris (Brunstein, Miller et al. 2011; Di Ianni, Falzetti et al. 2011; Matsuoka, Koreth et al. 2013).

Khoder *et al.* ont constaté que les LB de patients qui ont développé une cGVHD produisent, après activation, moins d'IL-10 que les patients ayant reçu une greffe de cellules souches mais qui n'ont pas de cGVHD. Dans le but d'observer des différences significatives, les auteurs ont choisi d'établir un ratio % LT activés CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> / % LB activés IL-10<sup>+</sup>. Il a ainsi été constaté que ce ratio est supérieur pour les patients souffrant de cGVHD (Khoder, Sarvaria et al. 2014).

Dans la cGVHD, De Masson *et al.* ont démontré qu'en comparaison aux patients en rémission, ceux atteints d'une cGVHD active ont une induction plus faible de cellules B IL-10<sup>+</sup> après engagement du TLR9. Cette anomalie de production d'IL-10 après activation peut être en partie expliquée par le fait que les LB des patients

ayant une cGVHD ont un défaut de phosphorylation de la protéine Erk suite à une stimulation par des motifs CpG-ODN. Les auteurs se sont également intéressés à deux populations décrites pour être enrichies en B10 chez les volontaires sains : les plasmablastes et les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup>. Ils ont alors constaté que le pourcentage de cellules B IL-10<sup>+</sup> parmi les plasmablastes et les LB CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> sont diminués chez les patients souffrant d'une cGVHD active en comparaison aux patients en rémission (de Masson, Bouaziz et al. 2015) (FIG. 10).

Que ce soit dans les maladies autoimmunes ou dans les pathologies qui surviennent suite à une transplantation, le potentiel régulateur du compartiment lymphocytaire B est altéré. Ce constat est le reflet d'anomalies fonctionnelles et quantitatives qui impliquent les populations enrichies en B10 et proB10 (FIG. 10).

## **Conclusion générale de l'introduction**

Les modèles murins de pathologies autoimmunes ont permis de mettre en évidence l'importance des cellules B régulatrices de l'inflammation *via* la production d'IL-10. Ce rôle des LB dans la tolérance immunologique a été attribué à des populations cellulaires particulières. Ainsi, chez la souris, les LB T2-MZP, CD1d<sup>forts</sup> CD5<sup>+</sup> et les plasmablastes sont considérés comme des cellules régulatrices de la réponse inflammatoire orchestrée par les LT. Chez l'Homme, la population des LB Tr. a un rôle central dans la tolérance périphérique, ainsi que dans le développement et le contrôle de la maturation des cellules B. Elle est essentiellement décrite comme composée de deux sous-populations. D'abord, les LB T1 immatures sont sensibles à la sélection négative et peuvent répondre aux signaux innés avant de se différencier pour engager une réponse humorale rapide. Ensuite sont décrits les LB T2 précurseurs du pool B mature, qui semblent être impliqués dans l'émergence de l'autoréactivité observée dans les pathologies autoimmunes où les taux de BAFF sont élevés. Enfin, une troisième sous-population composée de LB T3 a été évoquée. D'après les données récoltées chez l'Homme jusqu'ici, elle semble plutôt appartenir à une population de LB matures exprimant faiblement l'IgM de surface. De façon générale, la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> semblent être importante pour le maintien de la tolérance périphérique, notamment après une transplantation rénale, tandis que leur nombre est augmenté dans certaines



maladies autoimmunes. Fonctionnellement, les LB Tr. de volontaires sains sont capables de réguler la réponse des LT CD4<sup>+</sup>, en inhibant leur prolifération, en induisant des Treg et en limitant leur différenciation en LT IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. Ces fonctions sont à associer avec la capacité qu'ont les LB Tr. à produire la cytokine anti-inflammatoire IL-10. D'autres populations cellulaires B humaines sont compétentes pour sécréter l'IL-10 comme par exemple les LB CD24<sup>forts</sup> CD27<sup>+</sup> et les plasmocytes. Ce potentiel sécréteur est encouragé par des signaux exogènes comme ceux apportés par les ligands des TLRs ou par des Ag. D'ailleurs, la majorité des travaux initiaux sur le potentiel régulateur des LB a été réalisée sur des modèles physiopathologiques murins dépendants d'un Ag. Il est important de considérer l'effet synergique de ces signaux pour l'induction de l'expression du gène *il10*. Cette expression est influencée par le microenvironnement moléculaire viral et bactérien, mais elle l'est aussi par le microenvironnement cellulaire endogène, puisque d'autres types cellulaires modulent la production d'IL-10 dans les cellules B. Au-delà du rôle central de l'IL-10, des mécanismes de régulation indépendants de cette cytokine ont été décrits. Ces derniers reposent sur d'autres molécules immunorégulatrices ainsi que sur le contact cellulaire. Enfin, il est essentiel de considérer l'hétérogénéité cellulaire de la population B CD24<sup>forte</sup> CD38<sup>forte</sup>, afin de mieux comprendre le développement des LB humains ainsi que les fonctions régulatrices qu'elle présente. Il est aussi probable que certaines populations cellulaires rares aient un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance. La bioinformatique est l'une des solutions d'avenir pour identifier des populations cellulaires rares ayant un possible potentiel régulateur (annexe 2 = Q. Simon, S.Hillion. Regulatory B cells. Translational immunology : mechanisms and pharmacologic approaches, Section A, Chapter 9 (2016)).

# **RESULTATS**

## **I. Les lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> : une population régulatrice hétérogène et complexe**

Les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> représentent une population cellulaire modifiée qualitativement et quantitativement dans les pathologies autoimmunes. Elle se situe à un stade de développement clef dans la tolérance périphérique ainsi que dans le contrôle de la maturation des LB. Les cellules B Tr. ont été décrites comme étant impliquées dans le contrôle de l'inflammation, mais les similitudes fonctionnelles et phénotypiques entre les LB Tr. et les Breg restent à éclaircir. Pour ce travail, nous avons émis l'hypothèse que la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> est composée de plusieurs sous-populations qui ont des propriétés régulatrices différentes. Afin d'évaluer l'hétérogénéité de la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, nous avons réalisé des analyses bioinformatiques sur des données multiparamétriques de cytométrie en flux, obtenues à partir d'échantillons de volontaires sains. Puis, après avoir identifié différentes sous-populations de LB Tr. au travers d'un phénotype caractéristique, nous avons réalisé des tests fonctionnels afin de les caractériser. Nous avons étudié les réponses cellulaires de chacune des sous-populations identifiées, face à l'engagement du BCR (survie, anergie), et du TLR9 (différenciation, production d'Ac). La dernière partie de ce travail se consacre à l'étude des fonctions régulatrices des LB Tr. Du fait de l'hétérogénéité cellulaire des cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup>, nous avons souhaité déterminer quelle(s) sous-population(s) de LB Tr. possède(nt) un potentiel régulateur. Suite à des tris cellulaires *ex vivo* de chacune de ces sous-populations, nous les avons cultivées *in vitro* avec des LT autologues de volontaires sains. Ces cultures nous ont permis d'évaluer l'impact des LB Tr. sur la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> ainsi que sur leur polarisation en Th1. Cette étude est conclue par une analyse bioinformatique descriptive de la distribution des sous-populations de LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> dans des pathologies autoimmunes.

*Cette étude fait l'objet d'un article publié dans « Journal of Allergy and Clinical Immunology »*

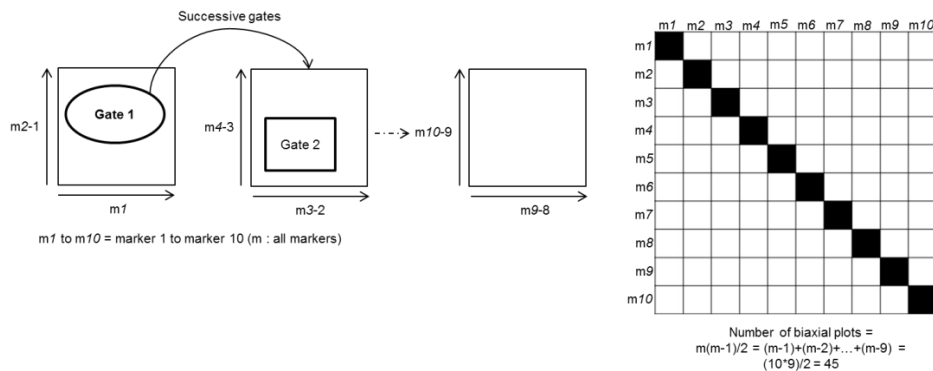
*(Simon, Pers et al. 2015)*

*(Article présenté en annexe 3)*

## A) Phénotypes des lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>

### 1) Matériel et méthode : analyse bioinformatique avec le programme FLOCK (FLOW Clustering without K)

Une approche informatique pour analyser des données multidimensionnelles de cytométrie en flux est utile pour remplacer une sélection manuelle des populations cellulaires, qui est basée sur la visualisation de l'expression d'un ou deux marqueurs par étape. Si l'on considère l'analyse manuelle d'un fichier comprenant des données pour de multiples marqueurs, l'utilisateur doit en premier lieu sélectionner un ou deux marqueurs parmi l'ensemble. Ainsi, le nombre de représentations biaxiales possibles correspond à :  $m(m-1)/2$  avec  $m$  = nombre de marqueurs. Dans cette étude, nous avons utilisé 10 marqueurs (Table 2), ce qui nous offrait  $(10*9)/2 = 45$  possibilités de représentations pour débiter notre analyse et cela pour chacun des échantillons (FIG. 11).



**FIGURE 11 : Procédure manuelle pour la sélection de populations cellulaires à partir de données multiparamétriques de cytométrie en flux. Exemple pour 10 couleurs.**

Pour surmonter ces difficultés techniques, nous avons utilisé un algorithme (FLOCK) qui permet de créer toutes les combinaisons biaxiales possibles de façon automatisée. Cette méthode est particulièrement performante pour comprendre l'hétérogénéité cellulaire d'un échantillon ainsi que pour quantifier les populations identifiées. De plus, FLOCK permet de comparer différents échantillons entre eux, en croisant l'analyse des fichiers afin de standardiser et d'empêcher les variations inter-analyses, notamment entre les patients et les contrôles. En outre, cette méthode automatisée permet, en plus de celles abondantes, la visualisation de populations cellulaires rares (Qian, Wei et al. 2010).

**Table 2 : Liste des Ac couplés à des fluorochromes utilisés pour l'analyse 10-couleurs de cytométrie en flux.**

Specificity	Clone	Fluorochrome	Functions
CD19	J3-119	APC-AF700	Lineage
CD21	BL-13	PB	Signal transduction
CD32	2E1	KO	
CD10	ALB1	PE	B cell growth
IgD	IA6-2	APC	Humoral response
IgM	SAD4	FITC	
CD27	1A4CD27	PE-Cy7	Memory
CD38	LS198-4-3	PE-Cy5.5	Prolifération
CD24	ALB9	APC-AF750	Prolifération
CD5	BL1a	ECD	Signal transduction, Activation

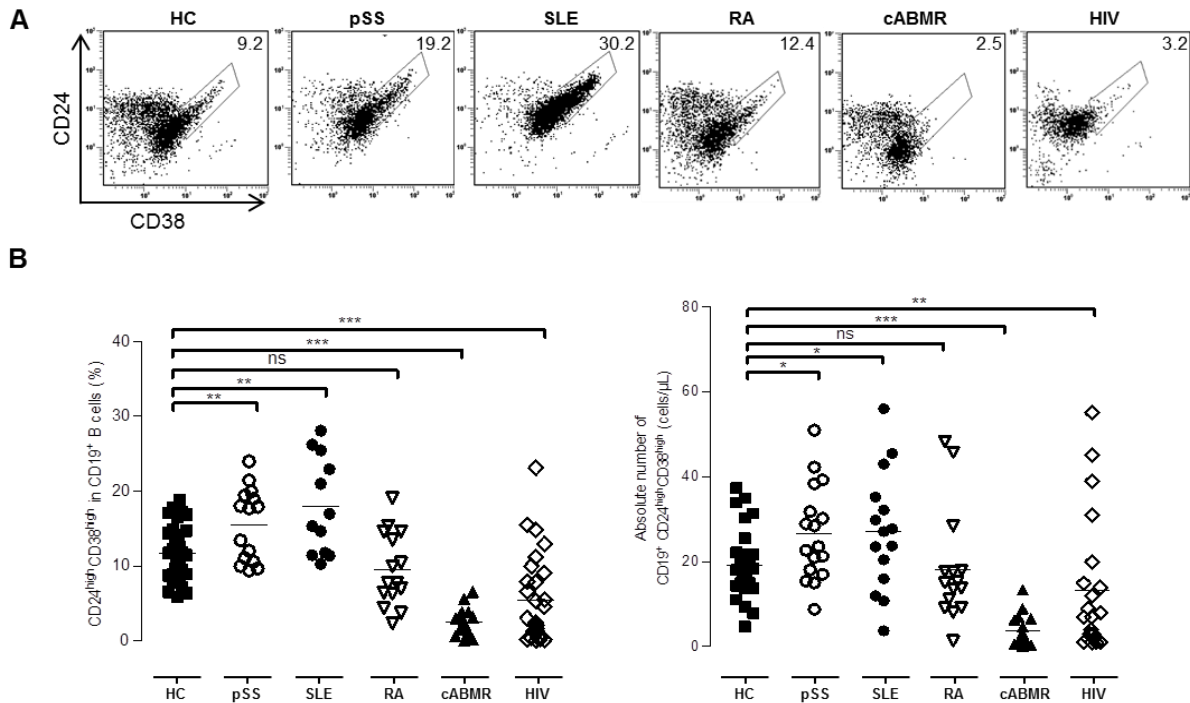
**Abbreviations:** AF: Alexa fluor; APC: Allophycocyanin; Cy: Cyanine; ECD: PE-Texas Red; FITC: Fluorescein isothiocyanate; PB: Pacific blue; PE: Phycoerythrin; KO: Krome orange.

Avant d'entamer une analyse bioinformatique par FLOCK, nous avons procédé à l'étude « conventionnelle » du pourcentage de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> totaux à partir de sang total de patients atteints de diverses pathologies.

## 2) Identification et caractérisation des lymphocytes B transitionnels

Il est décrit dans la littérature que le pourcentage de LB Tr. est augmenté dans les patients atteints de lupus en comparaison aux volontaires sains (Blair, Norena et al. 2010).

## Les lymphocytes B transitionnels dans différentes pathologies

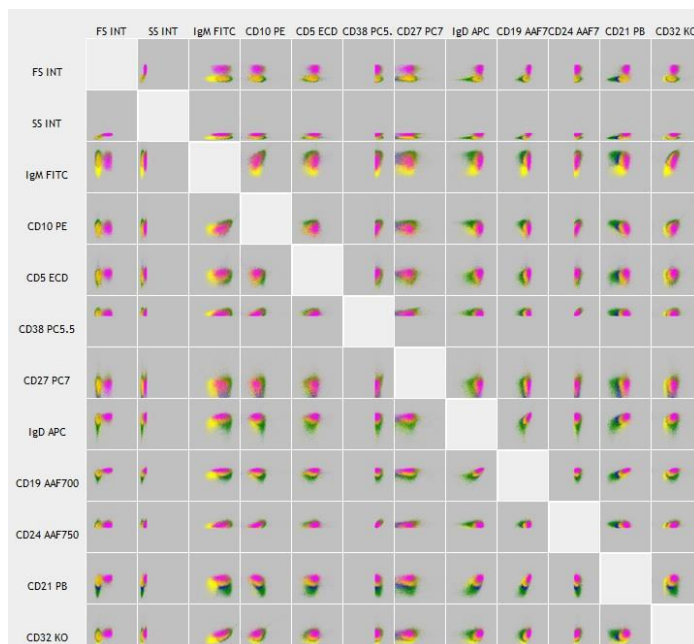


**FIGURE 12 : Comparaison des lymphocytes B transitionnels  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  entre les témoins et les patients.** A) Représentations biaxiales (dotplots) de l'expression de CD24 et de CD38 par les LB de patients et d'un témoin. Le pourcentage des LB Tr. parmi l'ensemble des cellules B  $CD19^+$  est noté au-dessus des gates. B) Pourcentages et nombres absolus des LB Tr. Abréviations : healthy controls (HC), primary Sjögren syndrom (pSS), systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), chronic antibody mediated rejection (cABMR), human immunodeficiency virus (HIV).

Nous avons observé que les pourcentages et nombres absolus des LB Tr. sont augmentés chez les patients atteints de SLE et de pSS en comparaison aux témoins. Cette augmentation n'a pas été observée pour les patients souffrant de RA. A l'inverse, les patients qui ont développé un rejet humoral chronique ainsi que ceux qui se trouvent dans une phase active d'infection par HIV ont un nombre de cellules B Tr. drastiquement diminué (FIG. 12 A et B). La population des LB Tr.  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  est donc sensible aux modifications physiopathologiques et répond différemment en fonction du contexte de la maladie. A partir de ces informations, nous proposons un postulat de départ, suivant lequel la population des LB Tr. est hétérogène, et composée de sous-populations aux fonctions différentes.

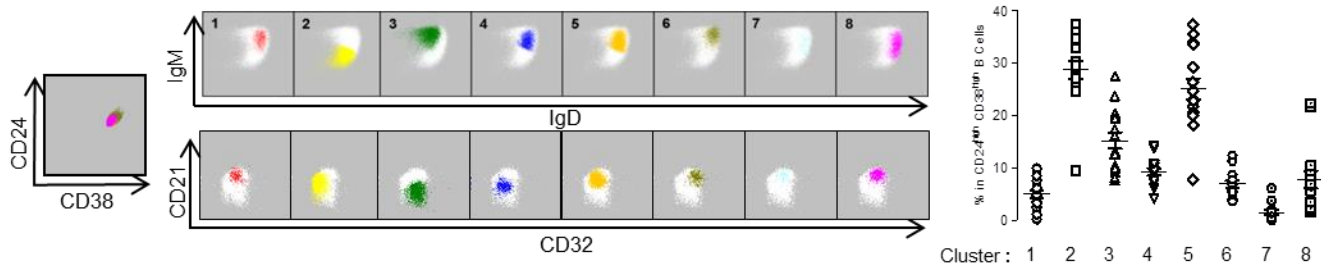
## Identification de quatre populations de lymphocytes B transitionnels $CD24^{forts}$ $CD38^{forts}$ via FLOCK

Notre étude débute réellement par une analyse bioinformatique FLOCK qui vise à déterminer sans *a priori* la composition et l'hétérogénéité de la population cellulaire  $CD19^+$   $CD24^{forte}$   $CD38^{forte}$ . Nous avons sélectionnés 10 protéines membranaires : CD19, CD24, CD38, CD10, CD5, CD21, CD32, l'IgM, l'IgD et CD27. L'analyse automatisée par FLOCK a permis l'identification de 8 clusters (groupes de cellules ayant une expression similaire des 10 marqueurs) parmi les LB Tr.  $CD24^{forts}$   $CD38^{forts}$  (FIG. 13). Elle a été réalisée sur 15 échantillons de volontaires sains.



**FIGURE 13 : Représentation par FLOCK des clusters qui composent la population des LB transitionnels.** Matrice représentative de toutes les combinaisons possibles entre les 10 marqueurs. Chaque couleur correspond à un cluster.

Cette première analyse a mis en évidence les clusters 2 ( $28.7\% \pm 6.7$ ), 3 ( $15.2\% \pm 6$ ) et 5 ( $25\% \pm 7.8$ ) qui sont majoritaires (FIG. 14). A titre d'exemple, nous pouvons observer que le cluster 3 (vert) exprime plus fortement l'IgM que le cluster 2 (jaune). Egalement, nous observons des différences sur le stade de maturation des clusters. Par exemple, le cluster 5 (orange) exprime plus CD21 que le cluster 3 (FIG. 14 panel de gauche).

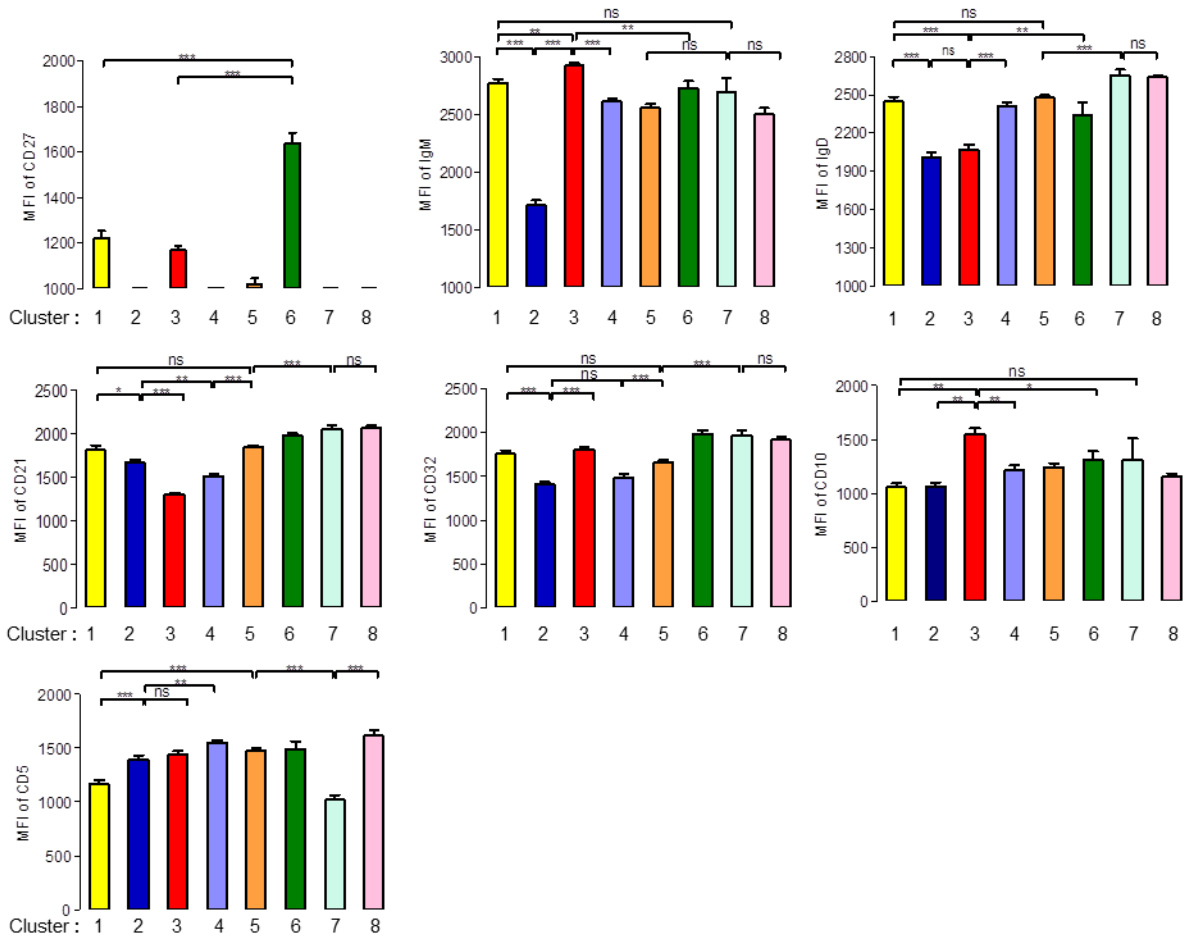


**FIGURE 14 : La population des lymphocytes B transitionnels peut être séparée en de multiples sous-populations.** Analyse FLOCK de l'expression de 10 marqueurs aboutissant à l'identification de 8 clusters différents parmi les LB Tr.  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  préalablement sélectionnés. Sont représentés à titre d'exemple les dotplots pour les combinaisons de marqueurs IgD/IgM et CD32/CD21 choisis dans la liste suivante : IgM, IgD, CD19, CD24, CD38, CD27, CD32, CD10, CD21 et CD5. A droite, le pourcentage de chacun des clusters est affiché pour 15 volontaires sains.

*L'expression différentielle de l'IgM, de l'IgD et de CD27 permet de distinguer quatre sous-populations de lymphocytes B transitionnels*

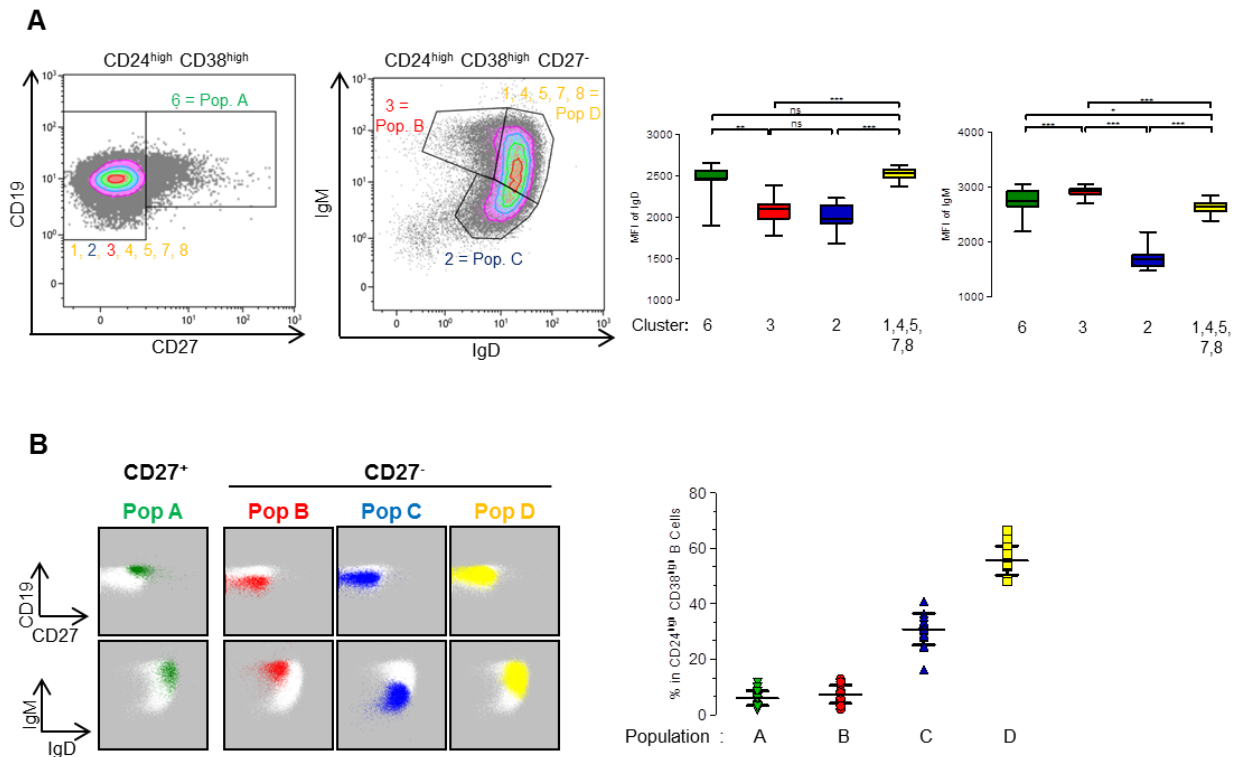
En se plongeant dans l'expression des 10 marqueurs nous avons observé des différences majeures. Le cluster 6 se distingue des autres par une expression significative de CD27 (IMF :  $1639 \pm SD 181$ ). Le cluster 2, qui est un groupe majoritaire en pourcentage ( $28,66\% \pm SD 6.68$ ) (FIG. 14 droite), se détache avec un phénotype  $IgM^{faible} IgD^{faible}$  (FIG. 15). Le cluster 3 ( $15,18\% \pm SD 6.02$ ), est remarquable par sa forte expression de l'IgM et est  $IgD^{faible}$ . Enfin, les autres clusters 1, 4, 5, 7 et 8 sont  $IgM^+ IgD^+$  (FIG. 15).





**FIGURE 15 : Expression de CD27, CD21, CD32, CD10, CD5, de l'IgM et de l'IgD par les 8 clusters de cellules B CD19<sup>+</sup> CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup>. IMF (intensité moyenne de fluorescence) de chacun des marqueurs (n=15).**

Chaque cluster est unique pour au moins une expression des 10 marqueurs utilisés. Cependant, même si les écarts d'IMF entre les différents clusters pour CD21, CD32, CD10 et CD5 sont parfois significatifs, ces marqueurs ne permettent pas de séparer certains clusters. Par exemple, le n°7 se distingue du cluster 8 par une IMF plus faible de CD5, alors que les expressions de CD21, CD32 et CD10 y sont similaires. La FIGURE 15 montre que les marqueurs IgD, IgM et CD27 sont ceux qui ont la plus forte variabilité d'expression entre les groupes. Nous les avons donc choisis pour poursuivre notre analyse.



**FIGURE 16 : Stratégie de regroupement des clusters pour former 4 sous-populations distinctes.** A) Séparation manuelle des populations de LB Tr. en fonction de l'expression de CD27, puis de l'IgD et de l'IgM. Sur la droite sont représentées les MFI de l'IgD et de l'IgM dans chacun des 4 groupes obtenus après rassemblement des clusters ayant un phénotype proche. B) Dotplots représentatifs d'une seconde analyse FLOCK orientée pour obtenir les 4 populations présentées en A. Sur la droite, le graphique montre les pourcentages que représentent les populations A, B, C et D parmi les LB Tr. (n=15).

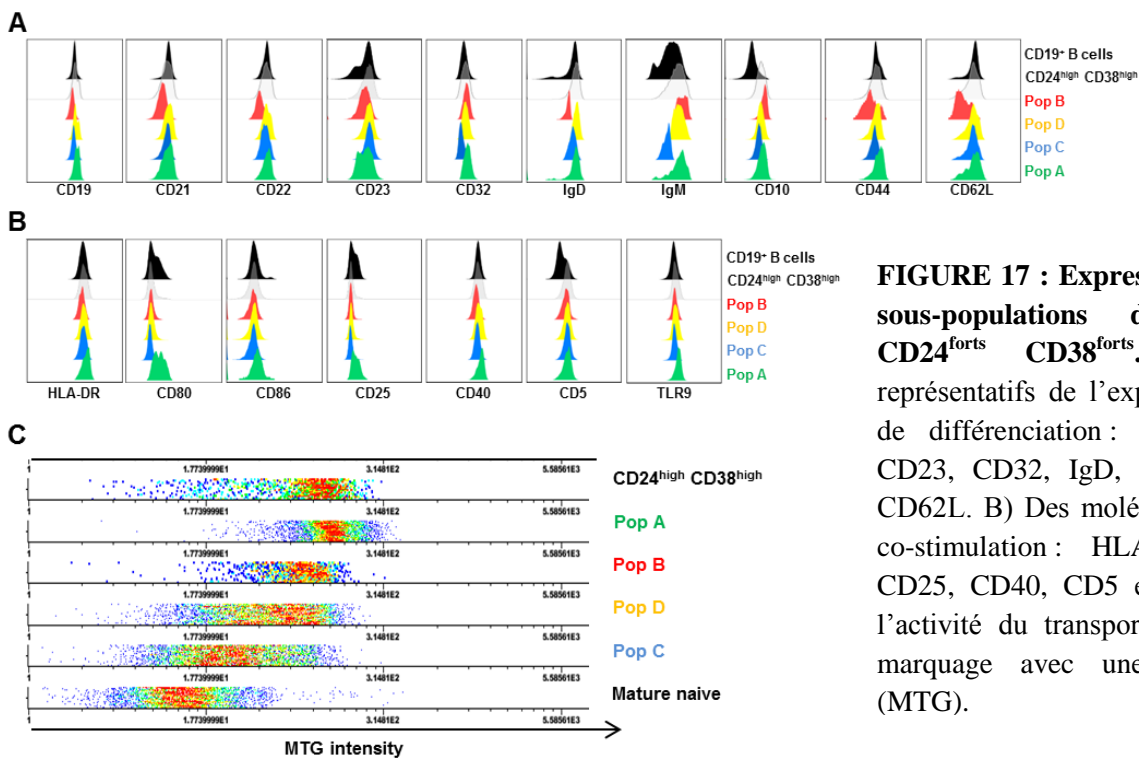
Les marqueurs IgD, IgM et CD27 étant les marqueurs les plus discriminants pour la séparation des clusters, nous avons fait le choix de les utiliser pour regrouper les clusters qui ont un phénotype proche dans des populations plus conséquentes. Ainsi, nous avons défini le cluster 6 qui est le seul à exprimer CD27 comme la population A (Pop A). Le cluster 3 est aussi le seul à exprimer faiblement l'IgD et fortement l'IgM. Nous l'avons donc nommé Pop B. Le cluster 2, quant à lui, contient des cellules qui expriment faiblement l'IgM et a été considéré comme la Pop C. Enfin, les clusters 1, 4, 5, 7 et 8 sont tous CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> et ont été regroupés dans une seule population, la Pop D (FIG. 16 A).

Ensuite, nous avons réalisé une seconde analyse FLOCK, en orientant les paramètres afin d'obtenir la séparation des 4 populations (FIG. 16 B). Les résultats de l'analyse croisée entre les 15 échantillons de volontaires sains montrent une bonne reproductibilité, et il a été observé que les populations A et B sont minoritaires (<10% des LB Tr.) en comparaison aux Pop C et D.

Après avoir simplifié la première analyse d'identification des sous-populations de LB Tr.  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  nous avons procédé à une étude approfondie de l'expression d'autres protéines membranaires.

### Phénotype approfondi des sous-populations de lymphocytes B transitionnels

Nous avons souhaité approfondir le phénotype des quatre populations de LB Tr., en étudiant l'expression de marqueurs de différenciation et d'activation. Nous avons utilisés les Ac anti-CD19, anti-CD24, anti-CD38, anti-IgD, anti-IgM et anti-CD27 répertoriés en Table 2 afin de séparer les différentes sous-populations de LB Tr. Nous avons ajouté à cette liste d'autres Ac qui nous permis d'étudier l'expression de nombreux marqueurs par cytométrie en flux présentés ci-dessous.



**FIGURE 17 : Expression protéique par les sous-populations de lymphocytes B  $CD24^{forts} CD38^{forts}$ .** A) Histogrammes représentatifs de l'expression des marqueurs de différenciation : CD19, CD21, CD22, CD23, CD32, IgD, IgM, CD10, CD44 et CD62L. B) Des molécules d'activation et de co-stimulation : HLA-DR, CD80, CD86, CD25, CD40, CD5 et TLR9. C) Etude de l'activité du transporteur ABCB1 après un marquage avec une sonde Mitotracker® (MTG).

La Pop A se caractérise par une faible expression de CD21, de CD44, de CD62L et est CD10<sup>forte</sup>. Ce phénotype permet d'assimiler cette Pop A aux LB T1 immatures (Sims, Ettinger et al. 2005). La Pop B est CD21<sup>forte</sup> CD23<sup>forte</sup> et exprime CD10 plus faiblement que la Pop A. La Pop B a un phénotype proche des LB T2 (Suryani, Fulcher et al. 2010). La Pop C se détache des autres populations car elle présente un faible niveau de CD32, de CD10 et d'IgM (FIG. 17 A). Nous avons alors nommé la Pop C comme LB T3. De plus elle a la particularité d'être dans un état inactivé puisqu'elle exprime peu CD40 et HLA-DR (FIG. 17 B). Enfin, la Pop D CD27<sup>+</sup> est surtout remarquée par sa forte expression des marqueurs d'activation CD25, CD40 et HLA-DR. Notons qu'elle a aussi de forts taux de CD80 et CD86 à la membrane (FIG. 17 B).

L'activité du transporteur ABCB1 permet de distinguer les cellules B matures naïves des cellules B mémoires CD27<sup>+</sup> et transitionnelles. L'utilisation de la sonde MTG permet de mesurer cette activité. Lorsque la cellule marquée possède une fluorescence positive pour cette sonde, elle n'a pas d'activité du transporteur ABCB1. Ainsi, il a été décrit que les LB mémoires et transitionnels n'ont pas d'activité du transporteur car la sonde MTG fluoresce dans ces cellules (Wirhth and Lanzavecchia 2005). Nous avons observé que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> (Pop D) ont un transporteur ABCB1 inactif, avec une forte intensité de fluorescence du MTG, ce qui les rapproche d'un phénotype mémoire. Enfin, nous pouvons remarquer que la fluorescence du MTG est décroissante du stade LB T1 (Pop B) vers LB T3 (Pop C). Ce résultat pourrait laisser supposer une maturation progressive entre les stades LB T1, LB T2 et LB T3. Enfin, l'intensité du MTG est nulle dans les LB matures (FIG. 17 C).

D'après toutes ces informations apportées sur le phénotype des sous-populations de LB Tr. nous avons fait un bilan présenté en Table 3.

Population	Phenotype		B-cell subset
Pop A	CD19 <sup>++</sup> , CD80 <sup>++</sup> , CD86 <sup>++</sup> , CD25 <sup>++</sup> and CD40 <sup>++</sup> No ABCB1 transporter activity (MTG <sup>++</sup> )	Activated memory	CD27 <sup>+</sup> transitional
Pop B	CD10 <sup>++</sup> , IgM <sup>++</sup> IgD <sup>low</sup> , CD21 <sup>low</sup> , CD44 <sup>low</sup> , CD62L <sup>low</sup> and MTG <sup>+</sup>	Immature	T1
Pop D	IgD <sup>+</sup> , IgM <sup>+</sup> and CD10 <sup>+</sup> CD21 <sup>++</sup> , CD23 <sup>++</sup> and MTG <sup>+</sup>	Intermediate	T2
Pop C	IgM <sup>low</sup> , IgD <sup>low</sup> , CD10 <sup>low</sup> , MTG <sup>low</sup> HLA-DR <sup>low</sup> and CD40 <sup>low</sup>	Resting state	T3

**Table 3 : Tableau récapitulatif des phénotypes observés pour les sous-populations de lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>.**

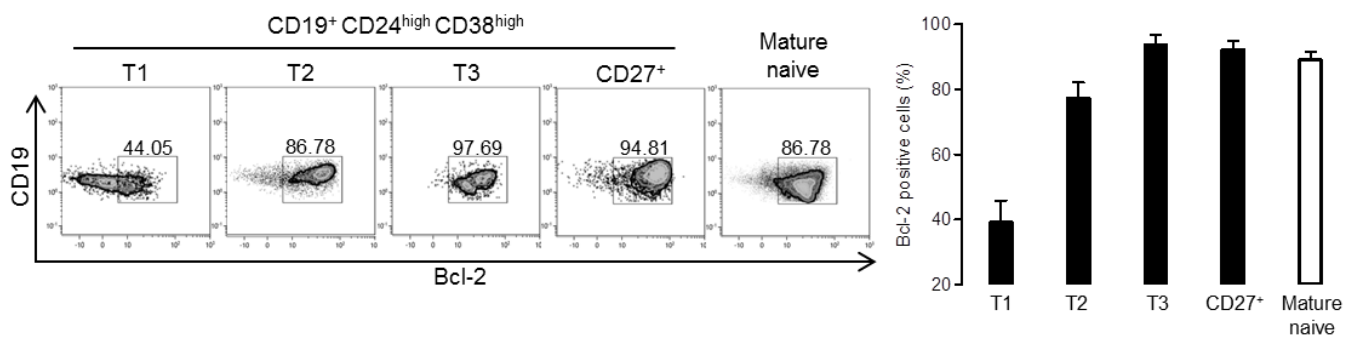
Nous avons identifié la pop A, qui a un phénotype de cellules B mémoires activées, que nous nommons CD27<sup>+</sup> Tr. La pop B regroupent des cellules immatures de type LB T1. La pop D représente un stade intermédiaire de maturation, et est appelée LB T2. Enfin, la pop C se trouve dans un état de « silencieux », et correspond aux LB T3.

Une fois la distinction phénotypique des 4 sous-populations de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> faite, nous avons ensuite souhaité déterminer les particularités fonctionnelles de chacune d'entre-elles.

## B) Fonctions des lymphocytes B transitionnels CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>

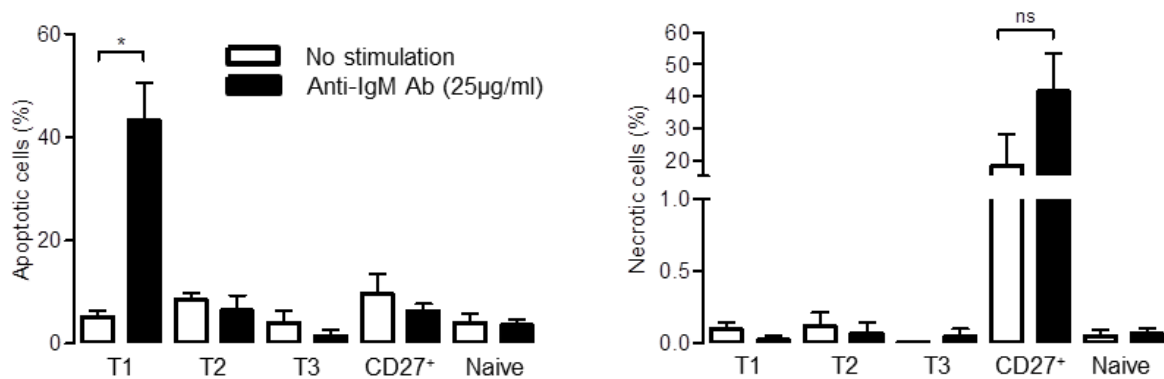
### 1) Potentiel de survie des lymphocytes B T1, T2, T3 et CD27<sup>+</sup>

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est décrite pour être faiblement exprimée par les cellules B immatures (Sims, Ettinger et al. 2005). Les LB T1 ayant un phénotype de cellules immatures, nous avons analysé l'expression de Bcl-2 par cytométrie en flux, dans les sous-populations de LB Tr.



**FIGURE 18 : Expression basale de Bcl-2 par les lymphocytes B transitionnels T1, T2, T3 et CD27<sup>+</sup>.**

Le pourcentage de cellules Bcl-2<sup>+</sup> parmi les LB T1 est drastiquement diminué en comparaison aux LB T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> (FIG. 18). Les LB T1 immatures qui expriment faiblement la molécule anti-apoptotique Bcl-2 ont été décrits comme des cellules qui entrent en apoptose suite à l'engagement de leur BCR (Sims, Ettinger et al. 2005; Suryani, Fulcher et al. 2010). Nous avons souhaité vérifier cette propriété fonctionnelle en réalisant des stimulations avec des Ac anti-IgM sur des LB purifiés. Après 8h de stimulation, nous avons étudié l'apoptose et la nécrose des sous-populations par cytométrie en flux. Les cellules Annexin V<sup>+</sup> Draq7<sup>+</sup> (sonde de l'ADN fragmenté) sont considérées comme nécrotiques, tandis que les LB Annexin V<sup>+</sup> Draq7<sup>-</sup> sont en apoptose. En plus des marquages par l'Annexin V et le Draq7, nous avons utilisés des Ac anti-CD24, anti-CD38, anti-IgD, anti-IgM et anti-CD27 afin de séparer les sous-populations de LB Tr. (FIG. 19).



**FIGURE 19 : L'engagement du BCR induit la mort des LB T1 tandis que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> meurent en culture *in vitro*.** Expression de Bcl-2 par les LB T1, T2, T3, Tr. CD27<sup>+</sup> et matures naïfs. B) Etude de l'apoptose et de la nécrose des sous-populations de LB Tr. après 8h de culture avec ou sans stimulation par un Ac anti-IgM. n=4, tests statistiques de Mann-Whitney.

Nous avons constaté que les LB T1 définis selon nos critères phénotypiques entrent en apoptose suite à l'engagement du BCR. De plus, les LB Tr. CD27<sup>+</sup> ont la particularité d'entrer en nécrose après 8h de culture sans stimulation (FIG. 19).

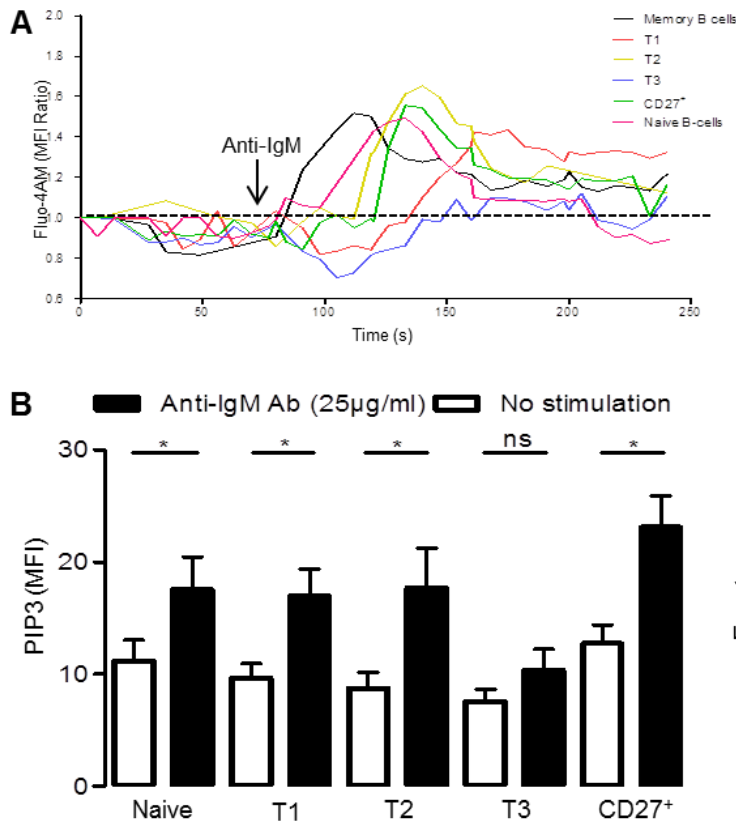
L'étude des réponses cellulaires suite à l'engagement du récepteur d'Ag sont incontournables pour caractériser fonctionnellement les LB. Après avoir travaillé sur le potentiel de survie des sous-populations de LB Tr., nous avons souhaité tester les fonctions cellulaires de ces sous-populations suite à une stimulation de leur IgM de surface.

## 2) Engagement du récepteur d'antigène

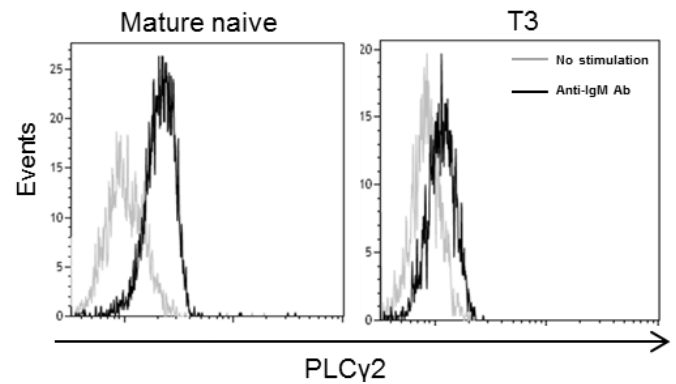
La faible densité d'IgM à la surface des LB peut être une marque phénotypique des cellules anergiques (Quach, Manjarrez-Orduno et al. 2011). De plus, il a été décrit que la population des LB Tr. est enrichie en cellules anergiques impliquées dans la tolérance immunologique (Merrell, Benschop et al. 2006). Etant donné que les sous-populations de LB Tr. que nous avons identifiées possèdent différents niveaux d'expression d'IgM, nous avons étudié leur potentiel de réponse suite à l'engagement du récepteur d'Ag. L'influx calcique a été étudié après stimulation par un Ac anti-IgM, à l'aide d'une sonde Fluo-4AM, qui a été incorporée dans les cellules B

préalablement marquées avec des Ac anti-CD19, anti-IgD, anti-CD32, anti-CD24, anti-CD38 et anti-CD27. Le relargage de PIP3 ainsi que la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2 ont été évalués avec et sans stimulation du BCR à l'aide de marquages intracellulaires par cytométrie en flux.

### Les lymphocytes B T3 sont des cellules anergiques



**FIGURE 20 : Les sous-populations de lymphocytes B transitionnels répondent différemment à l'engagement du BCR.** A) Influx calcique suite à l'engagement du BCR. Une sonde Fluo-4AM a été incorporée dans les cellules B préalablement marquées avec des Ac anti-CD19, anti-IgD, anti-CD32, anti-CD24, anti-CD38 et anti-CD27. Les LB ont ensuite été stimulés par un Ac anti-IgM. B) Etude du relargage de PIP3 et de la phosphorylation de PLC $\gamma$ 2.



Nous avons observé que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> et T2 ont des influx calciques similaires après stimulation par un Ac anti-IgM (FIG. 20 A). Par contre, les LB T1 répondent plus tardivement à cette stimulation, tandis que les LB T3 ne sont pas capables de générer un influx calcique, ce qui est une caractéristique fonctionnelle des cellules B T3 anergiques murines (Teague, Pan et al. 2007).

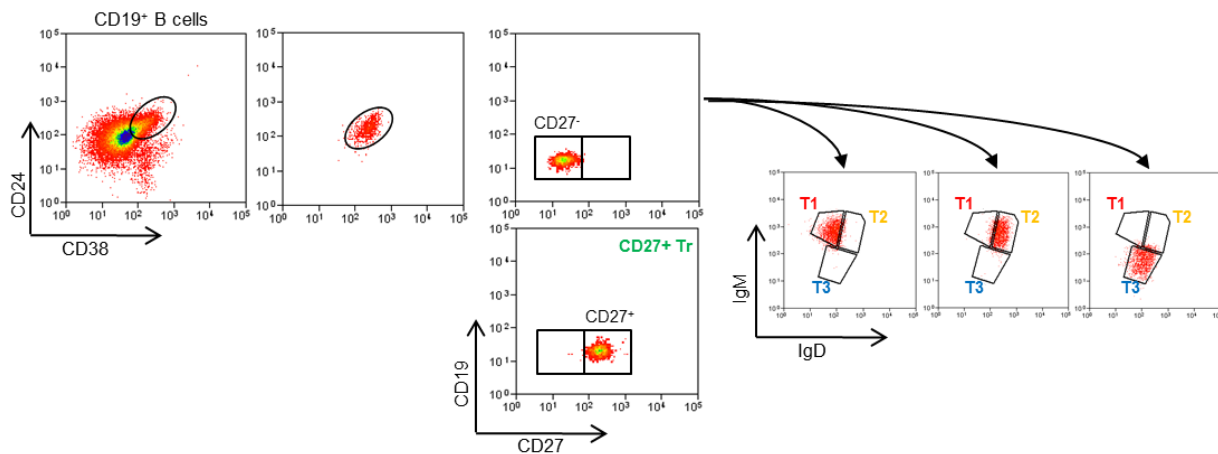
En plus de l'absence d'une réponse calcique, un défaut de relargage du PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate) ainsi qu'une incapacité à phosphoryler PLC $\gamma$ 2 (phospholipase C  $\gamma$ 2) reflètent une non-réponse cellulaire suite à l'engagement du BCR (Browne, Del Nagro et al. 2009). Nous avons constaté que les LB T3



représentent la seule sous-population de cellules B  $CD24^{fortes} CD38^{fortes}$  à ne pas libérer le PIP3 et à ne pas phosphoryler PLC $\gamma$ 2 après stimulation (FIG. 20 B). En conclusion, les LB T3 que nous avons identifiés chez l'Homme sont des cellules anergiques.

### 3) Réponse innée et engagement du TLR9

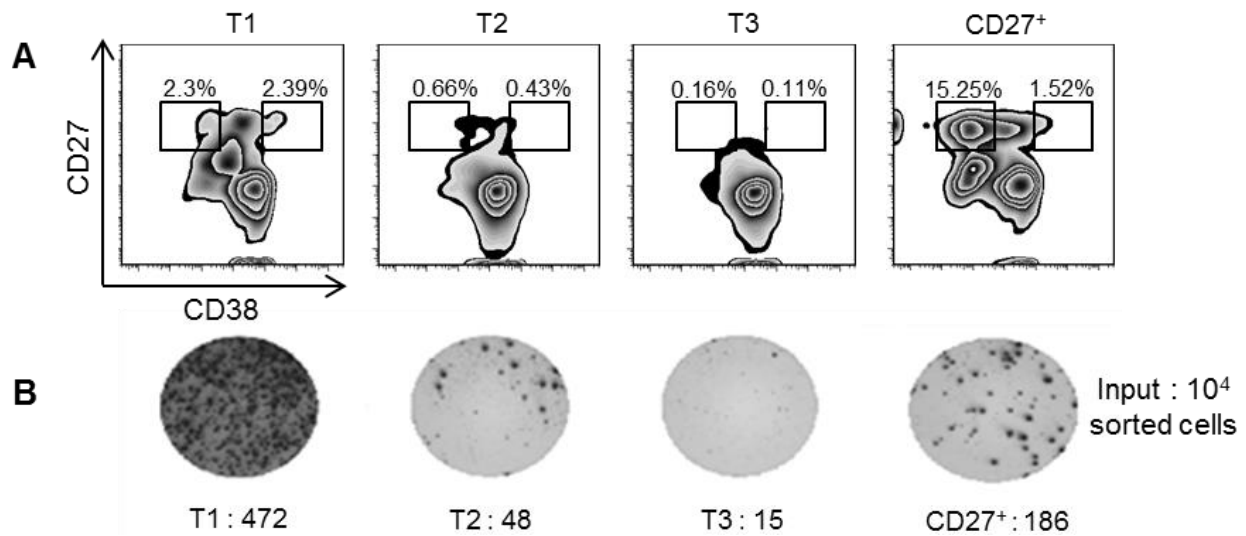
Outre l'importance de la réponse à l'Ag dans la tolérance immunologique, les LB Tr. répondent également à des signaux innés. Afin de réaliser des tests fonctionnels sur des populations cellulaires isolées, nous avons triés les LB Tr.  $CD27^+$ , T1, T2 et T3 par cytométrie en flux (FIG. 21).



**FIGURE 21 : Tri cellulaire des lymphocytes B transitionnels T1, T2, T3 et  $CD27^+$  par cytométrie en flux.**

*Les lymphocytes B transitionnels  $CD27^+$  et T1 se différencient en cellules sécrétrices d'IgM*

Nous nous sommes d'abord intéressés à la différenciation en plasmablastes et à la sécrétion d'immunoglobulines par les sous-populations de LB Tr. suite à l'engagement du TLR9. Après tri cellulaire les LB T1, T2, T3 et Tr.  $CD27^+$  ont été cultivés avec des motifs CpG-ODN pendant 3 jours. Puis, nous avons étudié la capacité des LB Tr. à se différencier, en réalisant un marquage de cytométrie en flux avec des Ac anti-CD27 et anti-CD38. En parallèle, une culture était destinée à réaliser un test de détection d'Ac produits après stimulation par CpG-ODN. Les sous-populations de LB Tr. triées ont été stimulées 3 jours puis placées dans des puits tapissés d'une membrane qui permet la révélation de spots correspondant à des Ac anti-IgM sécrétés.



**FIGURE 22 : Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> et T1 initient une réponse humorale innée après engagement du TLR9.** A) Différenciation *in vitro* après tri cellulaire des sous-populations de LB Tr. après 3 jours de stimulation par des CpG-ODN. Les pourcentages de cellules B mémoires (CD38<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) et des plasmablastes (CD38<sup>forts</sup> CD27<sup>forts</sup>) néo-différenciés sont indiqués au-dessus des carrés noirs. B) Sont affichées les membranes d'ELISPOT des IgM totales sécrétées.

Les LB Tr. CD27<sup>+</sup> ont la capacité de se différencier en cellules B mémoires (CD27<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) ainsi qu'en plasmablastes (CD27<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>) (FIG. 22 A). En association avec cette différenciation induite par des CpG-ODN, les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont capables de se différencier en cellules sécrétrices d'IgM. Les LB T1 sont également capables de se différencier en plasmablastes sécréteurs d'IgM (FIG. 22 B). Enfin, nous avons vérifié une éventuelle production d'IgG et d'IgA, et n'avons pas constaté de commutation de classe au cours des trois jours de culture.

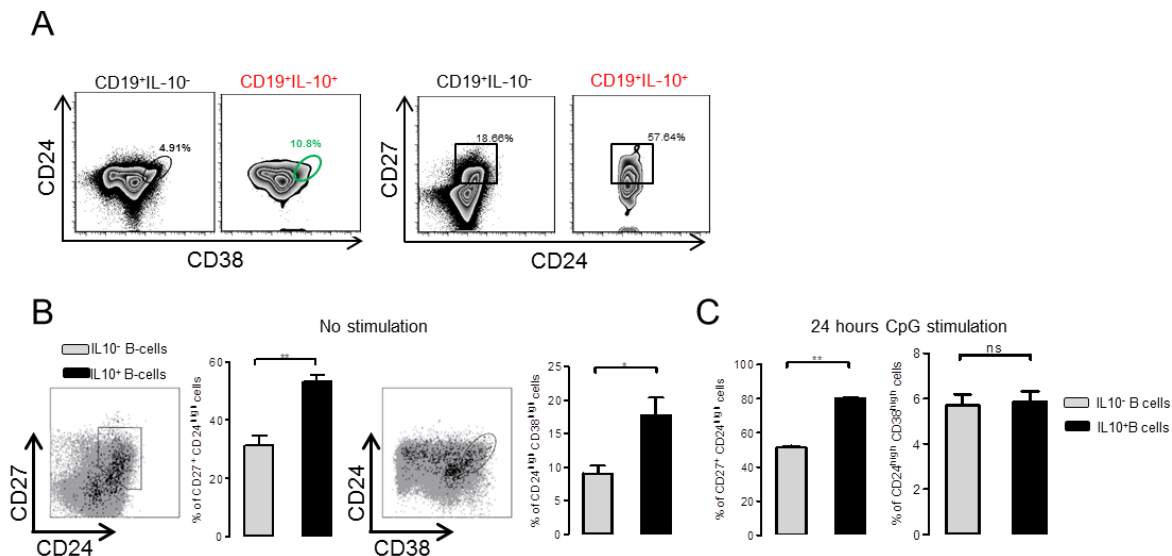
Après avoir étudié les réponses de survie, calcique, innée et humorale, nous nous sommes intéressés aux fonctions régulatrices des sous-populations de LB Tr., en commençant par la sécrétion d'IL-10.

#### 4) Fonctions régulatrices des sous-populations de lymphocytes B transitionnels

La population des LB Tr.  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  a été décrite comme productrice d'IL-10 après stimulation. Ici, nous avons voulu déterminer précisément quelle(s) sous-population(s) a (ont) la capacité de sécréter cette cytokine anti-inflammatoire de façon spontanée. Pour ce faire, nous avons utilisé un outil permettant la capture puis la détection de la protéine IL-10 en sortie des vésicules d'exocytose. En plus d'un Ac anti-IL10, nous avons utilisés les Ac répertoriés en Table 2 pour séparer les sous-populations de LB Tr.

*A l'état basal, les LB  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  ne sécrètent que peu d'interleukine 10*

Chez l'Homme, la littérature a décrit deux populations lymphocytaires B enrichies en B10 : celles des LB  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  et des LB  $CD24^{forts} CD27^+$  (Blair, Norena et al. 2010; Iwata, Matsushita et al. 2011).



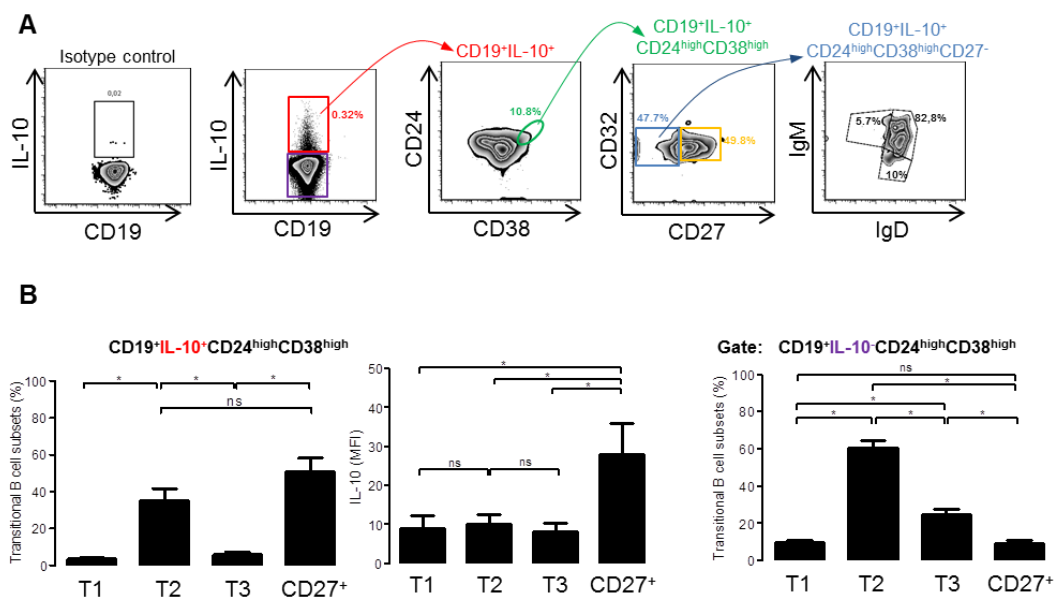
**FIGURE 23 : Sécrétion d'IL-10 par les cellules B  $CD24^{fortes} CD38^{fortes}$  et  $CD24^{fortes} CD27^+$ .** A) Pourcentages des LB  $CD24^{forts} CD38^{forts}$  et  $CD24^{forts} CD27^+$  parmi l'ensemble des cellules B  $IL-10^+$  ou  $IL-10^-$ . B) Graphiques représentatifs de 5 expériences réalisées sans stimulations. C) Test de sécrétion d'IL-10 après 24h de stimulation par des CpG-ODN. Tests statistiques de Mann-Whitney.

Nous montrons que sans stimulation, ces deux populations sont effectivement enrichies en cellules sécrétrices d'IL-10, mais que les LB Tr. ne représentent que  $17.7\% \pm 5.8$  des cellules B qui sécrètent spontanément l'IL-10 (FIG. 23 A et B). De plus, nous avons constaté qu'une stimulation par des motifs CpG-ODN n'augmente pas la

sécrétion d'IL-10 par les cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> totales, contrairement à ce qui a été observé pour les LB CD24<sup>fortes</sup> CD27<sup>+</sup> parmi lesquels il semble donc exister des proB10 (FIG. 23 C).

### Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> et T2 sécrètent le plus d'interleukine 10

Nous avons ensuite associé la détection de l'IL-10 avec celle des autres marqueurs (CD24, CD38, IgD, IgM et CD27) permettant de discriminer les sous-populations de LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup>. Nous avons ainsi évalué le potentiel de chacune d'entre-elles à sécréter l'IL-10 (FIG. 24 A).

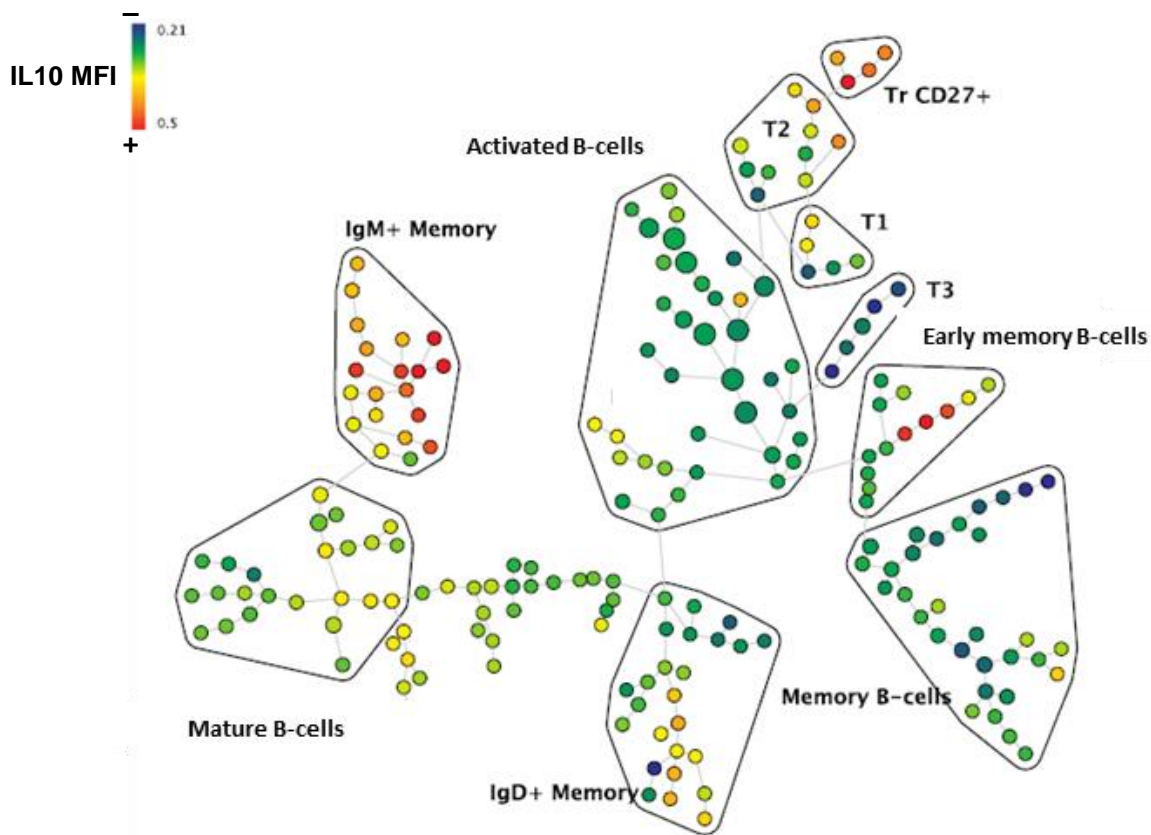


**FIGURE 24 : Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> et T2 sécrètent l'interleukine 10.** A) Test de sécrétion d'IL-10 sans stimulation dans les sous-populations de LB Tr. B) Pourcentages de LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> parmi les LB Tr. IL-10<sup>+</sup> et IL-10<sup>-</sup>. MFI de l'IL-10 dans les cellules LB Tr. IL-10<sup>+</sup>. (n=4, tests de Mann-Whitney).

Nous démontrons que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> et T2 représentent les sous-populations majoritaires de LB CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> qui sécrètent l'IL-10. De plus, il a été remarqué que l'IMF de l'IL-10 était plus importante parmi les LB Tr. CD27<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> que parmi les LB T2 IL-10<sup>+</sup>. Cette donnée montre que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sécrètent plus de molécules d'IL-10, leur conférant un potentiel sécréteur important. Nous soulignons aussi le fait que bien que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> constituent une sous-population de LB Tr. minoritaire en comparaison aux LB T2, elle est la plus compétente pour sécréter l'IL-10 (FIG. 24 B).

## Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> : une population sécrétrice d'interleukine 10 à part

Pour approfondir sur le phénotype des cellules sécrétrices d'IL-10, nous avons envisagé une seconde approche bioinformatique avec le programme SPADE (spanning-tree progression analysis of density-normalized events). SPADE permet la visualisation de populations cellulaires hiérarchisées dans un arbre organisé par l'utilisateur (Qiu, Simonds et al. 2011). Nous avons étudié l'intensité d'expression de l'IL-10 dans des populations cellulaires B connues, ainsi que dans les sous-populations de LB Tr. que nous avons décrites.



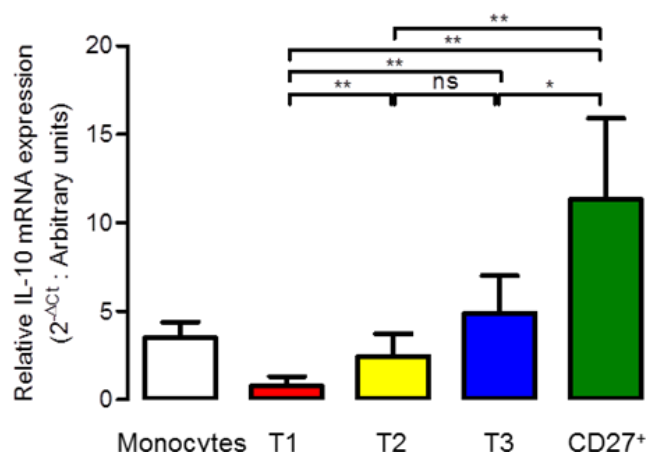
**FIGURE 25 : Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> se détachent par une forte expression d'interleukine 10.** Arbre des populations cellulaires B et intensité d'expression de l'interleukine 10. Les nœuds ont été regroupés et associés à des populations principales de LB. L'intensité d'expression de l'IL-10 est représentée pour chacun des nœuds de cellules.

Nous confirmons que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont les cellules transitionnelles les plus compétentes pour sécréter l'IL-10 (FIG. 25). Nous avons également retrouvé des populations productrices d'IL-10 décrites dans la littérature comme les LB mémoires IgM<sup>+</sup> (Khoder, Sarvaria et al. 2014).

Après avoir étudié la sécrétion de la cytokine IL-10 nous avons souhaité déterminer si les niveaux d'ARNm du gène *il10* corrélaient avec l'expression de la protéine à l'état basal.

### De l'ARNm du gène *il10* à sa protéine

Nous avons triés *ex vivo* les LB Tr. CD27<sup>+</sup>, T1, T2 et T3 avant d'en extraire les ARNm. Après rétrotranscription nous avons réalisé une qPCR pour quantifier l'expression du gène *il10* dans chacune des sous-populations.

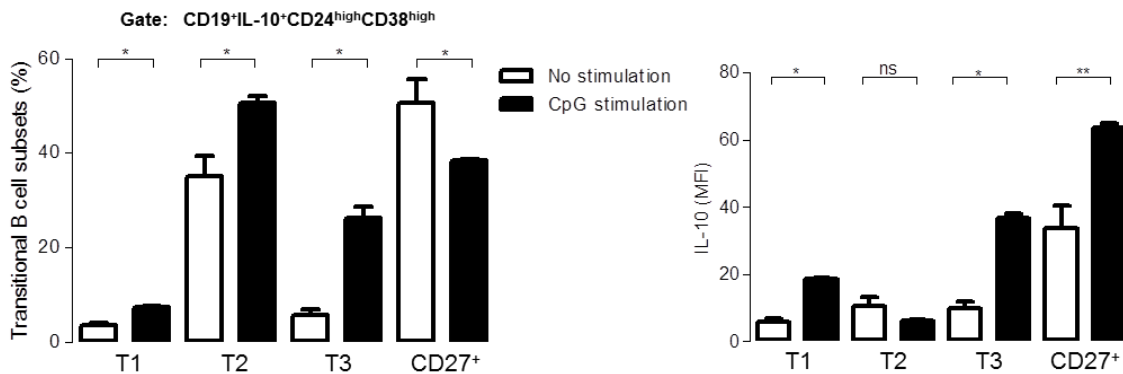


**FIGURE 26 : Expression relative de l'ARNm du gène *il10* dans les sous-populations de cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup>.** Les monocytes utilisés en contrôle positif ainsi que les LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> ont été triés et les niveaux d'expression du gène *il10* ont été évalués par PCR quantitative. L'expression relative a été quantifiée par la formule 2<sup>-ΔCt</sup> appliquée à l'expression du gène de ménage *β2m* (β2-microglobuline).

Les LB T2 sécrètent l'IL-10 mais les niveaux de transcrits de la protéine y sont faibles en comparaison aux LB Tr. CD27<sup>+</sup> (FIG. 26). Cette première information suggère que l'ARNm du gène *il10* est maintenu à de faibles niveaux dans les LB T2 mais que sa traduction est particulièrement efficace. Il est intéressant de noter que les taux d'ARNm de l'IL-10 sont équivalents dans les LB T2 et T3. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une activation des LB T3 pourrait y favoriser la traduction de l'ARNm IL-10.

## La population des lymphocytes B T3 contient des proB10

En FIGURE 24 B, nous avons montré que les LB T1 et T3 ne contiennent presque pas de B10. Nous avons cherché à étudier l'effet d'une stimulation par CpG-ODN sur l'induction de LB IL-10<sup>+</sup> dans les sous-populations de LB Tr.



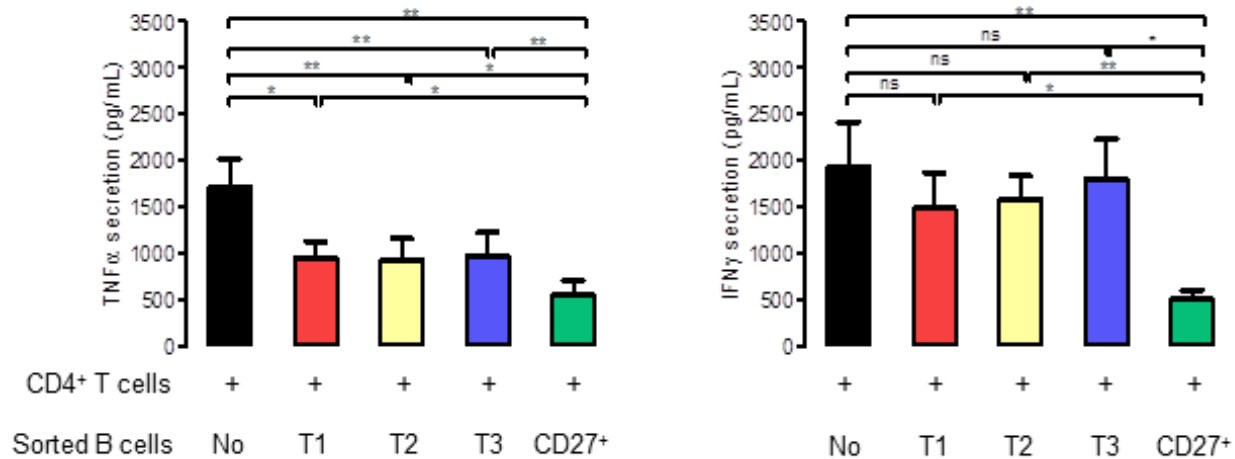
**FIGURE 27 : L'engagement du TLR9 favorise la sécrétion d'interleukine 10 par les lymphocytes B T3.** Tests de sécrétion après 24h de stimulation par des motifs CpG-ODN (n=8, tests de Wilcoxon).

Il est intéressant de constater que l'induction de B10 est forte parmi les LB T3 après 24h de stimulation. Ce résultat permet d'affirmer que la sous-population des LB T3 contient des proB10 induit en B10 après engagement du TLR9 (FIG. 27). Ceci est à mettre en lien avec les niveaux d'ARNm de l'IL-10 présents à l'état basal dans les LB T3. Notons aussi qu'une faible induction a été observée dans les LB T1 et T2. Enfin, même si les motifs CpG-ODN diminuent le pourcentage de B10 parmi les LB Tr. CD27<sup>+</sup>, une hausse de l'intensité d'expression de l'IL-10 a été observée dans ces cellules (FIG. 27 graphique de droite).

Après avoir étudié le potentiel qu'ont les sous-populations de LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> à sécréter l'IL-10, nous avons souhaité déterminer si cette propriété pouvait être associée avec la régulation de la réponse inflammatoire des LT CD4<sup>+</sup>.

## Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> inhibent la polarisation Th1

Nous avons cultivés les sous-populations de LB Tr. triées avec des LT CD4<sup>+</sup> stimulés par des Ac anti-CD3 et anti-CD28 pendant 4 jours. Des motifs CpG-ODN ont également été ajoutés à la culture. Après 4 jours, les surnageants de culture ont été récupérés et des tests ELISA anti-TNF- $\alpha$  et anti-IFN- $\gamma$  ont été réalisés.



**FIGURE 28 : Régulation de la production de cytokines inflammatoires par les sous-populations de lymphocytes B transitionnels.** Les LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> ont été triés puis mis en culture avec des LT CD4<sup>+</sup> en présence de CpG-ODN. Des tests ELISA anti-TNF- $\alpha$  et anti-IFN- $\gamma$  ont été réalisés sur les surnageants récupérés après 4 jours de culture (n=8, tests statistiques de Wilcoxon).

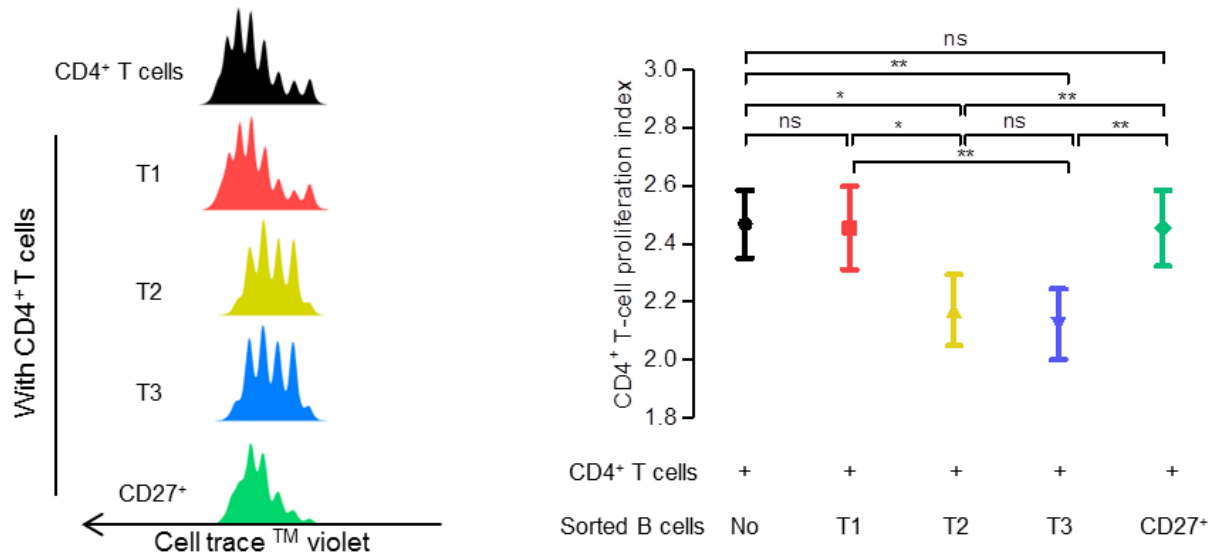
Nous avons alors constaté qu'en comparaison à la condition des LT CD4<sup>+</sup> cultivés seuls, chacune des sous-populations de LB Tr. est capable de limiter la production de TNF- $\alpha$  par les LT. En revanche, seuls les LB Tr. CD27<sup>+</sup>, qui sécrètent le plus d'IL-10, sont habilités à inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> (FIG. 28).

En parallèle de la régulation de la réponse inflammatoire, nous nous sommes intéressés à la modulation de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> par les sous-populations de LB Tr.



## Les lymphocytes B T3 limitent la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Nous avons cultivés les LB Tr. CD27<sup>+</sup>, T1, T2 et T3 avec des LT CD4<sup>+</sup> marqués avec un traceur intracytoplasmique qui permet de visualiser les divisions cellulaires générées durant les quatre jours de culture.



**FIGURE 29 : Régulation de la réponse proliférative des lymphocytes T par les lymphocytes B transitionnels.** Les LT CD4<sup>+</sup> ont été marqués avec du Cell trace<sup>™</sup> violet avant d'être cultivés avec les LB Tr. triés. La prolifération des LT a été étudiée après 4 jours de culture (n=9, tests statistiques de Wilcoxon).

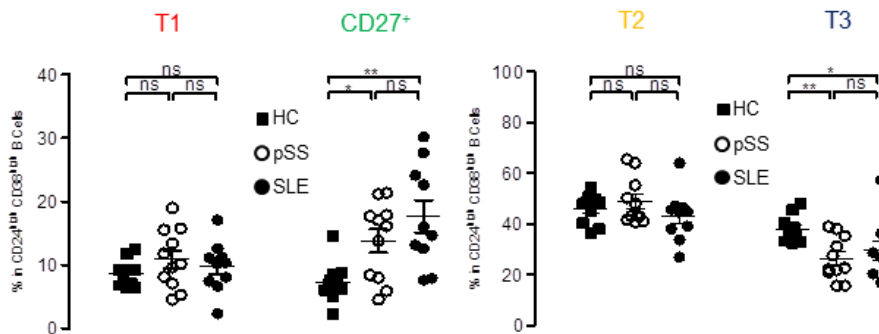
Après 4 jours de culture, nous avons montré que les LB T2 et T3 sont capables d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> contrairement aux LB T1 et Tr. CD27<sup>+</sup> (FIG. 29).

Dans notre groupe de volontaires sains, nous avons constaté que les sous-populations de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> ont des potentiels régulateurs différents. A défaut de pouvoir réaliser les mêmes études fonctionnelles dans les groupes de patients, nous avons souhaité étudier la distribution des sous-populations de LB Tr. dans les pathologies autoimmunes.

## 5) Les lymphocytes B transitionnels T1, T2, T3 et CD27<sup>+</sup> dans l'autoimmunité

Pour conclure l'étude, nous avons réalisé une analyse bioinformatique FLOCK qui repose sur la comparaison croisée d'échantillons provenant de patients atteints de maladies autoimmunes et de volontaires sains. Les paramètres utilisés sont identiques à ceux qui ont permis de réaliser la FIGURE 16 B. Les données de cytométrie en flux provenant des patients et des témoins ont été répertoriées dans une liste unique (data set). Puis, l'analyse de cette liste a été faite selon des paramètres fixés, ce qui a permis une standardisation des résultats.

*Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> et T3 sont anormalement distribués dans les pathologies autoimmunes*

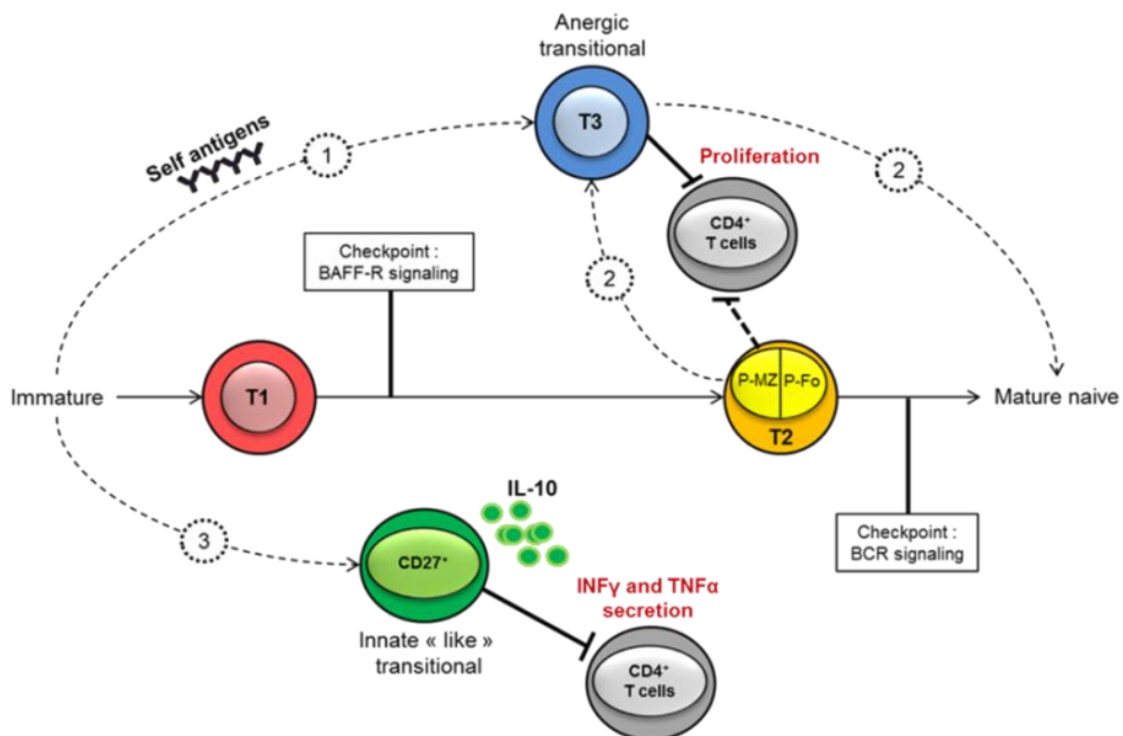


**FIGURE 30 : Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> sont augmentés dans les maladies autoimmunes, tandis que les LB T3 y sont sous-représentés.** Pourcentages que représentent les LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> parmi les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> dans les patients atteints de lupus érythémateux disséminé (SLE = 10), du syndrome de Gougerot Sjögren (pSS = 11) et dans les volontaires sains (HC = 10). Tests de Mann-Whitney.

Nous avons constaté que les patients atteints de pSS et de SLE possèdent plus de LB Tr. CD27<sup>+</sup>, et moins de LB T3 que les témoins. En revanche, les proportions des LB T1 et T2 sont inchangées (FIG. 30). Ces résultats suggèrent que les stades de développement des LB T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> sont particulièrement sensibles aux modifications physiopathologiques qui surviennent dans l'autoimmunité. En outre, la littérature décrit déjà une hausse globale des cellules productrices d'IL-10 dans le lupus, sans qu'il n'y ait de régulation de l'inflammation. Enfin, les LB T3 anergiques représentent probablement un stade de contrôle et de mise sous silence transitoire des LB autoréactifs chez les témoins. Nous supposons que dans les maladies autoimmunes, certaines cellules B autoréactives pourraient échapper à ce checkpoint, et perturber alors la tolérance périphérique.

## Conclusion

Nous avons mis évidence que les LB Tr. peuvent être séparés en quatre sous-populations distinctes. D'abord, nous avons confirmé la caractérisation des LB T1 et T2 déjà décrits chez l'Homme, avant de distinguer des LB T3 anergiques et des LB Tr. CD27<sup>+</sup> producteurs d'IL-10. Les LB T3 inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> tandis que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> limitent la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> en Th1. De plus, les pourcentages des LB T3 et des cellules B Tr. CD27<sup>+</sup> sont respectivement diminués et augmentés dans les pathologies autoimmunes en comparaison aux volontaires sains. Cette étude met en évidence plusieurs sous-populations de LB Tr. ayant chacune un phénotype ainsi que des profils régulateurs qui leur sont propres. Enfin, les anomalies de distribution observées dans les patients atteints de SLE et de SGS montrent que les LB T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> sont particulièrement sensibles aux modifications physiopathologiques, ce qui justifie l'étude de leur potentiel régulateur dans les maladies autoimmunes.



**FIGURE 31 : Paradigme sur les stades de maturation et les fonctions régulatrices des lymphocytes B transitionnels.**

Nos résultats ont permis de proposer un nouveau schéma de différenciation des LB Tr. D'abord, les LB T1 sont issus de cellules B immatures. Les LB Tr. CD27<sup>+</sup> présentent aussi de forts niveaux d'expression d'IgM et de CD10 à la membrane, ce qui suggèrent qu'ils représentent aussi un stade de développement immature (FIG. 31 : (3)). Les points de contrôle qui reposent sur les réponses à la cytokine BAFF et à l'engagement du BCR sont critiques pour le développement des LB Tr., et ont principalement été décrits chez la souris pour les stades T1 et T2. Nous démontrons l'importance d'un troisième stade T3 alternatif, auquel les cellules B anergiques participent probablement au maintien de la tolérance périphérique (1). Nous ne pouvons pas déterminer si les LB T3 sont issus de cellules B immatures ayant reconnus des autoAg ou bien s'ils dérivent des LB T2. De même, il est possible que les LB T3 puissent se différencier en cellules B matures, tout comme les LB T2 précurseurs des LB Fo (1,2).

## II. Fonctions suppressives des lymphocytes B sur les cellules T

A l'heure actuelle chez l'Homme, la détection spécifique des Breg ainsi que leur expansion *in vivo* semblent difficiles. La majorité des études se repose sur des observations de phénotypes *ex vivo* et sur des tests fonctionnels *in vitro*. Cependant, au vu des données récoltées chez la souris, il est probable que l'émergence de populations B régulatrices peut être modulée par un microenvironnement adapté. Par exemple, les DC régulatrices sont capables d'induire des Breg CD19<sup>forts</sup> FcγRIIb<sup>forts</sup> (Qian, Qian et al. 2012). De plus, la colonisation microbiotique peut être à l'origine d'une production d'IL-6 et d'IL-1β par des splénocytes, cytokines inductrices de B10 (Rosser, Oleinika et al. 2014). En outre, plusieurs populations de LB ont la capacité intrinsèque d'acquérir des propriétés régulatrices en fonction des signaux qu'elles perçoivent. Du fait de cette plasticité qu'ont les cellules B, nous supposons qu'il est possible de les orienter en cellules régulatrices en appliquant un microenvironnement spécifique. Les microenvironnements retrouvés *in vivo* sont complexes, composés de différents types cellulaires et de nombreux facteurs solubles. Dans cette seconde étude, nous émettons la notion de ciblage cellulaire. Nous supposons que l'émergence des Bregs peut être induite par un autre type cellulaire. De même, nous envisageons que le caractère plastique des cellules B leur permet de réguler spécifiquement les autres cellules dans un environnement commun. Enfin, nous suggérons qu'en réponse à cette communication intercellulaire, les cellules B développent un programme transcriptionnel spécifique.

Expérimentalement, nous avons cultivés des populations isolées de LT CD4<sup>+</sup> naïfs et mémoires avec des LB totaux. Nous avons observés que les cellules B sont capables d'inhiber la prolifération et d'induire la mort des LT mémoires tandis qu'ils induisent la prolifération des LT naïfs. A partir de ces premiers résultats, nous avons émis l'hypothèse que les LB suppresseurs des LT mémoires possèdent un programme transcriptionnel spécifique. Pour répondre à cette problématique, nous avons isolés par tri cellulaire les LB après qu'ils aient été cultivés avec les différentes populations de LT. Puis, nous avons réalisés une étude de l'expression de quatre gènes au sein des LB, impliqués dans l'activation (*NFκB1*), le contrôle de la différenciation terminale en plasmocyte (*BCL6*, *PRDM1* (codant BLIMP1)) et dans la régulation de l'inflammation et de la prolifération (*IL10*). Nous montrons dans ce travail que les LB qui ont inhibé la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> mémoires expriment plus faiblement *NFκB1* et

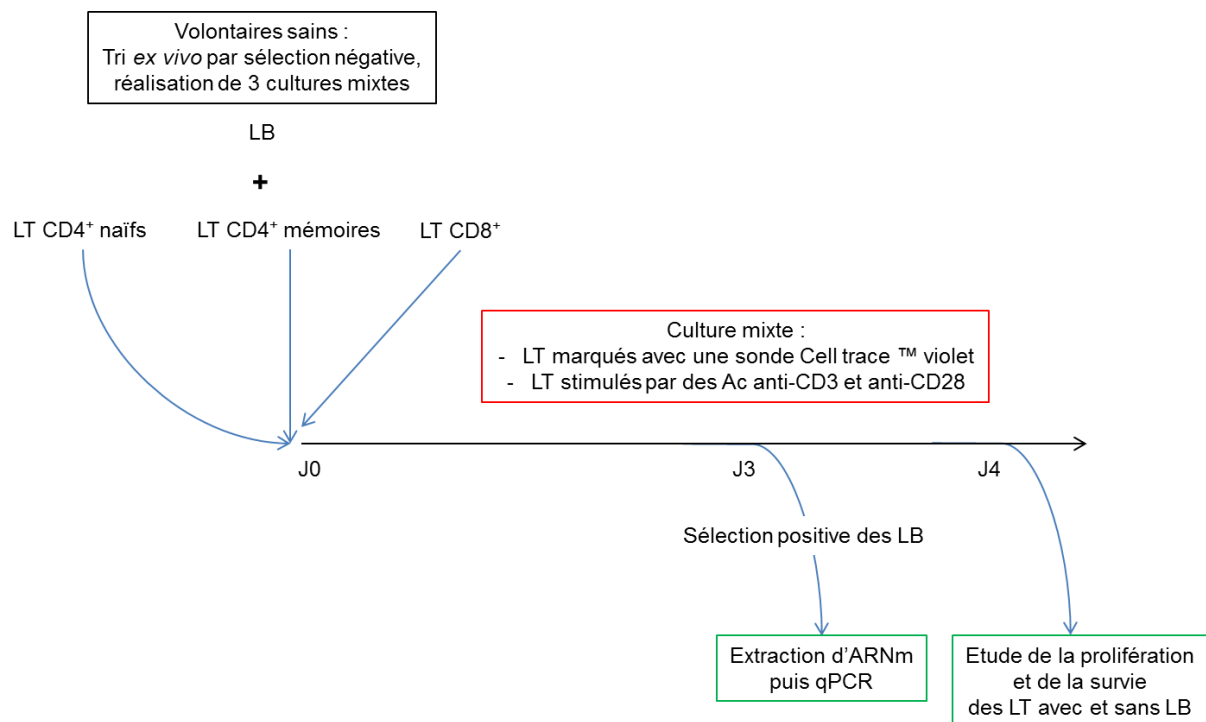
*BCL6*, et plus fortement les gènes *PRDM1* et *IL10*, que les LB qui ont induits la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Au vu de ces résultats préliminaires les perspectives d'études seront de réaliser une analyse plus large et sans *a priori* de l'expression de nombreux gènes impliqués dans des voies de signalisation telles que STAT, NFAT, PI3K et MAPK.

## **A) Inhibition de la prolifération T : une fonction régulatrice modulable des lymphocytes B**

### **1) Matériel et méthode : modèle de culture mixte et extraction d'ARNm**

Nous avons triés 3 populations de LT par sélection négative en fonction des marqueurs CD3, CD4, CD8 et CD45RO. Ainsi, nous avons isolés des LT CD3<sup>+</sup> mémoires (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>), naïfs (CD4<sup>+</sup> CD4RO<sup>-</sup>) et cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>). Une fois séparés, les LT ont été marqués par une sonde Cell trace™ violet qui permet de suivre leur prolifération. Ces derniers ont été cultivés avec des LB totaux autologues et mis en présence d'Ac stimulants anti-CD3 et anti-CD28. Aucun facteur soluble activant les LB n'a été ajouté à cette culture mixte. Nous avons également réalisé des cultures de LT seuls, qui nous ont permis d'évaluer l'impact de l'ajout de LB sur la prolifération des LT. Après 4 jours de culture, la prolifération des LT mémoires, naïfs et cytotoxiques a été évaluée, en présence et en l'absence de cellules B. En parallèle, nous avons étudié la mort cellulaire des populations de LT à 4 jours par un triple marquage Annexin V, Draq7 DNA Dye et Ac anti-CD19.

En parallèle de ces cultures visant à déterminer le potentiel des LB à inhiber la prolifération des populations de LT, nous avons réalisé des cultures destinées à l'extraction des ARNm contenus dans les LB. Nous avons choisi de les extraire à 3 jours de culture afin d'étudier l'expression génique qui se manifeste avant l'observation de l'effet régulateur des LB à 4 jours (FIG. 32). Les cellules B ont été isolées des cultures par une sélection positive anti-CD19. Après vérification de la pureté des tris, nous avons extrait les ARNm des LB mis en présence des LT naïfs et des LT mémoires. Enfin, l'intensité de l'expression des gènes *NFκB1*, *BCL6*, *PRDM1*, et *IL10* a été évaluée par RT-PCR quantitative.



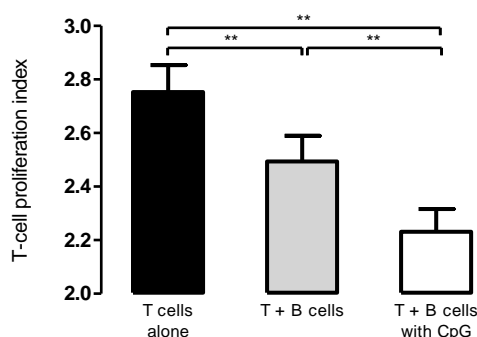
**FIGURE 32 : Schéma explicatif de la méthode employée pour comparer les profils transcriptionnels et le potentiel supresseur des lymphocytes B.**

Avant de nous engager dans ces expériences, nous avons souhaité mieux comprendre les facteurs qui impactent sur la prolifération des LT cultivés avec les cellules B. Nous avons alors étudié les effets de facteurs solubles ainsi que la cellularité dans notre modèle de culture *in vitro*.

## 2) Modulation de l'inhibition de la prolifération T par les lymphocytes B

### *L'engagement du TLR9 des lymphocytes B module la prolifération des lymphocytes T*

La première question posée concernait l'influence d'une stimulation des LB par des motifs CpG-ODN dans les cultures mixtes. Cette stimulation a été décrite pour induire une production d'IL-10 dans les cellules B mais est-elle nécessaire pour que ces dernières inhibent la prolifération des LT ? L'étude de la prolifération des LT est possible *via* un marquage avec le traceur Cell trace™ violet, qui permet de suivre les divisions cellulaires générer au cours de la culture. Le logiciel FlowJo (FlowJo, LLC) nous a permis de calculer un index de prolifération après 4 jours de culture.



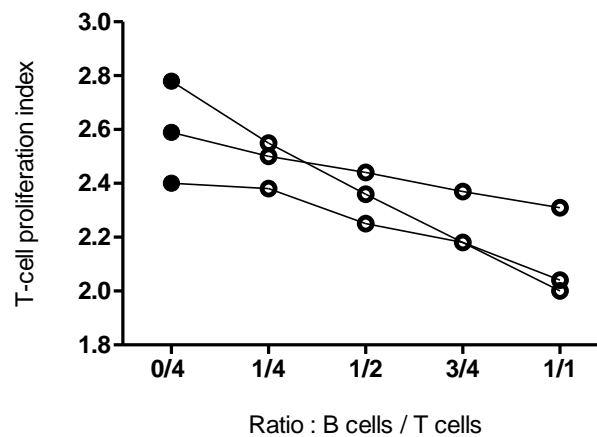
**FIGURE 33 : Prolifération des lymphocytes T en présence des lymphocytes B avec ou sans CpG-ODN.**  $4.10^4$  LT ont été cultivés seuls (barre noire), avec  $4.10^4$  LB (barre grise) ou avec  $4.10^4$  LB stimulés par des motifs CpG-ODN. La prolifération des LT marqués par le traceur Cell trace™ violet a été évaluée par un index après 4 jours de culture (n=9, tests statistiques de Wilcoxon).

L'index de prolifération des LT représente le nombre de générations créées par les cellules qui sont entrées en division. Nous avons constaté que la prolifération des LT est inhibée lorsqu'ils sont en présence de cellules B. En effet, l'index de prolifération des LT cultivés seuls est supérieur à celui des LT qui se trouvent cultivés avec des LB. De plus, l'activation des cellules B par des motifs CpG-ODN induit une inhibition accrue des LT (FIG. 33). Notons également que nous avons vérifié qu'une stimulation des LT seuls par des CpG-ODN ne modifie pas leur prolifération. En conclusion, la stimulation des LB par les CpG-ODN potentialise leur effet inhibiteur de la prolifération des LT.



## *La cellularité au cœur du modèle fonctionnel in vitro*

Après avoir étudié l'influence d'un facteur soluble, nous avons testé l'importance du ratio LT / LB pour la prolifération des cellules T.

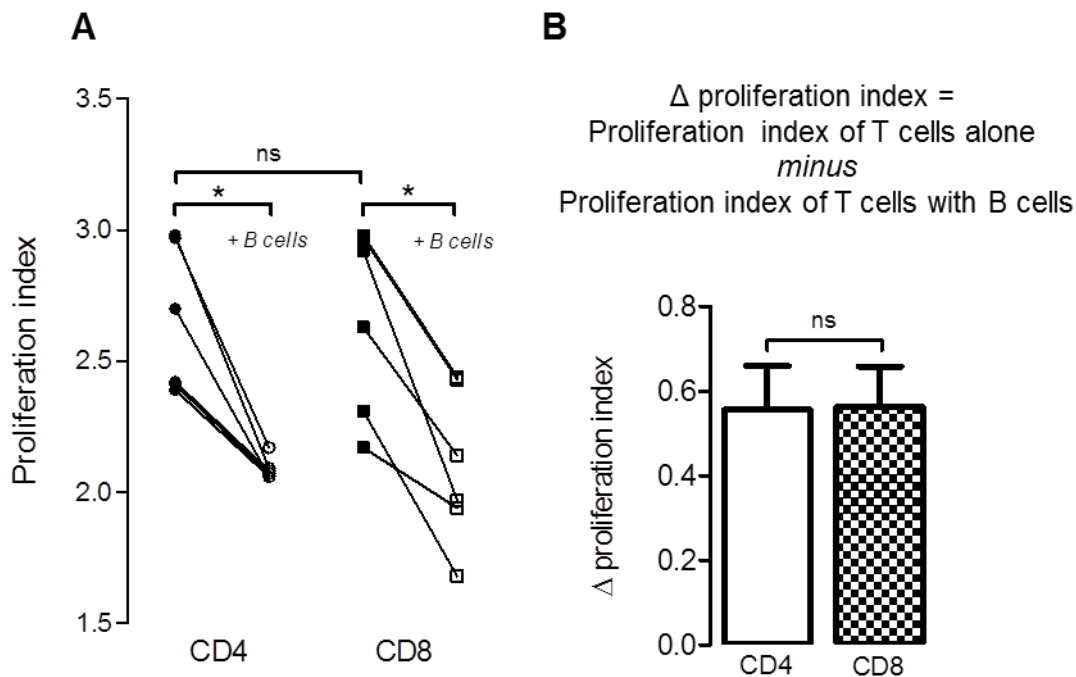


**FIGURE 34 : Influence de la cellularité sur la prolifération des lymphocytes T.** Les LT ont été cultivés sans LB (ratio 0/4), ou bien en présence de LB à différentes concentrations. Le ratio 1/1 correspond à  $4 \cdot 10^4$  LB pour  $4 \cdot 10^4$  LT. Représentations de 3 cultures mixtes réalisées en présence de CpG-ODN.

Nous avons souhaité quantifier l'influence de la concentration en cellules B sur l'inhibition de la prolifération des LT. Ainsi, nous avons réalisé des cultures mixtes en modifiant le ratio LB / LT, afin de déterminer si la quantité de cellules B « faisait leur force ». Nous avons alors constaté que plus la concentration cellulaire des LB est grande, plus l'inhibition de la prolifération des LT autologues est importante (FIG. 34). Ces résultats soutiennent l'importance du contact cellulaire pour l'inhibition de la prolifération des LT et suggèrent également une possible compétition pour les facteurs, entre autre de croissance, présents dans le milieu.

## Hétérogénéité cellulaire du compartiment lymphocytaire T

Jusqu'à présent, nous avons étudié la prolifération de l'ensemble des populations de LT. Afin d'affiner la description du modèle de culture mixte, nous avons souhaité séparer l'étude de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> de celle des LT CD8<sup>+</sup>. Pour ces expériences, nous avons cultivé l'ensemble des LT CD3<sup>+</sup> avec les cellules B. Nous avons ainsi conservé les communications intercellulaires qui se produisent en culture entre les différentes populations de LT. Après 4 jours de culture, nous avons analysé la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, en réalisant un marquage avec des Ac anti-CD19, anti-CD4 et anti-CD8.



**FIGURE 35 : Lorsqu'ils sont cultivés conjointement, la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est similairement inhibée par les lymphocytes B.** Avant la mise en culture, l'ensemble des LT CD3<sup>+</sup> ont été marqués par le traceur Cell trace™ violet. Après 4 jours en présence de CpG-ODN, les cellules de la culture ont été marquées avec des Ac anti-CD19, anti-CD4 et anti-CD8 afin de séparer les populations par cytométrie en flux. A) Index de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> cultivés avec et sans LB. B) Delta des index de prolifération (n=6, tests statistiques de Wilcoxon).

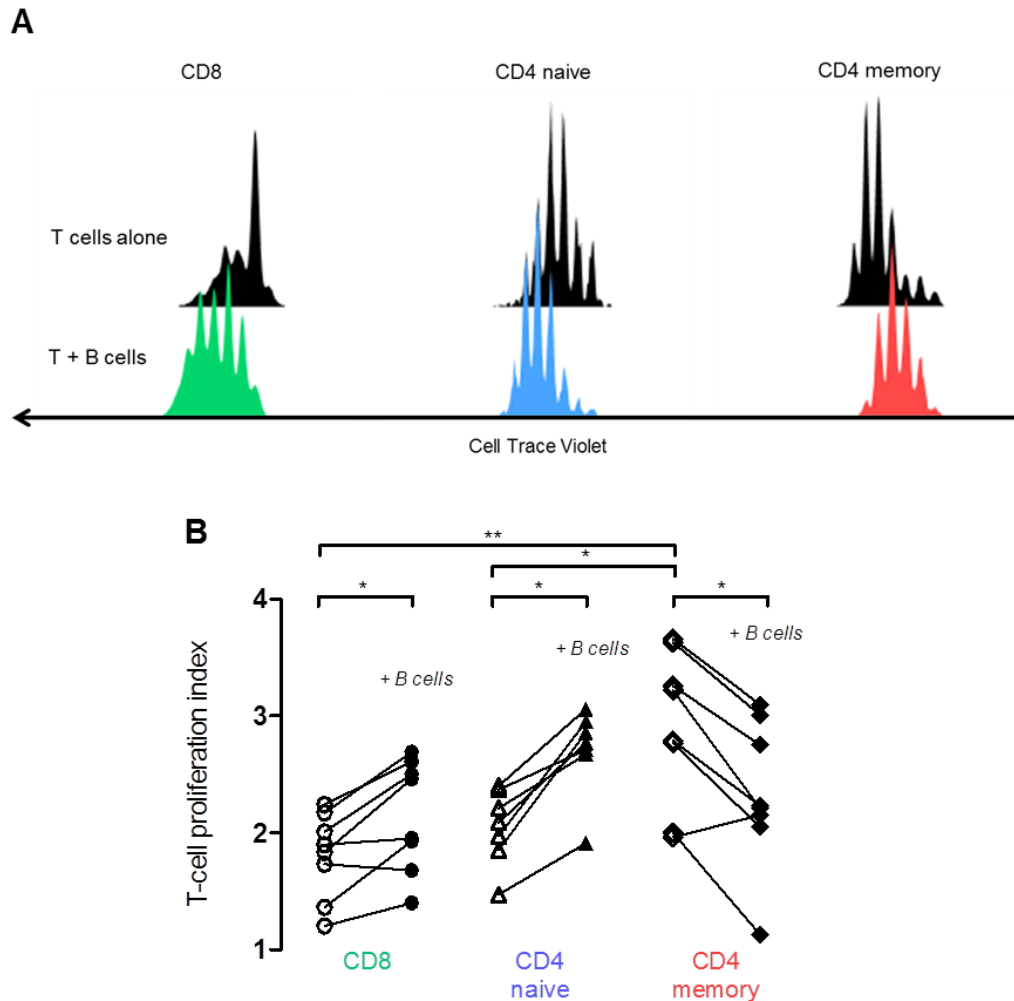
Lorsque les populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont cultivées ensemble, leur prolifération en l'absence de LB est similaire (FIG. 35 A). Afin de quantifier l'effet des LB sur la prolifération des cellules T nous avons utilisé un calcul qui considère la différence (delta) entre l'index de prolifération des LT seuls et celui des LT cultivés avec les cellules B. Plus ce delta est grand, plus l'inhibition de la prolifération est importante. Ainsi, nous avons constaté que les LB limitent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec la même efficacité (FIG. 35 B). Ces résultats soulèvent plusieurs réflexions. Tout d'abord, il est possible que les LB diminuent de la même manière la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup>. Egalement, nous devons considérer que les LB sont capables d'induire des Treg impliqués dans l'inhibition de la prolifération. Enfin, ces observations soulèvent l'intérêt de déterminer si, une fois séparés avant la mise en culture, la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est identiquement réduite par les cellules B.

## **B) Les lymphocytes B ont un comportement régulateur adapté aux types de cellules T**

### **1) Les lymphocytes B inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires et induisent leur mort**

#### *Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires par les cellules B*

Nous avons vu précédemment que lorsque les populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont cultivées ensemble en présence de LB, leur prolifération est inhibée de la même manière. Nous avons ensuite séparé par tri cellulaire les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, CD4<sup>+</sup> mémoires et CD8<sup>+</sup>, avant la mise en présence des LB afin de vérifier si, une fois isolées les unes des autres, les populations de LT prolifèrent similairement.



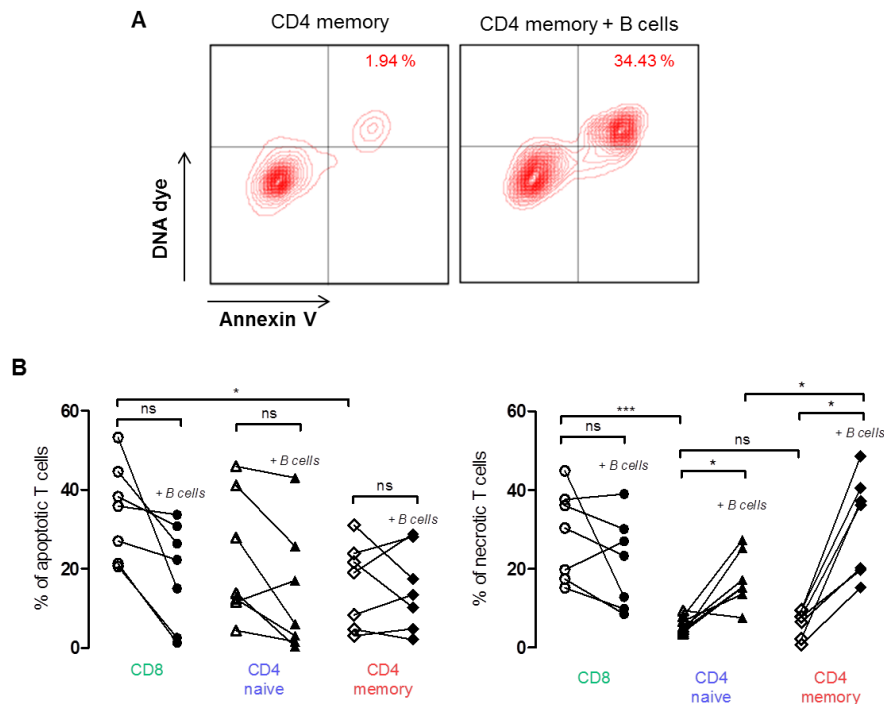
**FIGURE 36 : Les cellules B induisent la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup>, tandis qu'ils inhibent celle des CD4<sup>+</sup> mémoires.** A) Histogrammes de prolifération représentatifs. Les populations de LT ont été triées à l'aide d'un kit de sélection négative puis cultivés avec ou sans les LB totaux autologues. La culture ne contient pas de CpG-ODN. B) Les index de prolifération pour 8 expériences sont représentés pour les LT seuls (formes vides) ou mis en présence de cellules B (formes pleines). n=8, tests statistiques de Wilcoxon.

Il a été intéressant de constater que, lorsque les populations de LT ont été séparées avant la mise en culture, les cellules B induisent la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> naïfs alors qu'ils inhibent celle des LT CD4<sup>+</sup> mémoires (FIG. 36 A et B). Nous avons également obtenus les mêmes résultats en culture hétérologue. De plus, en l'absence de cellules B, les LT CD4<sup>+</sup> mémoires prolifèrent d'avantage que les LT CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup>.

Nous nous sommes ensuite orientés sur l'étude d'une autre fonction suppressive des LB : l'induction de la mort cellulaire des LT. En culture *in vitro*, les LT ont trois destins cellulaires. Ils peuvent proliférer suite à l'engagement du TCR, se différencier, ou bien entamer un programme de mort cellulaire. Après avoir étudié l'effet des LB sur la prolifération des populations de LT, nous avons analysé le potentiel de survie des LT en présence de cellules B. Notons que les analyses sur la prolifération des LT ont été réalisées sur les cellules T vivantes.

### Induction de la mort cellulaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par les lymphocytes B

Les populations de LT triés ont été cultivées avec et sans cellules B pendant 4 jours. Nous avons ensuite évalué la mort des LT par cytométrie en flux. Les cellules apoptotiques sont définies par la combinaison Annexin V<sup>+</sup> DNA Dye<sup>-</sup> (Draq7) et les cellules en nécrose sont Annexin V<sup>+</sup> Draq7<sup>+</sup>.



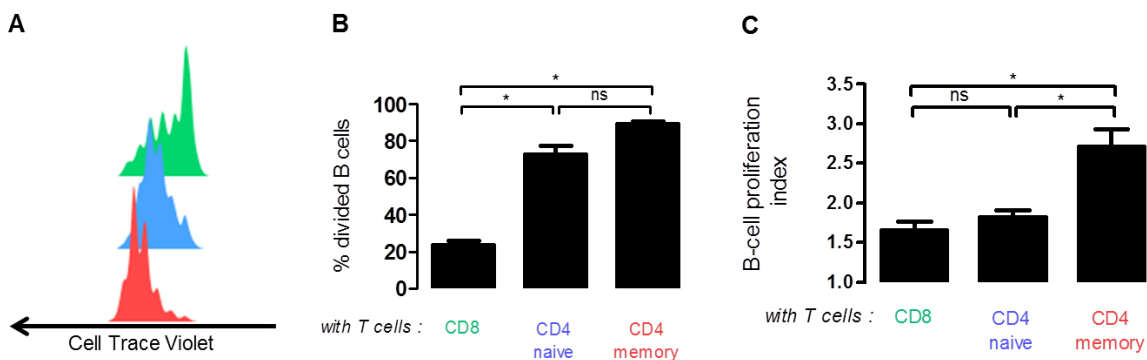
**FIGURE 37 : Les lymphocytes B induisent fortement la mort des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires par nécrose.** A) Les LT CD4<sup>+</sup> mémoires, CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup> ont été triés à l'aide d'un kit de sélection négative puis cultivés seuls ou avec des cellules B. L'apoptose a été mesurée à 4 jours avec un marquage Annexin V et la nécrose par une sonde Draq7 qui marque l'ADN. Exemple représentatif des LT mémoires. B) Les graphiques présentent les résultats sur l'apoptose (à gauche) et sur la nécrose (à droite). n=7, tests statistiques de Wilcoxon.

Lorsqu'ils sont cultivés seuls, les LT naïfs et mémoires ne sont pas nécrotiques à 4 jours, et une partie sont en apoptose. Les LT CD8<sup>+</sup> représentent la population de LT qui survie le moins. En revanche, en présence de LB, une forte induction de la mort cellulaire par nécrose a été observée pour les LT mémoires. Notons que l'entrée en nécrose est moins importante pour les LT naïfs. Ces résultats démontrent une autre fonction suppressive des cellules B qui pourraient agir en LB « killers » (FIG. 37 A et B).

## 2) Comportement des lymphocytes B face aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, naïfs et CD8<sup>+</sup>

En poursuivant cette réflexion sur la communication et le ciblage cellulaire, nous avons émis l'hypothèse qu'au-delà de leurs fonctions suppressives, certaines fonctions intrinsèques des LB pourraient être modifiées en présence des LT mémoires CD4<sup>+</sup>. Nous avons alors étudié la prolifération ainsi que le potentiel de survie des cellules B lorsqu'elles sont en présence des populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires, CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup>.

*Les lymphocytes B prolifèrent fortement en présence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires*

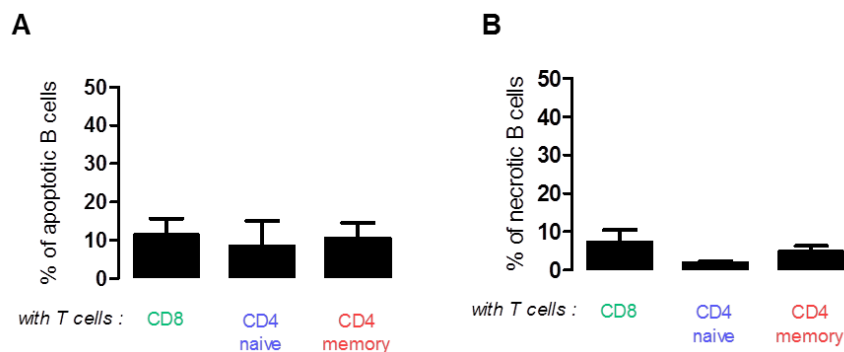


**FIGURE 38 : Les lymphocytes B prolifèrent fortement lorsqu'ils sont en présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires.** A) Histogrammes représentatifs de la prolifération des LB après 3 jours de culture en présence des LT CD8<sup>+</sup> (vert) CD4<sup>+</sup> naïfs (bleu) et CD4<sup>+</sup> mémoires (rouge). B) Pourcentage de cellules B en division pour 4 expériences. C) Index de prolifération des LB (n=4, tests de Mann-Whitney).

Les cellules B entre d'avantage en prolifération lorsqu'elles sont cultivées avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et mémoires plutôt qu'avec des LT CD8<sup>+</sup> (FIG. 38 A). En effet, seulement 20% des LB prolifèrent en présence des LT cytotoxiques. De plus, même si environ 80% des cellules B prolifèrent en culture avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs (FIG. 38 B), le nombre de divisions qu'elles forment est inférieur aux LB qui sont cultivés avec des LT CD4<sup>+</sup> mémoires. L'index de prolifération représente cette différence (FIG. 38 C). Notons enfin que la concentration des LB influe sur leur potentiel à inhiber la prolifération des LT. En conséquence, le fait qu'ils prolifèrent fortement en présence des LT mémoires est possiblement associé avec leur efficacité à inhiber la prolifération de ces derniers.

### *Potentiel de survie des lymphocytes B en culture mixte autologue*

Après avoir étudié la prolifération des LB en présence des différentes populations de LT, nous avons testé leur potentiel de survie.



**FIGURE 39 : En présence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, mémoires et CD8<sup>+</sup>, les cellules B survivent de la même manière.** A) Pourcentage de cellules B en apoptose. B) Pourcentage de LB en nécrose. Graphiques représentatifs de 4 expériences.

Nous avons constaté que lorsque les LB sont cultivés avec les LT CD4<sup>+</sup> mémoires, CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup>, le pourcentage de cellules vivantes est élevé et identiques dans les trois conditions de cultures (FIG 39 A et B). Ces résultats suggèrent que l'incapacité des LB à inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et CD8<sup>+</sup> n'est pas due à un défaut de survie.

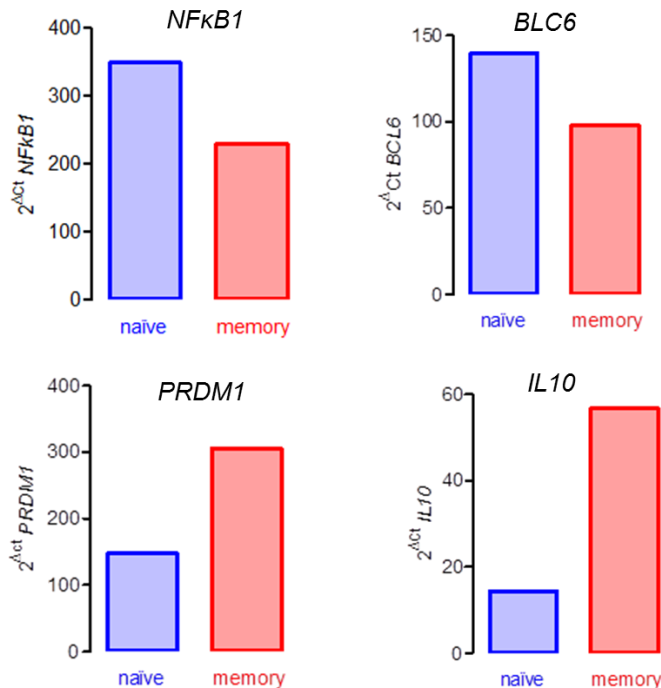
En conclusion, les cellules B inhibent la réponse des LT CD4<sup>+</sup> mémoires en limitant leur prolifération et en induisant leur mort. En outre, les cellules T mémoires induisent une prolifération importante des LB. Ces données démontrent que la régulation de la prolifération ainsi que l'induction de mort orchestrées par les LB sont dépendantes de la cible cellulaire T en présence.

### **3) Un programme transcriptionnel spécifique pour les lymphocytes B suppresseurs ?**

En présence des LT, les cellules B prolifèrent, inhibent la prolifération des LT, et peuvent induire la mort de ces derniers. Ces fonctions que présentent les cellules B sont certainement assurées suite à une modulation de l'expression de certains gènes. Voici pourquoi nous avons étudié le programme transcriptionnel des LB mis en culture avec les LT CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs. Jusqu'ici, la condition de culture avec les LT CD8<sup>+</sup> a été utilisée en contrôle, afin de comparer les différences intrinsèques aux populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Etant donné que les cultures mixtes avec les populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs ont montré des fonctions cellulaires B opposées, nous nous sommes restreint à l'expression génique des cellules B cultivées avec les populations CD4<sup>+</sup> mémoire et naïve.

A 3 jours de culture, les cellules B ont été isolées des cultures mixtes à l'aide d'un outil de sélection positive. Ensuite, les ARNm ont été extraits des LB cultivés avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs ou mémoires. Nous avons alors étudié l'expression de 4 gènes (*NFκB1*, *BCL6*, *PRDM1*, *IL10*) choisis afin d'avoir des données préliminaires avant d'envisager des analyses sur un plus grand nombre de gènes.

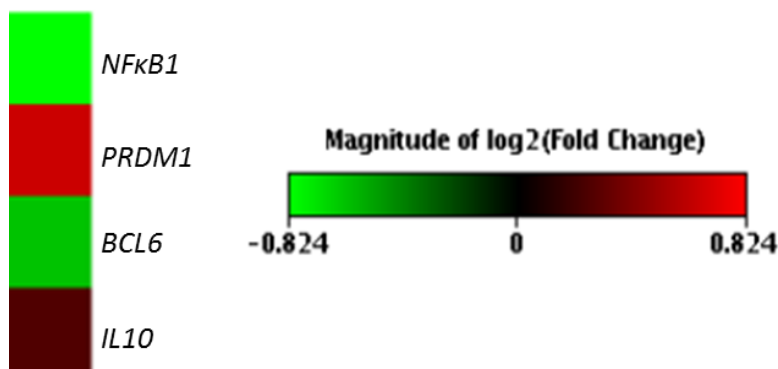




**FIGURE 40 : Etude de l'expression de *NFκB1*, *BCL6*, *PRDM1* et *IL10* par les cellules B isolées après avoir été cultivées avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs.** Par PCR quantitative, l'expression de *NFκB1*, *BCL6*, *PRDM1* et *IL10* a été quantifiée par la formule  $2^{-\Delta Ct}$  relative aux gènes de ménage *GAPDH*. Les graphiques représentent les valeurs obtenues sur un pool d'ADNc provenant d'ARNm extraits des cellules B de 3 témoins.

Nous avons constaté que les cellules B cultivées avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs expriment plus fortement *NFκB1* et *BCL6*, tandis qu'elles expriment plus faiblement *PRDM1* et *IL10* en comparaison aux LB cultivés avec les LT CD4<sup>+</sup> mémoires (FIG. 40). Les résultats concernant *BCL6* et *PRDM1* sont en adéquation avec les données de la littérature, puisque leur expression s'oppose au cours de la différenciation terminale en plasmocytes. Enfin, il est intéressant de noter que les cellules B régulatrices des LT CD4<sup>+</sup> mémoires ont une forte expression d'*IL10*. Cette observation suggère un possible rôle suppresseur de l'IL-10 sur les fonctions de prolifération et de survie des LT CD4<sup>+</sup> mémoires.

Pour conclure, nous avons choisi une autre représentation qui permet de visualiser la hausse ou la diminution de l'expression d'un gène entre deux conditions (fold change).



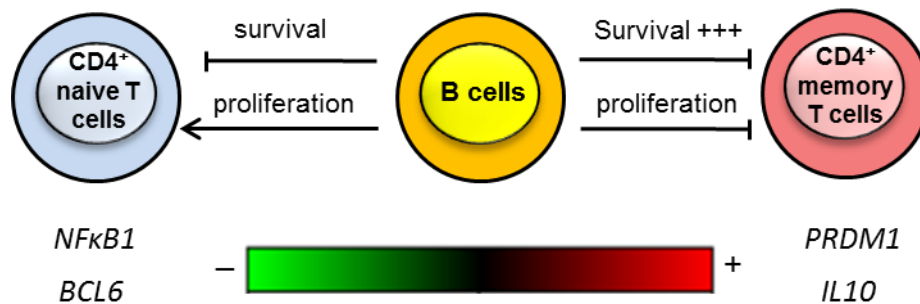
**FIGURE 41 :** « Heat Map » représentant l'expression de *NFκB1*, *BCL6*, *PRDM1* et *IL10* par les cellules B cultivées avec les lymphocytes T mémoires en comparaison aux lymphocytes T naïfs.

La « Heat Map » représente l'expression de *NFκB1*, *PRDM1*, *BCL6* et *IL10* dans les cellules B cultivées avec des LT CD4<sup>+</sup> mémoires, la condition de référence étant celle avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs (FIG. 41). Les résultats obtenus avec cette méthode d'analyse sont identiques aux observations de la FIGURE 40 et montre une hausse de l'expression de *PRDM1* et *IL10* dans les LB qui inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> mémoires en comparaison aux cellules B qui induisent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs.

### *Conclusion*

Au cours de ce travail, nous avons identifié deux conditions de culture qui pourraient permettre d'étudier les gènes modulés par des cellules B régulatrices en comparaison à des LB stimulateurs. En effet, nous montrons que, malgré le fait que certaines populations de LB soient plus régulatrices que d'autres, l'ensemble du compartiment lymphocytaire B est capable d'inhiber la prolifération et d'induire la mort des cellules T, et cela de façon spécifique des LT CD4<sup>+</sup> mémoires (lorsqu'ils sont isolés des autres LT) (FIG. 42). Ces données intéressantes suggèrent que, l'activité inhibitrice ou suppressive des LB est dépendante de la cible cellulaire qu'ils rencontrent. En outre, il est possible que l'inhibition de la prolifération des LT soit exercée par certaines cellules B tandis que d'autres induisent la mort des LT CD4<sup>+</sup> mémoires. Il serait donc enrichissant de trier des populations de LB afin de comparer leur potentiel régulateur face aux fonctions des LT. Les différences fonctionnelles observées entre les deux conditions de culture sont soutenues par des variations d'expression des gènes *NFκB1*,

*PRDM1*, *BCL6* et *IL10*. Les cellules B qui inhibent la prolifération et induisent la mort des LT CD4<sup>+</sup> mémoires surexpriment *IL10* et *PRDM1*, tandis que ceux qui induisent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs expriment plus fortement *BCL6* et *NFκB1*. Pour poursuivre cette étude, nous souhaitons étudier l'expression d'un plus grand nombre de gènes par RT<sup>2</sup>-PCR array afin de faire un « screening » des gènes différemment exprimés dans le but de déterminer s'il existe une voie de transduction spécifiquement associée à une fonction inhibitrice des cellules B. *In fine*, remonter une ou plusieurs de ces voies nous permettra peut-être d'associer un marqueur membranaire ou une cytokine produite en adéquation avec la capacité des cellules B à réguler certaines fonctions des LT.



**FIGURE 42 : Les lymphocytes B inhibent les fonctions de prolifération et de survie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, possiblement *via* une surexpression de *PRDM1* et *IL10*.**

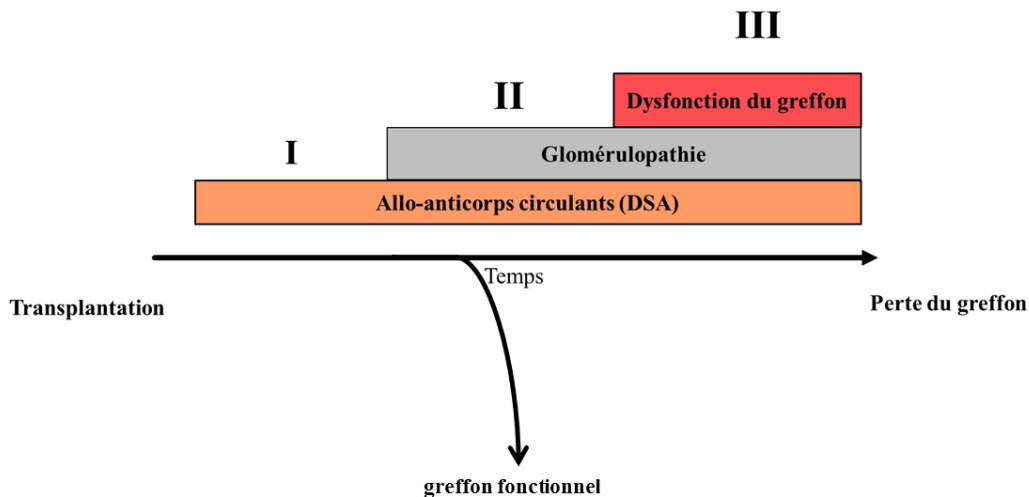
### III. Les lymphocytes B régulateurs en transplantation rénale

La transplantation rénale est le traitement de choix dans les maladies où la fonction du rein est altérée. Malgré l'utilisation de traitements immunosuppresseurs, le rejet de greffe chronique reste un problème majeur en transplantation. Pendant de nombreuses années, les immunothérapies ont ciblé les cellules T, et ont été montrées efficaces pour prévenir le rejet cellulaire aigu. Cependant, la réponse humorale des cellules B et le rejet chronique de l'allogreffe sont devenus des préoccupations importantes. Le fait que les cellules B puissent sécréter des alloAc et infiltrer les transplants les impliquent fortement dans le rejet de greffe chronique. L'immunothérapie par un Ac anti-CD20 déplaçant les cellules B peut cependant ne pas apporter de bénéfice, probablement car certaines populations supprimées contribuent à la tolérance du transplant. En effet, un rôle protecteur des Breg a été démontré chez des souris transplantées (Lee, Kim et al. 2012), et chez l'Homme, il a été suspecté une contribution des LB Tr. dans la tolérance périphérique (Nouel, Simon et al. 2014).

L'étude que nous allons présenter ici se base sur un travail préalable de notre équipe. En 2013, Nouël *et al.* ont observé une anomalie de distribution ainsi qu'un défaut fonctionnel des LB issus de patients atteints d'un cABMR. En effet, en comparaison aux patients stables, ceux qui développent un rejet possèdent plus de cellules B mémoires IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> et moins de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>. De plus, *in vitro*, le compartiment lymphocytaire B des patients cABMR n'était pas apte à inhiber la prolifération et la sécrétion de cytokines inflammatoires des LT autologues (Nouel, Segalen et al. 2014). L'étude qui va suivre poursuit ces travaux dans le but de comprendre d'avantage l'implication des cellules B dans l'émergence du cABMR.

## A) Lymphocytes B transitionnels et alloimmunisation : étude BHL (B lymphocytes in humoral rejection and alloimmunisation)

L'objectif principal de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes dépendants des lymphocytes B à l'origine du cABMR. Une attention particulière a été portée sur les mécanismes pouvant expliquer l'histoire naturelle du rejet humoral chronique et des formes de passage DSA (donor specific antibodies) négatifs vers DSA positifs, et de DSA positifs vers les lésions histologiques (FIG. 43). Ainsi, nous souhaitons déterminer pourquoi certains patients qui possèdent des DSA (étape I) ne vont pas développer de cABMR et auront un greffon fonctionnel, tandis que d'autres vont entrer dans les phases tardives de développement de ce rejet (étapes II et III).



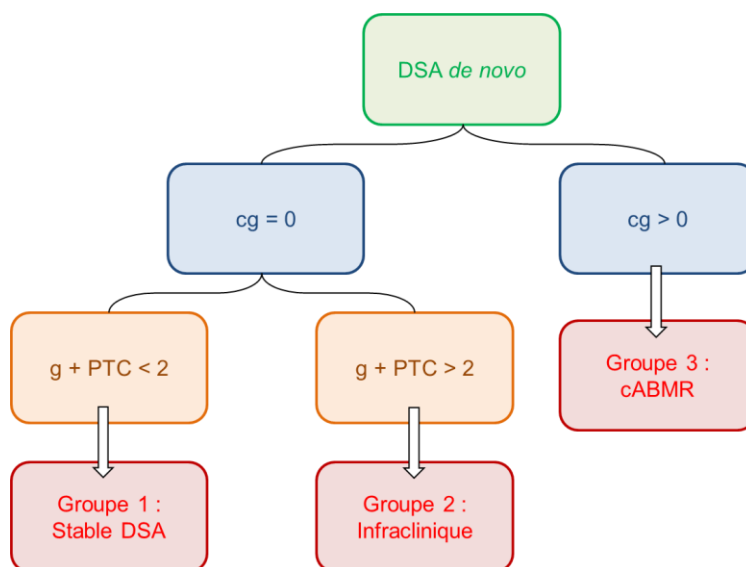
**FIGURE 43 : Les étapes du rejet humoral chronique.** Le cABMR se caractérise par trois phases principales de développement. D'abord survient la présence de DSA. Puis, il est observé chez les patients une glomérulopathie résultant d'atteintes tissulaires et d'infiltrats cellulaires. Enfin, la dernière phase critique est définie par une perturbation des fonctions rénales.

L'étude de cohorte BHL a été réalisée en aveugle et avec la participation de 13 centres de transplantation rénale en France, faisant partie du groupe Spiesser. Cette étude a été initiée en collaboration avec le service de néphrologie de la Cavale Blanche du CHRU de Brest. 101 patients DSA<sup>+</sup> ont été inclus et la durée des inclusions a été d'environ 3 ans (Table 4). Les groupes ont été complétés avec des patients inclus dans l'étude de Nouël *et al.* (Nouel, Segalen *et al.* 2014).

**Table 4 : Caractéristiques des patients de l'étude BHL.**

<b>Patients characteristics</b>	<b>Gr1 (ST-DSA<sup>+</sup>)</b>	<b>Gr2 (Infra)</b>	<b>Gr3 (cABMR)</b>	<b>Gr4 (ST)</b>
Total number (n)	38	14	46	42
Mean age (SD)	53,56(11,5)	51,5(17,3)	54.8(14,07)	54,6(12,2)
Mean (months) delay from transplantation (SD)	82,0 (69,4)	80,5(81,8)	114,7(69,1)	39,96(39,77)

Nous disposons d'un groupe de volontaires sains (n=35) et d'un groupe de patients stables greffés depuis plus d'un an, ayant une fonction rénale stable, et qui ne possèdent pas de DSA (n=42). Les patients DSA<sup>+</sup> ont été séparés en 3 groupes suivant les classifications présentées en FIGURE 44. Expérimentalement, nous avons réalisé des analyses phénotypiques sur les prélèvements sanguins de 101 patients afin d'étudier la distribution cellulaire des populations de LB. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons tout particulièrement à la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>. En parallèle, nous avons réalisé des expériences fonctionnelles au travers de cultures mixtes *in vitro*, dans le but d'étudier l'effet des LB de patients sur la prolifération des LT autologues. L'étude BHL est terminée et nous disposons dorénavant de données cliniques qui ont permis de réaliser des groupes de patients DSA<sup>+</sup> (FIG. 44). Les groupes ont été créés suivant la classification de Banff de 2013 (Haas, Sis et al. 2014). Parmi les patients transplantés qui produisent des DSA *de novo*, sont distingués ceux ayant un critère pour la glomérulopathie d'allogreffe égal à 0 (cg = 0), et ceux avec un cg > 0. Les patients avec un cg = 0 ont été séparés en deux sous-groupes en fonction des scores de la glomérulite (g) et de la capillarite péri-tubulaire (PTC). Les patients ayant un score g + PTC < 2 sont considérés comme stables DSA<sup>+</sup>. En revanche, ceux ayant un score g + PTC > 2 représentent un groupe ABMR infraclinique où des lésions histologiques ont été observées, sans qu'il n'y ait de dysfonction rénale comme dans le cABMR. Des précisions sur les critères utilisés sont disponibles en Table 5.



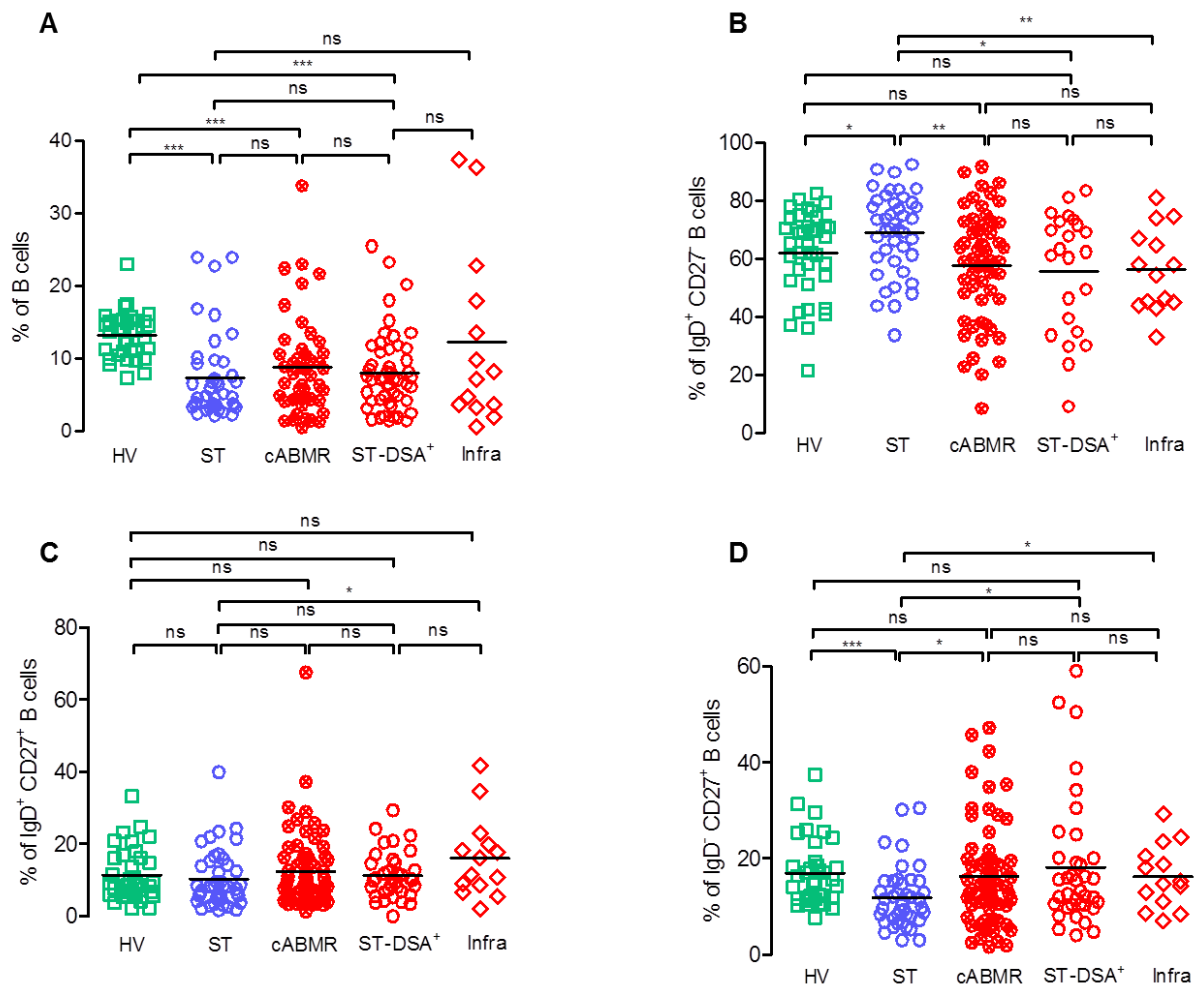
**FIGURE 44 : Classification des patients DSA<sup>+</sup> de l'étude BHL, en fonction des observations histologiques faites sur les biopsies de rein.**

**Table 5 : Critères histologiques et scores des lésions, définis par la classification de Banff.**

Critère	Score	Définition
Glomérulopathie d'allogreffe (cg)	cg0	Pas de doublement des membranes basales (GBM)
	cg1	GBM partiel
	cg2	GBM touchant 26 à 50% des boucles capillaires périphériques
	cg3	GBM touchant plus de 50% des boucles capillaires périphériques
Glomérulite (g)	g0	Pas de glomérulite
	g1	Glomérulites dans moins de 25% des glomérules
	g2	Glomérulites globales ou segmentaires dans 25 à 75% des glomérules
	g3	Glomérulites globales dans plus de 75% des glomérules
Capillarite péri tubulaire (PTC)	PTC0	Pas de PTC corticale ou < 10% de PTCs avec inflammation
	PTC1	≥ 10% de capillaires péri tubulaires corticaux avec capillarite, avec un maximum de 3 à 4 cellules inflammatoires luminales
	PTC2	≥ 10% de capillaires péri tubulaires corticaux avec capillarite, avec un maximum de 5 à 10 cellules inflammatoires luminales
	PTC3	≥ 10% de capillaires péri tubulaires corticaux avec capillarite, avec plus de 10 cellules inflammatoires luminales

## 1) Distribution des populations de lymphocytes B chez les patients alloimmunisés

Dans un premier temps, nous avons étudié la distribution des populations de LB par cytométrie en flux chez des volontaires sains (HV), des patients stables sans DSA (ST), et des patients stables avec DSA (ST-DSA<sup>+</sup>). Nous avons également réalisé cette analyse pour les patients des groupes cABMR et infraclinique (Infra) (FIG. 45 et Table 4). Nous n'avons pas encore les valeurs absolues pour quantifier les cellules circulantes.

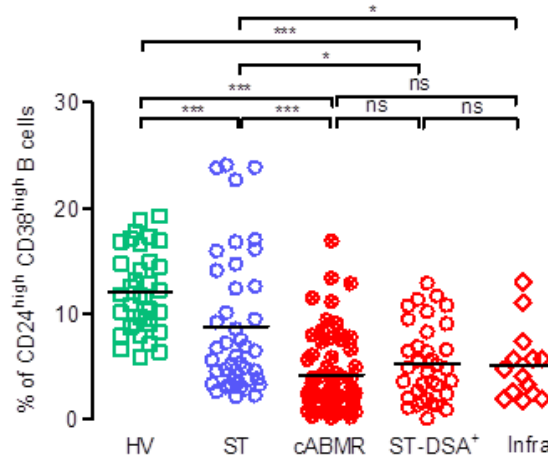


**FIGURE 45 : Distribution des lymphocytes B dans les groupes de patients de l'étude BHL.** A) Pourcentage des LB CD19<sup>+</sup> parmi les lymphocytes chez les volontaires sains (HV n=35), les patients stables (ST n=42), les patients atteints d'un rejet humoral chronique (cABMR n=57), les patients stables avec DSA (ST-DSA<sup>+</sup> n=23), et chez les patients du groupe ABMR infraclinique (Infra n=14). B) Pourcentage parmi les cellules CD19<sup>+</sup> des LB IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>. C) Pourcentage des LB mémoires pré-switch IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>. D) Pourcentage des LB mémoires post-switch IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. Tests statistiques de Mann-Whitney.



De façon générale, les patients transplantés, qu'ils aient des DSA ou non, ont un pourcentage de LB inférieur au groupe témoin (FIG. 45 A). Nous avons ensuite étudié la distribution cellulaire en fonction de l'expression de CD27 et de l'IgD. Nous avons ainsi observé que les patients stables sans DSA ont un pourcentage de LB CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> (dont la majorité est des cellules B matures) supérieur à celui des volontaires sains, des patients cABMR, des patients ST-DSA<sup>+</sup> et Infra (FIG. 45 B). En ce qui concerne les pourcentages de cellules B mémoires pré-switch IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>, nous n'avons pas observé de différences entre les groupes HV, ST, ST-DSA<sup>+</sup> et cABMR (FIG. 45 C). Il semblerait toutefois que les patients DSA<sup>+</sup> ayant des lésions histologiques (Infra) aient plus de LB mémoires pré-switch que les patients ST. Enfin, nous nous sommes intéressés à la population des cellules B mémoires post-switch IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. Il a été intéressant de constater que les 3 groupes de patients de l'étude BHL DSA<sup>+</sup>, possèdent d'avantage de LB mémoires post-switch en comparaison aux patients stables sans DSA (FIG. 45 D). Ces données laissent à penser que la présence d'alloAg favorise la commutation de classe, probablement impliquée dans la réponse humorale anti-greffon.

Nous poursuivons cette étude phénotypique en apportant une attention toute particulière à la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>.

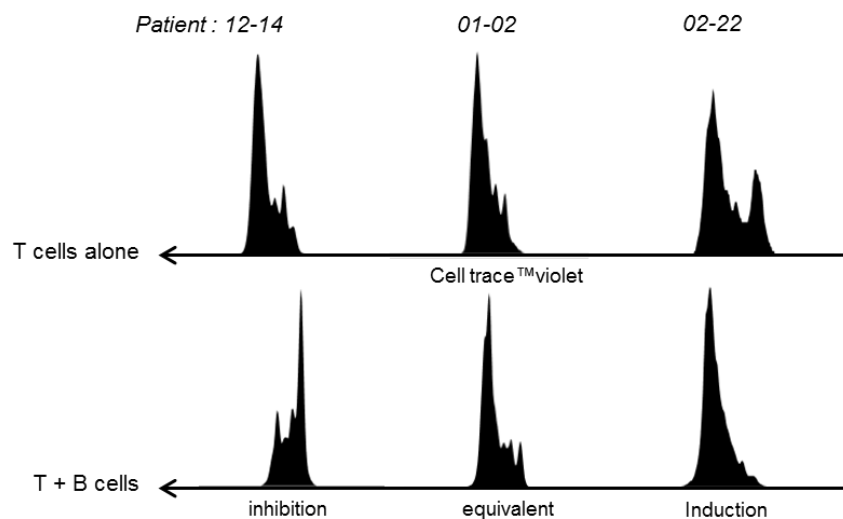


**FIGURE 46 : Les patients alloimmunisés ont un pourcentage de lymphocytes B transitionnels inférieur à celui des patients stables.** Pourcentage de cellules B CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> parmi les LB. Tests statistiques de Mann-Whitney.

Les patients des groupes cABMR, ST-DSA<sup>+</sup> et Infra possèdent moins de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> que les volontaires sains et les patients stables sans DSA (FIG. 46). En revanche, il n'existe pas de différence entre le pourcentage de LB Tr. des patients qui ont développé un rejet et les patients stables avec DSA. Par conséquent, tout comme pour la population des cellules B mémoires post-switch, l'anomalie de distribution observée pour les LB Tr. ne semble pas être typique du rejet humoral chronique. Il semblerait que la baisse des LB Tr. ainsi que la hausse des cellules B mémoires post-switch (déjà observées dans le cABMR (Noel, Segalen et al. 2014)) pourraient être associées avec l'émergence des DSA.

## 2) Les cellules B des patients alloimmunisés sont-elles inhibitrices ?

Après avoir observé une distribution particulière dans le compartiment lymphocytaire B des patients greffés possédant des alloAc, nous nous sommes intéressés au potentiel qu'ont leurs cellules B pour réguler la prolifération des cellules T autologues. L'étude BHL a été réalisée en aveugle. Les analyses qui vont suivre ont d'abord été faites sans la connaissance des diagnostics (qui nous sont parvenus que très récemment), nous n'y distinguerons donc pas les 3 groupes de patients DSA<sup>+</sup> (cABMR, ST-DSA<sup>+</sup> et Infra),



**FIGURE 47 : Représentation des trois effets possibles des lymphocytes B sur la prolifération des cellules T de patients alloimmunisés.** Les LT ont été marqués avec une sonde Cell trace<sup>™</sup> violet puis cultivés avec ou sans les LB autologues en présence d'Ac anti-CD3, anti-CD28 et de motifs CpG-ODN. La prolifération a été étudiée après 4 jours de culture.

Il a été décrit dans l'étude de Nouël *et al.*, (qui précède celle BHL) que les cellules B de patients atteints d'un cABMR sont défaillantes pour inhiber la prolifération des LT (Nouël, Segalen *et al.* 2014). Il a été intéressant de constater que les LB des patients DSA<sup>+</sup> ont trois effets différents sur la prolifération des LT autologues. En effet, ils peuvent inhiber fortement la prolifération des cellules T, n'avoir quasi aucun effet, ou bien induire cette prolifération (FIG. 47). L'étape suivante a consisté en la standardisation des résultats numériques obtenus sur la prolifération des LT en présence et en l'absence de cellules B.

### *Comparaison des méthodes de calcul pour la prolifération des lymphocytes T*

Pour la comparaison des méthodes, nous avons utilisé le calcul de différence de prolifération présenté en FIGURE 35. Plus ce delta ( $\Delta$  prolifération index) se rapproche de 0 ou devient négatif, plus les LB ont une tendance à induire la prolifération des cellules T.

$$\Delta \text{ prolifération index} = \text{index de prolifération des LT} - \text{index de prolifération des LT} + \text{LB}$$

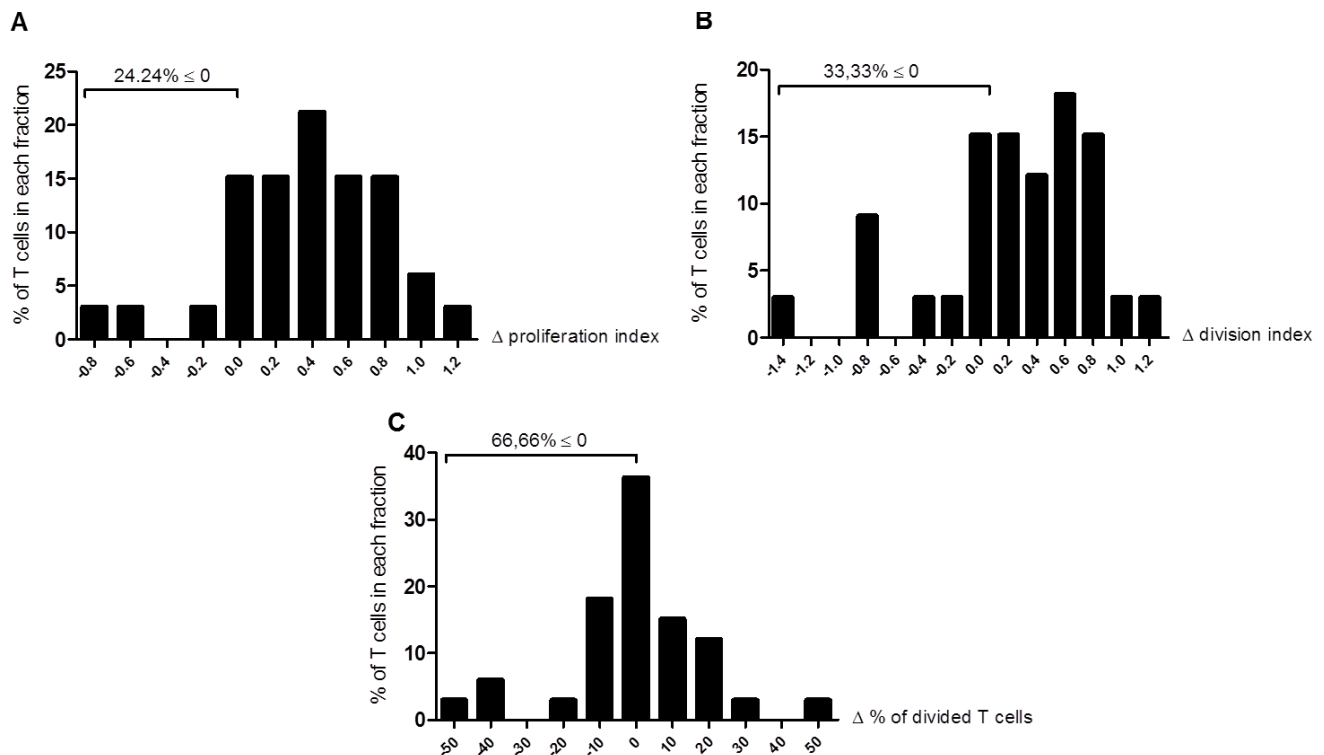
L'index de prolifération des LT représente le nombre de générations créées par les cellules qui sont entrées en division (il n'inclue pas la génération G0). Il existe un second index qui reflète le nombre global des divisions cellulaires en prenant en compte les cellules qui ne sont pas entrées en division. Il est appelé index de division.

$$\Delta \text{ division index} = \text{index de division des LT} - \text{index de division des LT} + \text{LB}$$

Afin d'interpréter les résultats des cultures de façon exhaustive et rigoureuse, nous avons utilisé ces deux index. Une troisième option d'interprétation nous était offerte. Il s'agissait de considérer le pourcentage total de cellules qui ont proliféré en ne tenant pas compte du nombre de division. A partir du pourcentage de cellules en division nous avons également déduit un Delta :  $\Delta$  % of divided T cells.

$$\Delta \text{ \% of divided T cells} = \% \text{ LT en prolifération} - \% \text{ LT en prolifération en présence de LB}$$

En conclusion, un Delta inférieur ou égal à 0, signifie que les cellules B n'ont pas inhibé la prolifération des LT, et cela quel que soit la formule utilisée. Nous avons choisis trois méthodes de mesure différentes afin de donner de la puissance à notre analyse.



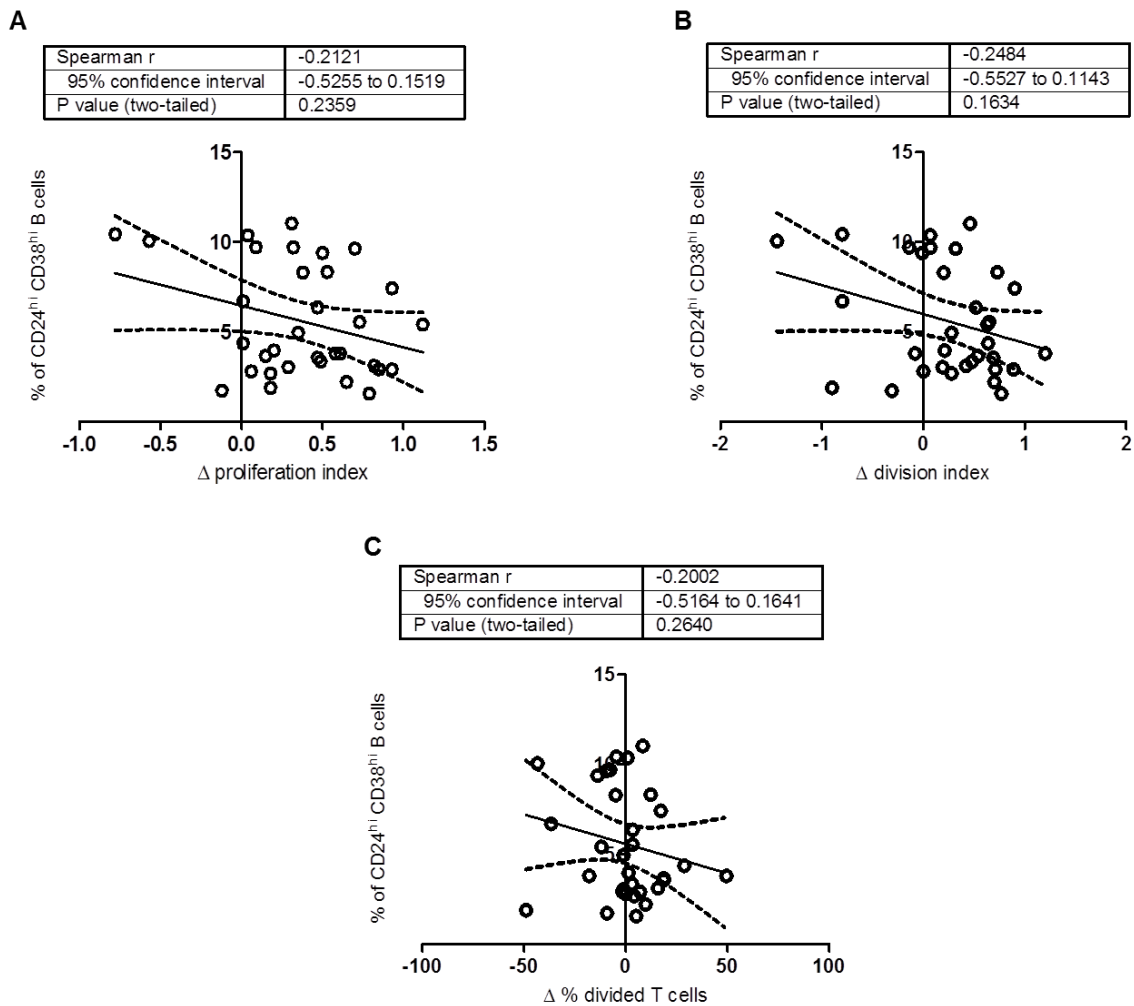
**FIGURE 48 : Représentation de l'impact des cellules B de 33 patients alloimmunisés sur la prolifération de leurs lymphocytes T.** A) % de cellules T réparties dans chacune des fractions du  $\Delta$  prolifération index. B) % de LT dans chacune des fractions du  $\Delta$  division index. C) % de LT dans les fractions définies après calcul du  $\Delta$  % of divided T cells.

Au premier abord, nous pouvons constater que les trois formules n'offrent pas le même type de résultat. En effet, si l'on considère l'index de prolifération, 24.24% des cellules B de patients DSA<sup>+</sup> n'inhibent pas la prolifération des LT (FIG. 48 A), contre 33.33% si l'on utilise l'index de division (FIG. 48 B). Enfin, lorsque nous avons utilisé la formule basée sur le % de cellules T qui entrent en division, il a été montré que 66.66% des cellules B n'inhibent pas l'entrée en prolifération des LT (FIG. 48 C).

Il paraît difficile de définir un seuil qui établit catégoriquement à partir de quelle valeur numérique du  $\Delta$  les cellules B d'un patient sont inhibitrices de la prolifération des LT. L'option que nous avons envisagée a été

d'associer les résultats obtenus sur l'inhibition de la prolifération des cellules T avec le pourcentage des LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, définis comme étant impliqués dans la tolérance périphérique.

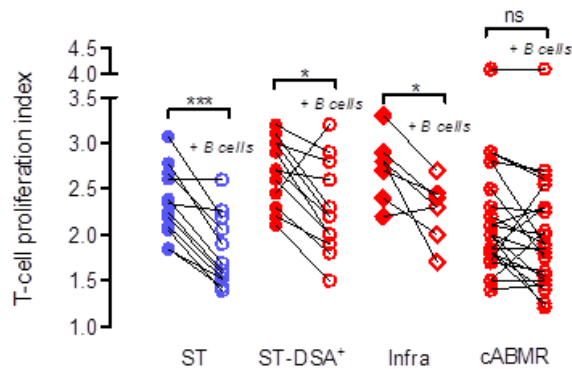
*Chez les patients alloimmunisés, les lymphocytes B transitionnels ne sont pas associés avec l'inhibition de la prolifération des cellules T*



**FIGURE 49 : Corrélation entre le pourcentage des lymphocytes B transitionnels et l'inhibition de la prolifération des cellules T des patients alloimmunisés.** Tests de Spearman avec un intervalle de confiance de 95%. A) En Y : % LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, X :  $\Delta$  prolifération index. B) En Y : % LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, X :  $\Delta$  division index. C) En Y : % LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, X :  $\Delta$  % divided T cells.

L'index de prolifération (FIG. 49 A), l'index de division (FIG. 49 B) ou bien le nombre de cellules T en division (FIG. 49 C) ne permettent pas d'établir une corrélation entre l'inhibition de la prolifération des LT et le pourcentage de LB CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> que possèdent les patients alloimmunisés. En effet, le test de Spearman n'est significatif pour aucune des trois méthodes.

Pour les analyses statistiques présentées précédemment, nous avons souhaité comparer les inhibitions de la prolifération T, en conservant un groupe de patients DSA<sup>+</sup> hétérogènes. Nous avons ensuite procédé à des analyses sur l'index de la prolifération des LT cultivés avec et sans LB, en reprenant les groupes ST, ST-DSA<sup>+</sup>, Infra et cABMR.



**FIGURE 50 : Les cellules B des patients atteints d'un rejet humoral chronique n'inhibent pas la prolifération des lymphocytes T.** Index de prolifération représentés pour les LT des patients ST (n=12), ST-DSA<sup>+</sup> (n=12), Infra (n=7) et cABMR (n=23), cultivés avec et sans LB. Tests statistiques de Mann-Whitney.

Le groupe de patients cABMR regroupent également les patients atteints d'un rejet utilisés pour l'étude de Nouël *et al.* (n=16) (Nouël, Segalen *et al.* 2014). Nous confirmons avec un nombre plus grand de patients que les cellules B de patients cABMR sont défaillantes pour limiter la prolifération des LT (FIG. 50), contrairement aux patients stables sans DSA. Il a été intéressant de constater que les LB patients DSA<sup>+</sup> qui n'ont pas de rejet (ST-DSA<sup>+</sup> et Infra) sont capables de réguler la prolifération T. Ces données suggèrent que l'anomalie fonctionnelle des cellules B de patients alloimmunisés survient avec le rejet humoral chronique. Les anomalies de distribution précèderaient donc ce défaut des cellules B à inhiber la réponse T. Il nous reste à récupérer les données concernant les index de divisions et le pourcentage de cellules en divisions.

La baisse de fréquence des cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> présentée en FIGURE 46 peut, entre autre, être expliquée par l'utilisation de traitements immunosuppresseurs particulièrement efficaces sur cette population B immatures. En poursuivant sur cette idée, nous nous sommes intéressés dans une étude longitudinale prospective à l'impact de la greffe sur la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>, ainsi qu'à l'effet des traitements de maintien utilisés en transplantation. Il est important de préciser qu'en comparaison à l'étude BHL, celle qui va suivre s'est positionné en début de greffe (entre 0 et 12 mois).

## **B) Suivi post-greffe des lymphocytes B transitionnels**

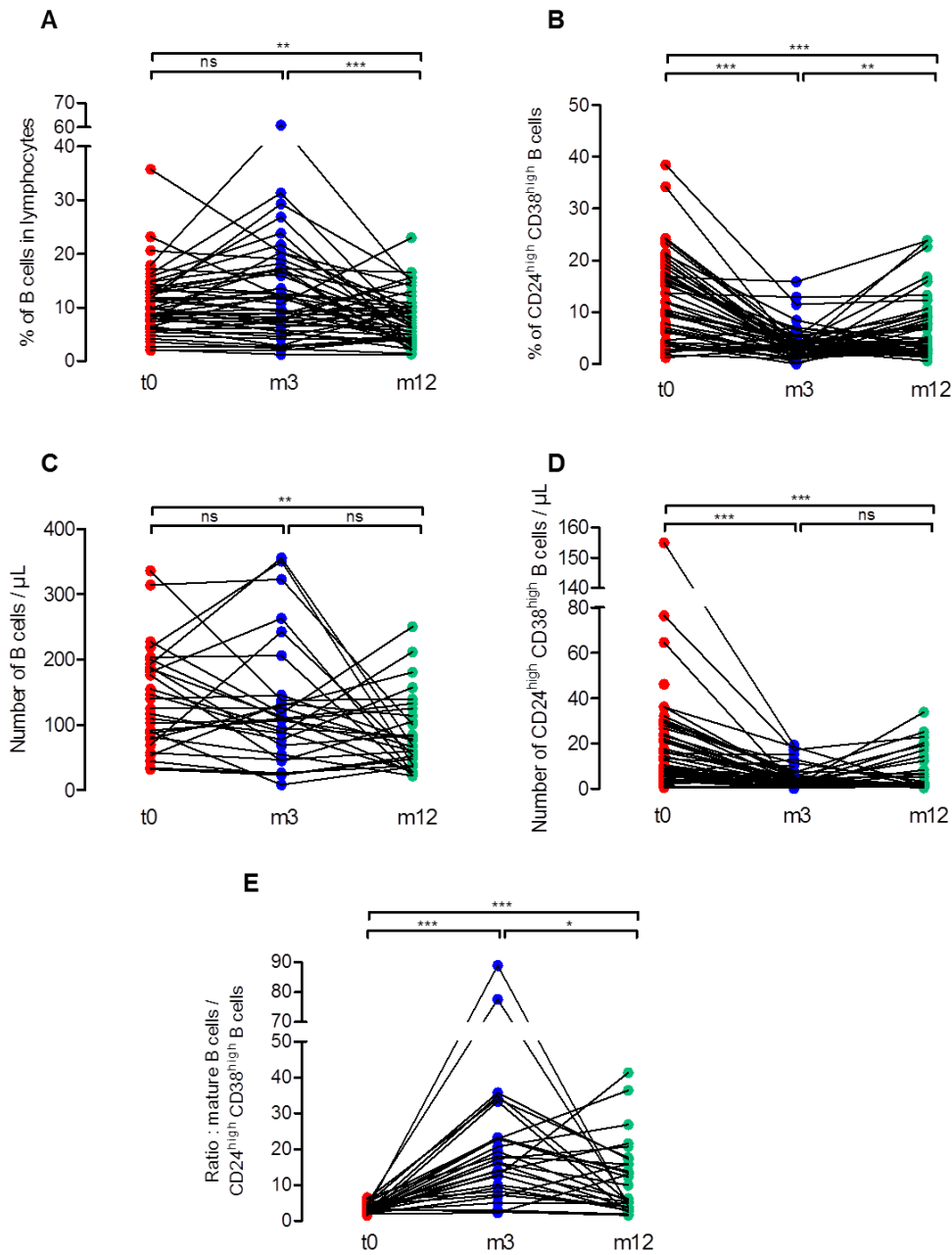
Pour cette étude, nous avons suivi l'évolution phénotypique du compartiment lymphocytaire B de 48 patients greffés. Nous avons récolté des données obtenues juste avant la greffe (t0), à 3 mois post-greffe (m3) puis à un an (m12). Les patients ont reçu un traitement d'induction pré-greffe. 7 ont bénéficié d'un traitement par des thymoglobulines et 41 par des Ac anti-IL-2R (Table 6). En ce qui concerne le traitement de maintien post-greffe, 43 des patients ont reçu de la cyclosporine et 5 ont été traités par des inhibiteurs de mTOR.

**Table 6 : Néphropathies et traitements d'induction pour les patients transplantés rénaux de l'étude longitudinale.** Tableau clinique récapitulatif des maladies en cause dans la dysfonction rénale et des traitements d'induction utilisés (Orange : maladies autoimmunes). ANCA : Ac anti-cytoplasme des polynucléaires, GNMP : glomérulopathie membranoproliférative, HSF : hyalinose segmentaire et focale, PKRD : polykystose rénale autosomique dominante, SHU : syndrome hémolytique et urémique.

Patients	Néphropathies	Traitements d'induction						
1	vasculaire	αIL-2R	18	goodpasture	Thymoglobulines	35	indéterminée	αIL-2R
2	diabète	αIL-2R	19	IgA	αIL-2R	36	PKRD	αIL-2R
3	IgA	αIL-2R	20	PKRD	αIL-2R	37	IgA	αIL-2R
4	vasculaire	αIL-2R	21	goodpasture	αIL-2R	38	HSF	αIL-2R
5	vasculaire	αIL-2R	22	vasculaire	αIL-2R	39	diabète	αIL-2R
6	PKRD	αIL-2R	23	IgA	αIL-2R	40	IgA	αIL-2R
7	obstructive	αIL-2R	24	HSF	αIL-2R	41	diabète	αIL-2R
8	indéterminée	Thymoglobulines	25	HSF	αIL-2R	42	IgA	Thymoglobulines
9	purpura rhumatoïde	αIL-2R	26	indéterminée	αIL-2R	43	HSF	αIL-2R
10	indéterminée	αIL-2R	27	obstructive	αIL-2R	44	indéterminée	αIL-2R
11	indéterminée	αIL-2R	28	IgA	αIL-2R	45	PKRD	αIL-2R
12	malformation	Thymoglobulines	29	GNMP	αIL-2R	46	HSF	αIL-2R
13	SHU typique	Thymoglobulines	30		αIL-2R	47	toxicité	αIL-2R
14	diabète	αIL-2R	31	IgA	αIL-2R	48	ANCA	Thymoglobulines
15	indéterminée	αIL-2R	32	PKRD	αIL-2R	49	vasculaire	αIL-2R
16	obstructive	αIL-2R	33	IgA	Thymoglobulines			
17	PKRD	αIL-2R	34	indéterminée	αIL-2R			



1) Les traitements de maintien immunosuppresseurs diminuent la fréquence des lymphocytes B transitionnels



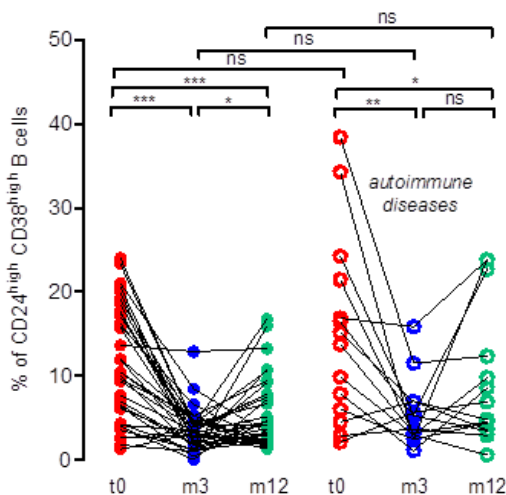
**FIGURE 51 : Pourcentages à t0, m3 et m12 des lymphocytes B totaux et transitionnels dans les 48 patients greffés. A) % de LB parmi les lymphocytes totaux. B) % de LB Tr. parmi les cellules B. C) Nombre de LB totaux par  $\mu$ L. D) Nombre de LB Tr. par  $\mu$ L. E) Ratio LB matures / LB Tr.**

Les patients greffés ont une baisse du pourcentage et du nombre absolu de LB circulants entre t0 et m12, la chute du pourcentage est observée entre m3 et m12 (FIG. 51 A et C). De plus, les patients ont une baisse drastique du pourcentage et du nombre absolu de LB Tr. à m3 (FIG. 51 B et D). La repopulation en cellules CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> semble être détectable (en pourcentage) à m12 (FIG. 51 B). Notons que la diminution des LB Tr. est en parallèle balancée par une hausse du pourcentage de cellules B matures. En effet, le ratio LB matures / LB Tr. est croissant de t0 à m12 (FIG. 51 E).

Les LB Tr. sont particulièrement sensibles à un contexte physiopathologique autoimmun. Nous avons donc envisagé d'étudier la fréquence des LB Tr. entre des patients dont la cause de la dysfonction rénale est une pathologie autoimmune.

## 2) Les patients atteints d'une maladie autoimmune pré-greffe n'ont pas une repopulation significative en cellules B transitionnelles à 12 mois

La greffe rénale est appliquée suite à un dysfonctionnement d'organe qui peut être la conséquence de maladies autoimmunes. Nous avons séparé les patients greffés en deux groupes. Le premier regroupe des patients qui n'ont pas eu de maladies autoimmunes (Table 5) (n=34), et le second prend en compte les patients dont l'autoimmunité a été à l'origine d'une dysfonction rénale (maladie à ANCA ou à IgA, GNMP, syndrome de Goodpasture) (n=14).

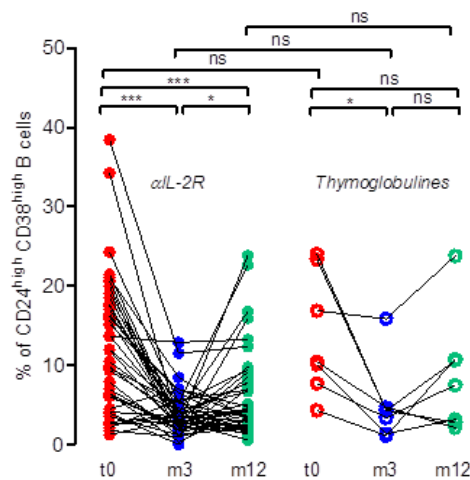


**FIGURE 52 : Pourcentages de lymphocytes B transitionnels à t0, m3 et m12 dans les patients ayant une maladie autoimmune cause de la dysfonction rénale.** Sur la gauche, Sur la droite sont représentés les pourcentages de LB Tr. dans les patients ayant eu une maladie autoimmune, en comparaison aux patients dont les maladies d'origine ne sont pas autoimmunes.

Les patients ayant eu une maladie auto-immune à l'origine de la nécessité de greffer ont une chute du pourcentage de LB Tr., tout comme les patients qui n'ont pas eu de maladie auto-immune. La principale différence entre ces groupes a été constatée à m12. En effet, les patients avec des maladies auto-immunes n'ont pas de hausse significative du pourcentage de cellules CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> entre de m3 à m12 (FIG. 52). Cette information intéressante suggère que la maladie d'origine pourrait conditionner la repopulation B à un an.

Après nous être intéressés aux maladies auto-immunes en cause dans la dysfonction rénale, nous avons envisagé de distinguer des groupes en fonction des traitements d'induction par thymoglobulines (n=7) ou par des Ac anti-IL-2R (n=41).

### 3) Les traitements d'induction pourraient conditionner la fréquence des cellules B transitionnelles observée à 12 mois post-greffe



**FIGURE 53 : Pourcentage des lymphocytes B transitionnels à t0, m3 et m12, en fonction du traitement par anticorps anti-IL-2R ou par thymoglobulines.**

Le groupe des patients traités par des thymoglobulines à t0 ne contient que 7 patients. Même si ce chiffre est faible, nous n'avons pas constaté de hausse du pourcentage de LB Tr. entre m3 et m12, contrairement à ce qui a été observé pour le groupe des patients traités par anti-IL-2R (FIG. 53). Il est possible que la repopulation du compartiment B à 12 mois soit influencée par le type de traitement d'induction appliqué avant la greffe. Une autre étude (THYMO B) qui vise à répondre à cette question est actuellement en cours au laboratoire.

## Conclusion sur les lymphocytes B transitionnels et la transplantation rénale

L'étude BHL a eu pour objectif de mieux comprendre l'histoire naturelle du rejet humoral chronique. Nous avons observé que la présence de DSA est responsable d'anomalies de distributions caractéristiques. En effet, les patients alloimmunisés (qu'ils aient développé un cABMR ou non) possèdent d'avantage de cellules B mémoires post-switch et moins de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> que les patients stables sans DSA. Les expériences fonctionnelles ont permis de mettre en évidence que la production de DSA n'est pas nécessairement associée avec un défaut des cellules B à limiter la prolifération des LT autologues. En effet, seuls les LB des patients qui ont développé un rejet du transplant ne sont pas performants pour inhiber la réponse T. Il semblerait que dans l'histoire naturelle du cABMR, les anomalies de distribution du compartiment lymphocytaire B précèdent les défauts fonctionnels (FIG. 54).

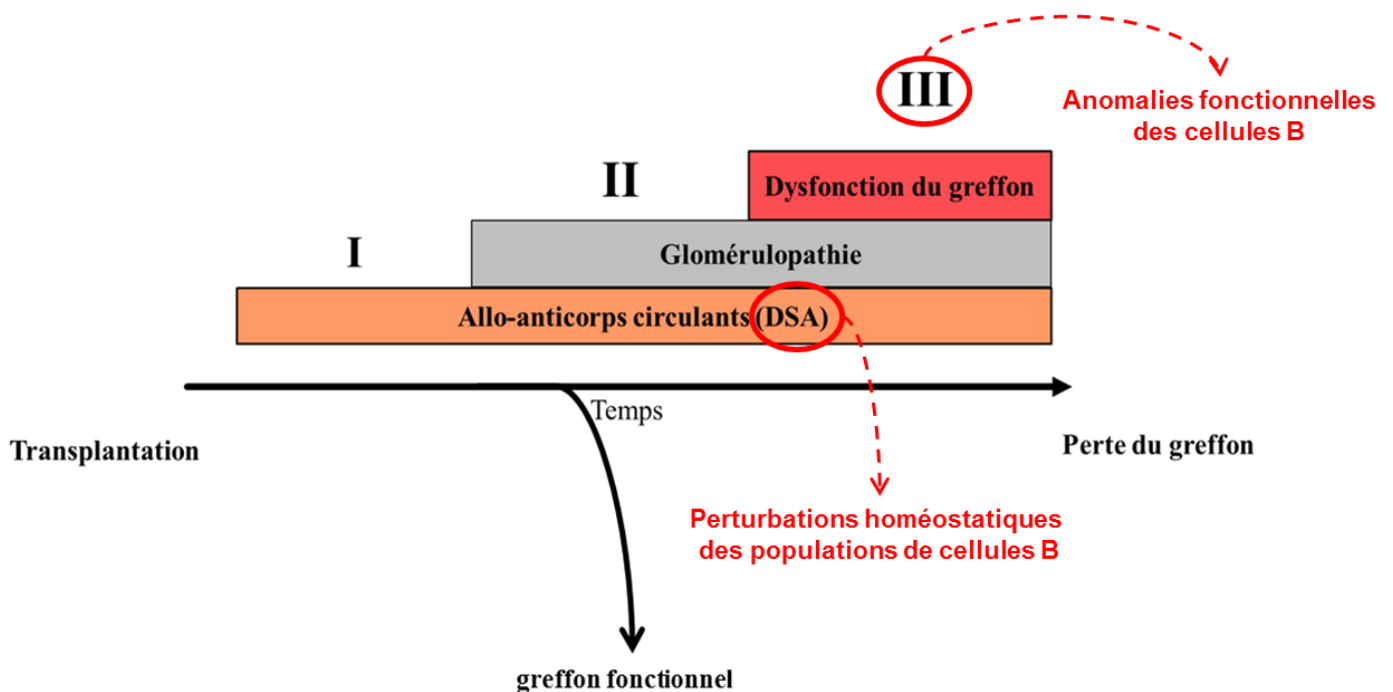


FIGURE 54 : Implication des lymphocytes B dans l'histoire naturelle du rejet humoral chronique.

Cependant, la fréquence des LB Tr. ne semble pas associée avec une inhibition de la prolifération T. Le rôle des cellules B Tr. dans la tolérance périphérique restent à éclaircir, notamment en étudiant d'autres fonctions régulatrices. Dans la première année suivant la greffe rénale, il est constaté une immunosuppression globale des LB par les traitements de maintien. La reconstitution du compartiment lymphocytaire est observée à un an. Cependant, les patients ayant reçu un traitement d'induction par thymoglobulines et les patients ayant souffert d'une maladie autoimmune pré-greffe sembleraient avoir un défaut de repopulation au niveau des LB Tr. Il est probable que le délai de reconstitution du compartiment lymphocytaire B pour atteindre une distribution normale soit supérieur à 12 mois. En effet, le nombre absolu et la fréquence des LB Tr. restent inférieurs à ceux observés avant la greffe pour l'ensemble de la cohorte. Ainsi, suivre l'évolution du compartiment lymphocytaire B sur une cinétique plus longue, permettra de mieux suivre l'impact des traitements de maintien et d'induction sur la repopulation des LB Tr.

# **DISCUSSION**

## **I. Caractérisation de populations cellulaires B régulatrices rares**

Il est probable qu'à l'heure actuelle, la connaissance de la totalité des populations cellulaires qui composent le compartiment lymphocytaire B n'a pas encore été établie. Il est d'ailleurs techniquement difficile d'être exhaustif et de compiler l'ensemble des marqueurs de différenciation et d'activation dans une même étude d'identification. Cependant, les avancées technologiques, notamment dans le domaine de la cytométrie en flux, permettent l'analyse simultanée de nombreux paramètres phénotypiques, et offrent des perspectives de découverte prometteuses sur la régulation B. Par exemple, la cytométrie de masse (CyTOF), qui repose sur l'utilisation d'Ac associés à des isotopes élémentaires (métaux lourds), permet l'étude simultanée d'un très grand nombre de marqueurs. De même, la « finesse » des études est déterminée par le nombre de paramètres étudiés. Ainsi, s'intéresser à l'expression de nombreuses protéines permet d'éclaircir avec précision la diversité cellulaire du compartiment lymphocytaire B.

### **A) Identification des populations de cellules B**

Les stades de développement qui composent l'ontogénèse B ont initialement été décrits chez la souris. La majorité des marqueurs de différenciation (CD24, CD38, CD21, CD23, IgD, IgM...) sont retrouvés exprimés à la fois par les cellules B murines et humaines. Cependant, certains marqueurs sont préférentiellement exprimés dans des organes précis. Par exemple, utiliser la combinaison CD21/CD24 chez la souris permet de distinguer les cellules B matures, les LB ZM, ainsi que les LB T1 et LB T2 parmi les LB spléniques IgM<sup>+</sup>. En réalisant, cette même analyse dans une rate humaine, les LB T1 CD21<sup>faibles</sup> CD24<sup>forts</sup> ne sont pas détectés, tandis qu'ils le sont dans le sang périphérique (Benitez, Weldon et al. 2014). Ces observations suggèrent qu'il est essentiel de tenir compte de l'organe et de l'espèce pour choisir des marqueurs permettant l'identification de populations cellulaires ayant une réelle relevance physiologique. Ainsi, il a été admis chez l'Homme, que les LB Tr. humains du sang périphérique sont CD10<sup>+</sup> CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> (Carsetti, Rosado et al. 2004; Suryani, Fulcher et al. 2010). Enfin, identifier des populations de Breg selon des phénotypes établis permet de réaliser des comparaisons rigoureuses entre les patients et les témoins, afin d'évaluer la présence d'éventuelles anomalies de distribution cellulaire.

## 1) Anomalies de distribution des cellules B transitionnelles

Les LB Tr. sont sous-représentés dans le cABMR et sur-représentés dans les patients atteints de SGS et de SLE. Cependant, il est important de considérer qu'une faible fréquence observée pour une population de LB, est nécessairement balancée par une hausse de la fréquence d'une autre population cellulaire. Par exemple, les patients atteints d'un cABMR qui ont un faible pourcentage de cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> ont une fréquence de LB mémoires CD27<sup>+</sup> augmentée (Nouel, Segalen et al. 2014). Les anomalies de pourcentages sont généralement associées à un défaut qualitatif dans la constitution du compartiment lymphocytaire B. En revanche, les anomalies qui concernent les valeurs absolues sont associées à un défaut quantitatif. Il est donc important de mettre en miroir ces deux informations qui soulignent d'un côté une perturbation dans le développement des cellules B, et de l'autre un défaut de génération cellulaire, d'initiation de la lignée B. Enfin, notons que les traitements appliqués aux patients ont un impact sur les pourcentages et valeurs absolues des populations de LB.

Se pose alors la question de l'impact d'anomalies qualitative et quantitative qui touchent des populations cellulaires très rares. En d'autres termes, quels sont les effets systémiques de l'absence ou de la sous-représentation d'une population cellulaire largement minoritaire ? De même, une population minoritaire peut-elle avoir une activité régulatrice suffisante pour moduler une réponse inflammatoire ?

Par exemple, nous avons constaté que les patients atteints de SGS et de SLE possèdent moins de LB T3 que les volontaires sains. Or, cette sous-population qui inhibe la prolifération des LT ne représente qu'environ 25% des LB Tr. dans les patients SGS contre environ 40% chez les témoins. Cela signifie que les LB T3 ne représentent que 4% de l'ensemble des LB totaux de témoins. Quel est leur impact régulateur *in vivo* ? Il a été décrit que les plasmablastes CD138<sup>+</sup> Blimp-1<sup>+</sup> représentent 0,34% des cellules présentes dans les organes lymphoïdes drainants de souris immunisées par MOG. Ces plasmablastes limitent le score clinique de l'EAE, au travers d'une production d'IL-10 (Matsumoto, Baba et al. 2014). Cette étude soutient le fait qu'une population rare est capable d'avoir un réel effet régulateur *in vivo*. En outre, seuls les modèles murins KO permettent d'évaluer l'impact de l'absence d'une population cellulaire de façon relativement spécifique. Par exemple, les souris déficientes pour la queue cytoplasmique Ig- $\alpha$  sont déficientes en LB T2 (Loder, Mutschler et al. 1999).



Cependant, il paraît difficilement envisageable de tester l'impact *in vivo* de la disparition d'une population enrichie en Breg chez l'Homme. C'est pour cela que les patients représentent une source d'étude essentielle pour les pathologies où les anomalies de distribution sont observées. Les maladies auto et alloimmunes où la tolérance immunologique est perturbée aident à la compréhension et à l'identification de populations B régulatrices. Dans notre cas, nous n'avons pu réaliser qu'une étude phénotypique des sous-populations de LB Tr. dans les patients autoimmuns. En effet, le faible nombre de cellules B à disposition ne nous a pas permis de réaliser des tris cellulaires *ex vivo*, afin d'estimer le potentiel régulateur des LB, notamment T3, provenant de patients.

## 2) Identification de nouvelles populations de lymphocytes B transitionnels

Les études d'identification des populations de Breg CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> et CD24<sup>forts</sup> CD27<sup>+</sup> ne s'intéressent qu'à deux marqueurs discriminants, dont CD24, qui est exprimés communément par ces deux populations. En outre, les LB CD24<sup>forts</sup> CD27<sup>+</sup> composent une population majoritaire du compartiment lymphocytaire B, puisqu'elle en représente environ 30%. En conséquence, il paraît exagéré de définir 30% des LB humains comme des Breg ou B10. En effet, nous suggérons que la caractérisation des sous-populations rares qui composent les LB Tr. et les LB CD24<sup>forts</sup> CD27<sup>+</sup> permettra de mieux apprécier leur réel potentiel régulateur.

Les récents outils bioinformatiques ont montré une grande utilité pour l'analyse de données multiparamétriques de cytométrie en flux. Identifier de nouvelles populations cellulaires rares dépend des marqueurs visés ainsi que du nombre de paramètres étudiés. En effet, il est primordial d'étudier l'expression de protéines qui ont une large gamme d'expression, ce qui permet une séparation efficace des populations de LB. Egalement, s'intéresser à un grand nombre de protéines membranaires permet d'aller étudier des phénotypes de plus en plus complexes. Cependant, plus le nombre de paramètres est grand plus il est difficile de réaliser une analyse manuelle. C'est là qu'interviennent les logiciels d'analyse automatisés.

Réaliser l'ensemble des combinaisons biaxiales possibles pour l'analyse de données obtenues sur 10 couleurs nous était compliqué. Nous avons alors utilisé le programme FLOCK afin d'analyser de façon automatisée et standardisée les fichiers de cytométrie en flux obtenus à partir d'échantillon de volontaires sains.

La difficulté principale de ce type d'analyse est que les résultats peuvent être difficiles à interpréter. En effet, nous avons identifié 8 populations (clusters) parmi les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup>. Certains clusters comme le 1 et le 7 représentent moins de 5% des LB Tr. De plus, des clusters ont montré des expressions similaires pour plusieurs des marqueurs de différenciation étudiés. La question qui se pose alors est de savoir si chacun de ces 8 clusters correspond réellement à une population cellulaire qui possède sa propre voie de différenciation et ses propres fonctions *in vivo*. Les études fonctionnelles permettent de répondre en partie à ce questionnement, notamment au travers de tests *in vitro* réalisés sur des populations isolées par tri cellulaire. Cependant, avant de réaliser ces études, il est impératif d'identifier des populations cellulaires, au travers de phénotypes les plus précis possibles. Nous avons alors fait le choix de regrouper certains clusters minoritaires selon des expressions communes de marqueurs majeurs de différenciation comme le BCR (IgD, IgM), et CD27. Ces trois protéines sont décrites pour être associées à des fonctions essentielles dans le développement des LB (Lutz, Ledermann et al. 1998; Tangye, Liu et al. 1998). Ce choix stratégique nous a permis d'identifier 4 sous-populations de LB Tr.

### *Les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup>*

L'expression de CD27 est attribuée aux cellules B mémoires, et il est important de noter que la littérature décrit les LB Tr. comme des cellules naïves CD27<sup>-</sup> (Palanichamy, Barnard et al. 2009). Or, notre analyse bioinformatique révèle que 7.4% ± 3.3 des LB Tr. de témoins expriment CD27. Cette nouvelle population jusqu'alors inconnue se démarque par une forte expression des marqueurs de co-stimulation CD80, CD86 et HLA-DR. De plus, elle présente de forts niveaux d'expression de CD25 et CD40. Ces données montrent que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont des cellules constitutivement activées. Elles sont donc potentiellement capables de répondre rapidement à des signaux, notamment innés, puisqu'elles expriment également fortement le TLR9. La découverte de cette population des LB Tr. CD27<sup>+</sup> soulève deux points majeurs sur l'identification d'un phénotype. D'abord, elle démontre que l'étude du marqueur CD27 nécessite d'être accompagnée par l'analyse de l'expression de marqueurs complémentaires. En effet, les LB mémoires CD27<sup>+</sup> du sang ne représenteraient pas nécessairement une population différenciée suite à un passage par les organes lymphoïdes secondaires, puisque nous évoquons dorénavant le terme de « LB Tr. mémoires », qui pourrait correspondre à un stade de différenciation précoce. Le

second point se penche sur la nomenclature des populations de LB. Il été admis jusqu'alors que les LB Tr. n'exprimaient pas CD27 (Suryani, Fulcher et al. 2010). Or, nous montrons que les phénotypes évoluent, et que le marqueur CD27 décrit pour les LB mémoires peut être exprimé par une partie des LB Tr.

### *Les lymphocytes B transitionnels de type 3*

Initialement, les LB Tr. ont été définis comme des cellules immatures exprimant fortement l'IgM de surface (Carsetti, Kohler et al. 1995). A l'inverse, une faible expression de l'IgM à la membrane a été remarquée pour certaines cellules B matures (Quach, Manjarrez-Orduno et al. 2011). Pour la première fois chez l'Homme, nous montrons que les LB Tr. n'expriment pas tous fortement l'IgM. En effet, nous avons identifié une sous-population CD19<sup>+</sup> CD24<sup>forte</sup> CD38<sup>forte</sup> qui a de faibles niveaux d'IgM en surface. Notons également que cette sous-population exprime faiblement CD10, ce qui sous-entend que ces cellules IgM<sup>faibles</sup> sont moins immatures que les LB T1 et T2. Nous avons fait le choix de les nommer LB T3, en partant du postulat que la faible expression de l'IgM est associée avec des fonctions cellulaires caractéristiques. Enfin, il serait intéressant d'étudier l'expression de CD1d dans chacune sous-populations de LB Tr., car cette glycoprotéine est associée avec la production d'IL-10.

## **B) Du phénotype aux études fonctionnelles**

Les analyses fonctionnelles et les phénotypes fournissent des informations complémentaires pour la caractérisation d'une population cellulaire, d'autant plus si cette population est nouvellement décrite. En effet, il est essentiel d'associer une ou plusieurs fonctions cellulaires à un phénotype précis.

### **1) L'engagement du récepteur d'antigène**

#### *Pourquoi les lymphocytes B transitionnels CD27<sup>+</sup> entrent-ils en nécrose ?*

Il est décrit que les LB T1 immatures possèdent un faible potentiel de survie suite à une stimulation de leur BCR (Sims, Ettinger et al. 2005). Nous avons en effet constaté dans nos expériences que les LB T1 que nous

définissons comme  $IgD^{faibles} IgM^{forts} CD10^{forts}$  et  $CD21^{faibles}$ , entrent en apoptose suite à une stimulation par un Ac anti-IgM. En outre, il a été intéressant de constater que les LB Tr.  $CD27^+$  ont une tendance à entrer en nécrose de façon précoce, même sans qu'il n'y ait eu d'engagement du BCR. De plus, contrairement aux LB T1, les LB Tr.  $CD27^+$  expriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces données suggèrent que les LB Tr.  $CD27^+$  nécessitent l'apport de signaux additionnels pour survivre en culture *in vitro*, comme des motifs CpG-ODN ou bien des signaux apportés par un contact inter-cellulaire. En effet, nous avons constaté que lorsque les LB Tr.  $CD27^+$  sont cultivés avec des motifs CpG-ODN, ils ont la capacité de se différencier. L'importance du microenvironnement a notamment été décrite pour les cellules de LLC. Ces dernières survivent de façon aberrante *in vivo*, tandis qu'elles entrent en apoptose spontanée en culture *in vitro* (Weiler, Ademokun et al. 2015).

*Chez l'Homme, les lymphocytes B transitionnels de type 3 humains représentent-ils un stade de développement à part ?*

L'anergie est une caractéristique fonctionnelle qui définit un état de non-réponse de la cellule suite à l'engagement du BCR. Il a été décrit que le maintien de cet état anergique nécessite une exposition continue à un autoAg. De plus, l'anergie est un état réversible qui peut être observé à la fois dans des cellules B immatures et matures (Gauld, Benschop et al. 2005). Il est intéressant de noter que les modèles murins transgéniques où les LB ont un BCR autoréactif possèdent un fort pourcentage de LB T3  $CD93^+ CD23^+ IgM^{faibles}$  et un faible pourcentage de LB matures. Notons enfin qu'une petite fraction de LB T3 est retrouvée dans les souris sauvages (Merrell, Benschop et al. 2006). Ces auteurs ont également observé que les LB matures exposés de façon répétée à un autoAg modifient leur phénotype, qui tend à se rapprocher de celui des LB T3. Enfin, il a été observé dans des souris sauvages que les LB T3 présentent une signature de cellules B autoréactives sécrétrices d'Ac anti-ADN.

Toutes ces informations sous-entendent que contrairement aux LB T1 et LB T2, les LB T3 murins ne représentent pas un stade de développement des cellules B, mais plutôt un état transitoire impliqué dans la tolérance immunologique, qui contrôle l'expansion de cellules B autoréactives. Il est difficile chez l'Homme de procéder à des stimulations répétées par des autoAg. Cependant, les expériences pour tester une non-réponse du BCR peuvent être réalisées *in vitro* en appliquant une stimulation par un Ac anti-IgM. Nous démontrons pour la

première fois chez l'Homme que les LB T3, définis selon un phénotype proche des LB T3 murins, sont également des cellules anergiques. Cependant, nous n'avons pas réalisé de tests fonctionnels permettant de démontrer que certaines cellules B, notamment matures, sont capables de s'orienter vers un phénotype de LB T3 suite à des stimulations autoantigéniques répétées. De même, nous n'avons pas pu vérifier si cet état était transitoire et réversible comme le suggèrent certaines études (Gauld, Benschop et al. 2005).

Enfin, il a été intéressant de constater que les LB T3 sont sous-représentés dans les patients atteints de maladies autoimmunes. Cette anomalie de distribution semble soutenir le fait que les LB T3 anergiques représentent un stade alternatif de mise sous silence, impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique. En perspective, des analyses supplémentaires permettant d'identifier des clones autoréactifs parmi les LB T3 de patients atteints de maladies autoimmunes et de témoins apporteraient des indications utiles pour soutenir cette hypothèse. Afin de déterminer si les LB T3 sont des cellules autoréactives, il serait envisageable d'utiliser un Ac de clone 9G4 reconnaissant un idiotype particulier présent sur un BCR autoréactif (VH4-34). Cet Ac a notamment été utilisé dans une étude qui traite de l'autoréactivité dans le SLE (Richardson, Chida et al. 2013). De plus, nous pourrions réaliser des cultures avec des LB T3 isolés, afin d'évaluer la production d'Ac anti-nucléaires sécrétés dans le milieu. Une autre solution serait d'utiliser le séquençage, afin d'analyser le répertoire BCR des LB T3, après isolation par la technique du « single cell ». Il est par exemple décrit que les clones autoréactifs possèdent des régions CDR3 plus longues que les cellules B spécifiques d'Ag exogènes (Volpe and Kepler 2009). En conclusion, nous supposons que les LB T3 ne représentent pas un stade de développement de l'ontogénèse B, mais constitueraient un pool cellulaire dans un état « silencieux » et transitoire. D'autres cellules, matures ou transitionnelles ayant un BCR autoréactif pourraient entrer dans cet état, réduire l'expression de leur IgM membranaire, et présenter alors un phénotype de LB T3.

## 2) La réponse immune innée des lymphocytes B transitionnels

Dans la rate, la différenciation extra-folliculaire et T-indépendante de LB en cellules sécrétrices d'Ac est décrite. Elle est notamment permise suite à une interaction avec les DC circulantes (Balazs, Martin et al. 2002). La rate représente une structure anatomique organisée dans laquelle les Ag circulent. Cependant, est-il envisageable que des cellules B (notamment immatures) du sang périphérique puissent se différencier en plasmablastes en réponse à des signaux solubles ? Nous montrons que les LB T1 et Tr. CD27<sup>+</sup> sécrètent des IgM. Les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont des cellules activées et expriment fortement le TLR9. Il est possible que cette caractéristique phénotypique leur confère un potentiel de réponse aux CpG-ODN supérieur à celui des autres sous-populations de LB Tr. Egalement, le fait que les cellules B T1 se différencient en plasmablastes confirme que les cellules immatures sont capables de répondre rapidement à des signaux innés. Cependant, il est important de souligner que ce type de signaux entraîne dans un premier temps une réponse polyspécifique par la sécrétion d'IgM totales. La littérature a déjà évoquée cette capacité qu'ont les LB Tr. à se différencier en cellules productrices d'Ac. Cependant, Capolunghi *et al.* ont observé que les LB Tr. issus de sang de cordon (particulièrement immatures) sont certes capables de différencier en cellules sécrétrices d'IgM après stimulation du TLR9, mais également d'IgG, en association avec une induction de l'expression de l'AID. Dans ces travaux, la détection des Ac sécrétés a été réalisée à 7 jours (Capolunghi, Cascioli et al. 2008). Il est probable que cette expression de l'AID se manifeste au cours d'une cinétique plus longue que celle que nous avons choisie pour réaliser nos expériences *in vitro*. En effet, nous n'avons pas détecté d'Ac de type IgG ni IgA dans les surnageants de culture après 3 jours. La production d'IgM détermine donc une réponse rapide précoce, qui pourrait être suivie d'une commutation de classe destinée à permettre une réponse humorale plus spécifique. Giltiay *et al.* ont également démontré que les LB T1 de la rate de souris qui surexpriment le TLR7 sont capables de se différencier en cellules productrices d'autoAc anti-ARN IgG2b et IgG2c (Giltiay, Chappell et al. 2013). Dans ce modèle TLR7-transgénique, les LB T1 sont hyper-répondeurs à une stimulation du BCR. Cette étude, montre qu'une réponse exagérée des LB T1 face aux *stimuli* innés conduit à une réponse autoimmune, et que la différenciation en plasmocytes de ces cellules immatures n'est dans certains cas pas contrôlée.

## C) Les populations régulatrices de lymphocytes B transitionnels

### 1) Complexité moléculaire et biologique de l'interleukine 10

Le fait qu'une cellule exprime la cytokine IL-10 est d'abord une donnée sur son phénotype. Même si la production de l'IL-10 par les LB est incontestablement associée à des propriétés régulatrices comme l'inhibition de la polarisation des LT CD4<sup>+</sup> en Th1, il est essentiel de réaliser des études fonctionnelles complémentaires pour établir qu'une population B10 est régulatrice. En outre, il paraît trop catégorique d'expliquer l'ensemble des manifestations physiopathologiques présentes au cours d'une inflammation par le simple fait que les patients possèdent moins de B10. En effet, à titre d'exemple, il a été décrit que les patients atteints d'un SLE en phase active possèdent plus de B10 que les témoins (Yang, Yang et al. 2014). De même, le gène *IL10* présente des polymorphismes SNPs (single nuclear polymorphisms) au niveau de son promoteur, susceptibles de modifier l'activité biologique de la protéine. L'émergence du SLE ainsi que la sévérité de la maladie ont par exemple été décrites comme associées avec un polymorphisme du gène *IL10* (Eskdale, Wordsworth et al. 1997). Ces données soulèvent l'importance de réaliser des études fonctionnelles additionnelles aux tests visant à déterminer le potentiel qu'ont les cellules B à produire l'IL-10. Enfin, nous insistons sur le fait que la majorité des études qui se sont intéressées à évaluer la production d'IL-10 par les LB s'est basée sur des expériences de détection intracytoplasmique. Cependant, certaines modifications post-transcriptionnelles peuvent aboutir à un défaut de transport et ou de sécrétion de la protéine intracellulaire. Par exemple, une absence de clivage du peptide signal ainsi qu'une inhibition de la glycosylation peuvent empêcher l'expression d'une protéine à la membrane (Huang, Wilkinson et al. 2010). En outre, nous ne pouvons pas exclure que la perméabilisation de la membrane plasmique conduise à la détection de molécules d'IL-10, qui ont été captées du milieu extérieur. C'est pour ces raisons que nous avons fait le choix d'utiliser un outil de détection de l'IL-10 qui permet la capture de la protéine en sortie des vésicules d'exocytose.

### *A l'état basal, les cellules B transitionnelles sécrètent peu d'interleukine 10*

Les LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> ont été décrits comme producteurs d'IL-10 (Blair, Norena et al. 2010). Cependant, il est essentiel de considérer que Blair *et al.* ont tiré cette conclusion après avoir stimulés les LB Tr. par CD40L. Ainsi, il est envisageable que ces derniers ont induit une production d'IL-10 suite à l'engagement de CD40, à l'instar des proB10 CD27<sup>+</sup> CD24<sup>forts</sup> producteurs d'IL-10 après stimulation par des motifs CpG-ODN (Iwata, Matsushita et al. 2011). Dans notre étude, nous avons observé que les LB Tr. ne représentent qu'environ 10% des cellules B IL-10<sup>+</sup> à l'état basal. A titre comparatif, les LB CD27<sup>+</sup> CD24<sup>forts</sup> en représentent environ 50%. Nous confirmons également que la population des LB CD27<sup>+</sup> CD24<sup>forts</sup> contient des proB10 et produit l'IL-10 après activation par des motifs CpG-ODN. En revanche, les LB Tr. totaux ne sont pas d'avantage représentés parmi les LB IL-10<sup>+</sup> suite à l'engagement de leur TLR9. Il serait intéressant de tester l'effet d'autres stimulations, notamment anti-CD40, sur l'induction de B10 parmi les sous-populations de LB Tr.

Enfin, il est probable que ces premiers résultats sur la production d'IL-10 soient nivelés du fait que la population des LB Tr. est hétérogène. C'est pour cela que nous avons souhaité évaluer le potentiel des LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup> à sécréter l'IL-10, avec et sans stimulation.

### *La production d'interleukine 10 est restreinte à des populations de cellules B rares*

D'abord, notons que seulement 0,3% des cellules B sont capables de sécréter l'IL-10 spontanément. Parmi elles, 10% sont des LB Tr. En poursuivant notre étude en profondeur, nous avons constaté que seuls les LB T2 et Tr. CD27<sup>+</sup> sont capables de produire l'IL-10. Ces résultats démontrent que la production d'IL-10 est spécifique de certaines populations cellulaires. En outre, les LB Tr. CD27<sup>+</sup> ont une IMF de l'IL-10 bien plus importante que celle observée parmi les LB T2 IL-10<sup>+</sup>. Cette information est essentielle puisqu'elle souligne le potentiel qu'ont les LB Tr. CD27<sup>+</sup> à sécréter une grande quantité de molécules IL-10. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que ce fort potentiel sécréteur des LB Tr. CD27<sup>+</sup> pourrait être à l'origine d'une activité immunosuppressive importante.



Il a été intéressant de constater qu'une stimulation par des motifs CpG-ODN induit la production d'IL-10 surtout dans les LB T2 et T3. Ces deux sous-populations (principalement les LB T3) contiennent donc des proB10. A l'inverse, cette stimulation diminue le nombre de B10 parmi les LB Tr. CD27<sup>+</sup>. De plus, l'intensité d'expression de l'IL-10 est augmentée parmi les LB T3 et Tr. CD27<sup>+</sup>. Ces nouvelles observations démontrent que certaines populations sont d'avantage prédisposées à répondre à des stimulations pour produire l'IL-10, sans nécessairement la produire à l'état basal. De plus, la quantité de protéine Il-10 sécrétée n'est pas identiques entre les LB T2 et LB Tr. CD27<sup>+</sup>. Ces conclusions soulignent la complexité biologique de l'IL-10. En effet, sa forte expression n'est pas ubiquitaire et les voies d'induction (TLR9, CD40...) pourraient être différentes d'une population cellulaire à l'autre. Enfin, il est important de noter que l'expression du gène *il10* est finement régulée, notamment par les miR (McCoy, Sheedy et al. 2010). Il est d'ailleurs envisageable que les mécanismes de régulation soient différents d'une population à l'autre.

## **2) La production d'interleukine 10 par les cellules B est-elle nécessairement associée avec une régulation de la réponse T ?**

Communément, nous extrapolons les résultats obtenus sur des modèles d'étude *in vitro* en les appliquant à la physiologie de l'Homme. Cependant, certaines questions restent sans réponse. Par exemple : Comment la prolifération des LT dans le sang peut-elle être inhibée par des Breg circulants ? Où s'instaure le contact inter-cellulaire hors des organes lymphoïdes ? Toutefois, une action paracrine, autocrine ou endocrine des molécules immune-modulatrices comme l'IL-10 est plus facile à imaginer.

Malgré ces difficultés d'interprétations dues à l'absence en culture *in vitro* d'un système aussi complexe que celui retrouvé *in vivo*, le tri cellulaire *ex vivo* permet d'évaluer le potentiel régulateur de population de façon spécifique, puisqu'elle permet de pallier à l'hétérogénéité cellulaire. En revanche, le tri cellulaire ne permet pas de conserver les communications inter-cellulaires entre les populations de LB. En effet, nous ne pouvons pas exclure qu'une sous-population de Breg puisse pousser d'autres cellules B à devenir régulatrices.

## *L'inhibition de la production de TNF- $\alpha$ n'est pas concomitante à celle de l'IFN- $\gamma$*

Seuls les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont compétents pour inhiber la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , tandis que l'ensemble des sous-populations de LB Tr. inhibent celle du TNF- $\alpha$ . Ces résultats démontrent que la simple production d'IL-10 n'est pas suffisante pour inhiber la production d'IFN- $\gamma$ . En effet, il est probable qu'une forte quantité de molécules d'IL-10 sécrétées soit nécessaire pour limiter cette production.

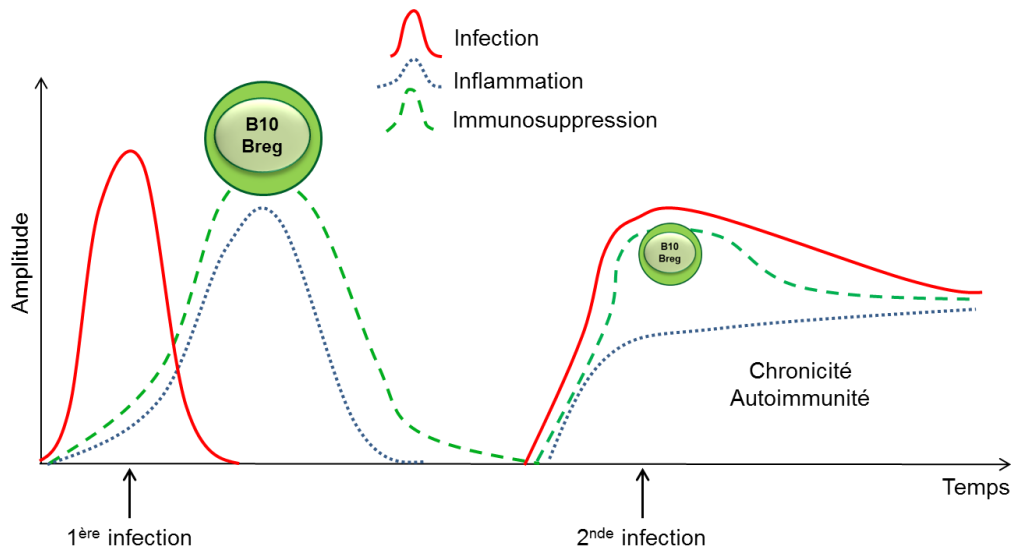
L'IL-10 partage une forte homologie de structure avec l'IFN- $\gamma$ , et leurs récepteurs appartiennent à la même famille (Ho, Liu et al. 1993; Savan, Ravichandran et al. 2009). Pour autant, leurs modes d'action ont des finalités opposées. En revanche le TNF- $\alpha$  ne possède pas de récepteur de la classe CFR2, et sa liaison aux récepteurs TNFRs engage des voies de signalisation intracellulaire différentes de celles liées à l'IL-10 (Brenner, Blaser et al. 2015). Malgré le fait que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  aient des fonctions et des voies d'induction différentes, l'IL-10 est capable d'inhiber la production de ces deux cytokines inflammatoires.

Il est toutefois important de préciser que les cellules B sont aussi capables de produire l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Fillatreau 2015; Vazquez, Catalan-Dibene et al. 2015). Nous ne pouvons donc pas exclure que les LB Tr. puissent sécréter ces cytokines dans nos culture *in vitro*, d'autant que la reconnaissance de l'IFN- $\gamma$  par les cellules Th0 induit leur différenciation en cellules Th1 (McNab, Mayer-Barber et al. 2015). Il est aussi intéressant de noter qu'une cytokine pro-inflammatoire comme l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire la production d'IL-10 par les LB (Rosser, Oleinika et al. 2014). Nous pouvons donc supposer que dans notre modèle de culture *in vitro*, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1 soient à l'origine de l'induction de B10 qui agissent ensuite pour réguler la réponse T inflammatoire. Nous aurions alors un effet de boucle activation/inhibition. Notons que nous n'avons pas étudié l'inhibition de la production d'autres cytokines comme par exemple l'IL-17. Enfin, il serait intéressant d'utiliser des Ac anti-IL-10 et anti-IL-10R bloquants afin d'estimer quelle est la part de l'IL-10 dans l'inhibition de la polarisation Th1 exercée par les sous-populations de LB Tr.

Les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont sur-représentés dans les patients atteints de SLE et de SGS. Dans le SLE, il a été observé une hausse du nombre de cellules productrices d'IL-10 (Grondal, Kristjansdottir et al. 1999). Pour autant,

l'autoimmunité et la perte de tolérance sont caractéristiques de cette pathologie. Il est intéressant de discuter le statut infectieux constaté dans les patients atteints de maladies autoimmunes. Par exemple, une infection par l'Epstein-Barr virus (EBV) est associée avec l'émergence du lupus (Capone, Fasano et al. 2015). Notre intérêt se porte tout particulièrement sur le fait que les cellules infectées, dont les LB, produisent de l'IL-10 viral. L'IL-10 de l'EBV possède 84% d'homologie avec l'IL-10 des cellules hôtes. Elle est produite lors de la phase lytique de l'infection virale, et ne présente qu'une partie des activités de l'IL-10 de l'hôte (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Il se pose alors la question de savoir si l'IL-10 viral est anti-inflammatoire. Nous supposons également que certaines sous-populations de LB pourraient être préférentiellement infectées par un virus. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le statut infectieux des LB Tr. CD27<sup>+</sup>, T1, T2 et T3 dans les patients SLE et SGS. Enfin, nous n'avons constaté qu'une hausse du pourcentage de LB Tr. CD27<sup>+</sup> dans les patients autoimmuns, sans avoir déterminé leur potentiel à sécréter l'IL-10. Il sera donc à l'avenir intéressant de réaliser des tests de sécrétion de l'IL-10 sur les sous-populations de LB Tr. dans le SLE et le SGS, d'autant qu'il est décrit que les LB Tr. de patients atteints de lupus sont défaillants pour produire l'IL-10 suite à l'engagement de CD40 (Blair, Norena et al. 2010). Enfin, il est possible que les signaux solubles infectieux associés à l'autoimmunité soient à l'origine d'une différenciation privilégiée des LB immatures de la moelle osseuse en cellules B Tr. CD27<sup>+</sup>.

Il a été démontré qu'une infection et l'inflammation qui en découle entraînent une rupture de l'organisation des macrophages au niveau du sinus subcapsulaire des organes lymphoïdes drainants, sous l'influence des DCs. Cette première infection empêche les macrophages de reconnaître des Ag supplémentaires au cours d'un second challenge. L'une des conséquences est que les LB sont « mis sous silence », et produisent moins d'Ac lors d'une seconde infection (Gaya, Castello et al. 2015). Nous pouvons supposer que les Breg répondent de manière similaire, et soient moins performants au cours d'une seconde infection, ou bien qu'un second challenge n'induit pas suffisamment de Breg (FIG. 55). Cette hypothèse s'applique tout particulièrement dans les pathologies autoimmunes, où les infections peuvent être à l'origine d'une inflammation chronique, et où les cellules B ont un défaut intrinsèque pour réguler la réponse T inflammatoire.



**FIGURE 55 : Impact d'une seconde infection sur la capacité du système à limiter l'inflammation.** Cette figure se base sur la revue de Klinker *et al.* (Klinker and Lundy 2012). Suite à une première infection, l'inflammation permet une immunosuppression du pathogène, notamment au travers d'une induction de Breg. Nous émettons l'hypothèse qu'une seconde infection n'impliquerait pas une immunosuppression aussi efficace, car les cellules B se trouveraient dans un état « non-répondeur » du fait d'avoir déjà été sollicités. En plus, d'être fonctionnellement défectueux dans les pathologies autoimmunes, les LB participeraient donc moins efficacement à la suppression de l'inflammation, qui deviendrait chronique.

### *Inhibition de la prolifération des cellules T : interleukine 10, activation et anergie*

L'inhibition de la prolifération des LT peut être associée avec la production d'IL-10 (Khoder, Sarvaria *et al.* 2014). Cependant l'apport du contact cellulaire pour limiter cette prolifération T par les cellules B est également essentiel (Lemoine, Morva *et al.* 2011). Nous avons observé que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> qui inhibent la différenciation Th1 ne sont pas capables de limiter la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Ces résultats suggèrent que les mécanismes (probablement IL-10 dépendants) qui inhibent la production d'IFN- $\gamma$  sont différents de ceux qui permettent de limiter la prolifération T. A l'inverse, les LB T2 qui sécrètent l'IL-10 ont cette capacité d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Nous supposons donc que le système dans lequel la prolifération des LT est limitée est particulièrement complexe. En effet, il est probable que plusieurs signaux soient nécessaires pour réguler les cellules T. Ainsi, dans nos cultures, les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sécrèteraient l'IL-10, mais seraient incapables pour exercer une autre fonction, comme l'établissement d'un contact cellulaire. Pourtant, les LB Tr. CD27<sup>+</sup> expriment

fortement CD80, CD86 et CD40. Ces observations soulèvent une autre hypothèse. Il est possible que l'inhibition de la prolifération dépende de « l'intensité » des signaux perçus après contact cellulaire. Nous supposons que la réponse T repose sur une balance activation/contrôle, faisant que lorsque qu'un seuil d'activation est dépassé, les LT sont activés. Ainsi, au contact des LB Tr. CD27<sup>+</sup>, les LT seraient alors plutôt activés qu'inhibés. En revanche, les LB T2 auraient le potentiel intrinsèque de produire l'IL-10, en plus d'exercer une fonction régulatrice complémentaire. Notre étude soutient le fait qu'il est essentiel de définir les populations de Breg selon la ou les fonctions régulatrices qu'elles exercent.

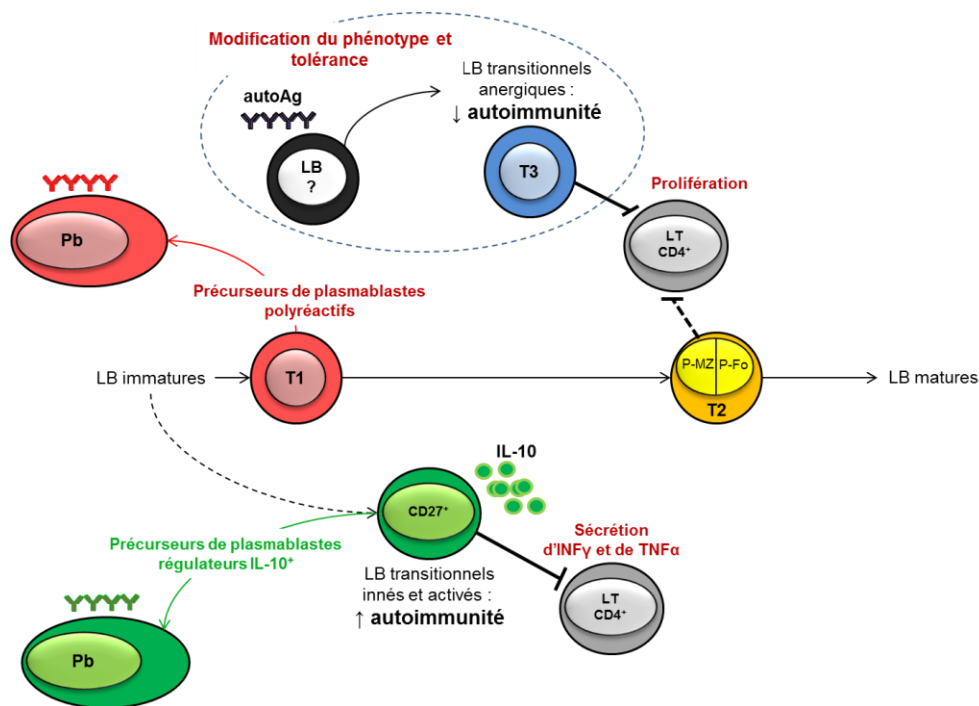
Il est aussi intéressant de discuter le fait que les LB T3 anergiques puissent inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Il a été montré dans un modèle murin où les cellules B sont anergiques que ces dernières ont la capacité de limiter la réponse humorale Ag-spécifique de façon IL-10 indépendante ([Aviszus, Macleod et al. 2012](#)). Cependant, les LB T3, en plus d'être anergiques, peuvent produire l'IL-10 après avoir été stimulés par des CpG-ODN. De plus, les cellules B sont capables de rendre les LT naïfs tolérants suite à la présentation d'un Ag ([Fuchs and Matzinger 1992](#)). Il a aussi été démontré que les LB ayant reçu une stimulation chronique de leur BCR *via* des autoAg sont capables d'induire l'anergie des LT mémoires, qui arrêtent alors de proliférer. Dans cette étude, les LB induisent l'anergie des cellules T par la présentation de faibles doses de l'Ag *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII (HLA-DR)) ([Dalai, Mirshahidi et al. 2008](#)). Dans notre étude, nous avons constaté que les LB T3 anergiques expriment faiblement HLA-DR, CD80, CD40 et CD32. Ces caractéristiques de phénotype sous-entendent que les cellules B T3 pourraient ne pas activer les LT, et qu'elles pourraient présenter l'Ag à de faibles doses.

La stimulation répétée par un autoAg de faible affinité orientent les LB vers un état anergique de LB T3 ([Merrell, Benschop et al. 2006](#)). Cependant, les souris prédisposées à développer un lupus possèdent moins de cellules B T3 ([Teague, Pan et al. 2007](#)). Nos travaux démontrent chez l'Homme que les patients atteints de maladies autoimmunes possèdent moins de LB T3. En outre, il a été démontré dans le SLE que certains allèles sont associés avec le dérèglement de voies inhibitrices des LB. Par exemple, la voie Lyn est perturbée, alors qu'elle est importante pour le maintien de l'anergie. Egalement, la réponse aux IgG *via* le récepteur inhibiteur

FC $\gamma$ RIIb (CD32) est déstabilisée, tout comme le sont les voies engagées suite à la stimulation du BCR (Cambier 2013). Toutes ces informations laissent supposer que les LB des patients autoimmuns sont défailants pour entrer dans un état anergique de LB T3 suite à la reconnaissance d'autoAg.

### 3) Réflexion sur l'hétérogénéité des lymphocytes B transitionnels et sur leur développement

Notre étude apporte deux principales informations. D'abord, nous montrons que le développement des LB Tr. humains est particulièrement complexe, puisqu'il fait intervenir au moins quatre populations cellulaires aux phénotypes caractéristiques. Deuxièmement, nous montrons que cette hétérogénéité cellulaire des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> est associée à différentes fonctions régulatrices impliquées dans la tolérance immunologique.



**FIGURE 56 : Chez l'Homme, les stades de maturation des lymphocytes B transitionnels ne sont pas encore clairement définis.** Les LB T3 anergiques, proviennent de cellules ayant modifié leur phénotype suite à la reconnaissance d'autoAg. Ils sont sous-représentés dans les pathologies autoimmunes et pourraient participer à la tolérance périphérique, notamment en inhibant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>. Les LB T1 répondent aux signaux de l'immunité innée en se différenciant en cellules productrices d'IgM polyspécifiques. Les LB Tr. CD27<sup>+</sup> secrètent l'IL-10 et sont augmentés dans les pathologies autoimmunes. Cependant leurs fonctions régulatrices pourraient être altérées chez les malades. Ils sont aussi capables de se différencier plasmablastes suite à l'engagement du TLR9. Ces plasmablastes pourraient être régulateurs. Enfin, les LB T2 semblent être une population plus hétérogène que les autres LB Tr.

La principale limite de notre étude est que nous ne nous pouvons pas clairement établir par quelles voies émergent les LB Tr. CD27<sup>+</sup> et les LB T3. En revanche, il est possible que les LB T1 et Tr. CD27<sup>+</sup> puissent se différencier *in vivo* en plasmablastes respectivement polyréactifs et régulateurs IL-10<sup>+</sup> (FIG. 56). Même si nous supposons que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> sont issus des LB immatures de la moelle osseuse du fait de leur forte expression de CD10 et de l'IgM, il nous a été impossible de le confirmer.

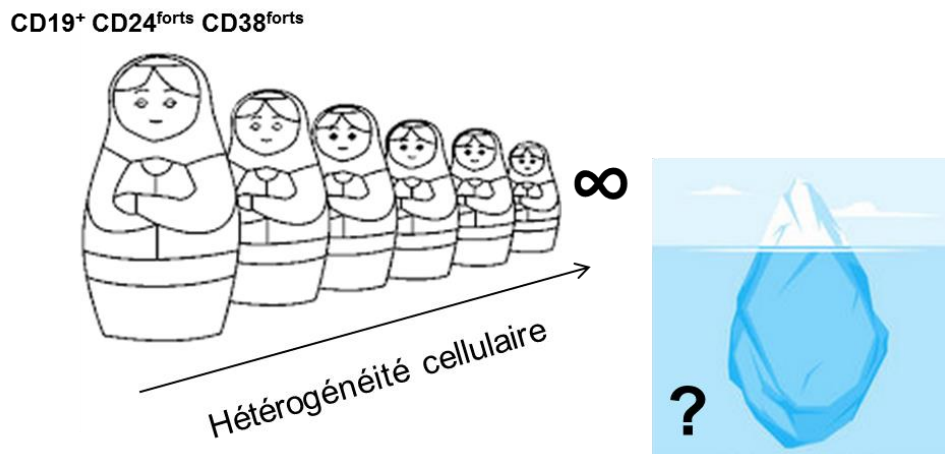
Nous émettons l'hypothèse que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> représentent une population qui se différencie de façon polyspécifique en cellules productrices d'IgM, impliquée dans une réponse rapide face aux *stimuli* innés. Enfin, le fait qu'elle soit capable de limiter la réponse inflammatoire des LT CD4<sup>+</sup> dans les volontaires sains et qu'elle soit augmentée au sein des patients atteints de maladies autoimmunes soulèvent des questions essentielles quant à sa réelle implication dans la tolérance périphérique. Ces données renforcent le fait qu'elle puisse se différencier rapidement en plasmablastes producteurs d'IL-10 suite à la reconnaissance de signaux innés.

En ce qui concerne les LB T3 anergiques, nous n'avons pas pu établir de quelles cellules elles dérivent. En effet, même s'il est probable que cette population provienne de cellules B ayant reconnu un autoAg de façon répétée, nous ne pouvons établir de quel type de clones autoréactifs les LB T3 sont issus. Cependant, nos observations soutiennent fortement le fait que les LB T3, sous-représentés dans les pathologies SLE et SGS, pourraient jouer un rôle primordial dans la tolérance immunologique. En effet, ils inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> possiblement en induisant leur anergie, et/ou en induisant des Treg. Le stade LB T3 est celui qui soulève le plus d'interrogations sur le développement des cellules B. En effet, nous ne pensons pas que les LB T3 constituent un stade de maturation à proprement parlé, mais plutôt un pool cellulaire présent dans un état anergique réversible. Cet état étant associé avec un phénotype (IgM<sup>faible</sup>) également réversible (Merrell, Benschop et al. 2006). En conséquence, nous suggérons que les LB T3, ne sont pas précurseurs des LB matures naïfs.

Enfin, nous soutenons l'idée que la population des LB Tr. est encore plus complexe que ce que nous avons montré dans notre étude. En effet, en prenant l'exemple des LB T2, nous supposons que comme chez la souris, ils puissent être composés de LB précurseurs de la ZM ou de LB T2 P-Fo (Kumararatne and MacLennan 1981). Il serait envisageable de réaliser un phénotype approfondit des LB T2 en étudiant par exemple leur

expression de CD1d, qui est exprimé fortement par les LB ZM (Rolf, Motta et al. 2005). En outre, nous pourrions réaliser des tests de différenciation *in vitro* sur des LB T2 isolés puis stimulés par un Ac anti-IgM, afin de déterminer s'ils s'engagent vers des phénotypes associés aux LB Fo ( $\text{IgM}^{+/\text{faibles}} \text{CD21}^{\text{faibles}}$ ) et aux LB ZM ( $\text{IgM}^{\text{forts}} \text{CD21}^{\text{forts}} \text{CD1d}^{\text{forts}}$ ). Nous pourrions également stimuler les LB T2 par BAFF, qui pourrait favoriser la différenciation des LB T2-MZP en LB ZM (Batten, Groom et al. 2000). De même, il a été récemment décrit chez l'Homme une population de LB ZM  $\text{IgD}^+ \text{CD27}^+$  (Bagnara, Squillario et al. 2015).

L'hétérogénéité cellulaire des LB Tr. est grande. Les avancées techniques, notamment dans le domaine de la cytométrie en flux, ont permis d'éclaircir les inconnues qui concernent la composition du compartiment lymphocytaire B. L'image des poupées russes représente bien cette diversité, mais les inconnues qui tendent vers l'infiniment petit restent probablement nombreuses (FIG. 57). Cependant, jusqu'où la découverte de populations rares (notamment régulatrices) peut-elle aller ? A terme, nous pouvons espérer pouvoir définir avec une précision encore plus grande, la composition de la population des cellules B Tr.  $\text{CD24}^{\text{fortes}} \text{CD38}^{\text{fortes}}$ .



**FIGURE 57 : Aller vers l'infiniment petit pour découvrir la partie immergée de l'iceberg et déterminer l'hétérogénéité cellulaire des LB Tr.  $\text{CD24}^{\text{fortes}} \text{CD38}^{\text{fortes}}$ .**



Le microenvironnement cellulaire joue un rôle majeur sur l'induction de B10. De même, notre étude sur le potentiel régulateur des sous-populations de LB Tr. montre que les LT CD4<sup>+</sup> ont des réponses spécifiques de la population cellulaire B avec laquelle ils sont cultivés. Ces observations soulèvent la notion de ciblage cellulaire. La question sous-jacente est de savoir si les cellules B sont capables de cibler spécifiquement des populations de LT, avant de présenter des fonctions régulatrices. Egalement, nous émettons l'hypothèse que la composition de l'environnement cellulaire peut orienter le profil transcriptionnel des LB. Cette réflexion a abouti à un second travail, qui traite du microenvironnement cellulaire et de la plasticité des cellules B.

## **II. Les lymphocytes B se polarisent-ils en cellules B régulatrices ?**

La plasticité cellulaire a particulièrement été étudiée dans les macrophages. Ces derniers présentent deux stades d'activation opposés qui s'apparentent aux stades de polarisation Th1 et Th2 des cellules T. Les macrophages peuvent être à un stade dit « classique » M1, auquel ils promeuvent la réponse Th1 et présentent des fonctions anti-microbiennes et anti-tumorales. Les macrophages peuvent aussi être de type M2 (alternatif), où ils s'orientent vers une réponse Th2 et la tolérance immunitaire. L'orientation vers l'un ou l'autre de ces stades d'activation est déterminée par le microenvironnement. Ainsi, l'orientation des macrophages vers un phénotype M1 est entre autre facilitée par la reconnaissance de l'IFN- $\gamma$  ou des ligands des TLRs. A l'inverse, la polarisation en M2 est plutôt constatée dans un environnement sans infection (Wang, Liang et al. 2014).

### **A) Environnement moléculaire et cellularité : comment fonctionnent les Breg *in vitro* ?**

#### **1) Les signaux solubles exogènes sont-ils indispensables pour que les cellules B régulent la réponse T ?**

Nous avons vu en introduction que les signaux activateurs (CD40L, CpG-ODN, Ag...) sont importants pour induire des fonctions régulatrices dans les cellules B, notamment en induisant la production d'IL-10. Cependant, est-il nécessaire que les cellules B perçoivent des signaux solubles pour inhiber la réponse des LT ?

Le simple fait que les LB soient cultivés en présence de cellules T, leur confère la capacité d'inhiber la prolifération de ces LT. Cependant, nous avons aussi observé que les LB inhibent plus efficacement la prolifération des LT lorsqu'ils sont activés par des motifs CpG-ODN. Ces résultats démontrent que l'engagement du TLR9 n'est pas indispensable pour que la prolifération des LT soit inhibée par les cellules B. Malgré tout, les motifs CpG-ODN potentialisent cet effet inhibiteur. L'effet positif des CpG-ODN sur le potentiel des LB à inhiber la prolifération des LT, pourrait en partie s'expliquer par le fait que l'engagement du TLR9 active les cellules B. En effet, nous savons qu'elles se différencient et modifient leur phénotype au cours de la culture *in vitro* (Lemoine, Morva et al. 2011; Nouel, Segalen et al. 2014). Mais au-delà du changement d'expression des molécules de différenciation, les LB sont capables d'induire des marqueurs d'activation comme CD25 (IL-2R) (Kessel, Haj et al. 2012). L'IL-2 est une cytokine associée avec la différenciation Th1 et Th2 (Liao, Lin et al. 2011). Il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'expression de CD25 à la surface des cellules B. En effet, les LB pourraient entrer en compétition avec les LT pour la capture de l'IL-2, qui peut être produite par les cellules Th1 (Schwartzberg, Finkelstein et al. 2005).

La compétition pour les facteurs solubles (notamment de survie) présents dans le milieu, est associée avec la notion de cellularité, qui considère la composition ainsi que la concentration cellulaire d'une culture.

## **2) Les lymphocytes B sont des cellules particulièrement efficaces pour réguler la réponse T**

Les stimulations modifient le comportement des LB en culture *in vitro*. Les ratios de cellules utilisés représentent également un paramètre important qu'il faut maîtriser. *In vivo*, parmi les lymphocytes totaux du sang périphérique, les LB en représentent environ 15% et les LT environ 75%. En périphérie, le ratio B/T est donc proche de 1/5. Or, le ratio que nous avons utilisé jusqu'à présent dans nos cultures mixte est de 1/1. Nous avons alors souhaité explorer la notion de cellularité, qui permettra de discuter des rapports de compétition qui peuvent s'établir dans une culture mixte.

Nous avons observé que même en appliquant le plus petit ratio de notre gamme (1/4), les LB semblent être capables d'inhiber la prolifération des LT. Cette information est cruciale pour l'interprétation des cultures *in*

*vitro*. En effet, ce ratio 1/4 se rapproche de celui qui existe *in vivo*, et soutient le fait que les cellules B pourraient avoir un réel impact *in vivo* même si elles sont en minorité. De plus, nous avons observé que l'inhibition de la prolifération est croissante lorsque l'on se rapproche du ratio 1/1, ce qui montre l'importance du nombre de cellules utilisées. Gao *et al.* ont démontré qu'un ratio 2/1 permet d'amplifier l'effet inhibiteur sur la prolifération des LT. Les cellules B de patients atteints de SLE ont un défaut intrinsèque pour inhiber la prolifération des LT. Dans, cette étude, les auteurs ont montré que doubler le nombre de cellules B par rapport à celui des LT permet de rétablir une inhibition de la prolifération (Gao, Dresel *et al.* 2014). Cette dernière information soutient le fait que les cellules B et T sont en compétition pour les facteurs du milieu nécessaires à leurs fonctions, notamment proliférative. De plus, il est probable qu'un nombre accru de LB implique plus de contacts cellulaires et d'avantage de molécules immunomodulatrices sécrétées. Enfin, il est important de considérer que le ratio B/T est dépendant de l'organe étudié. Par exemple, contrairement au sang périphérique, le ratio présent dans les organes lymphoïdes secondaires comme l'amygdale se rapproche plutôt de 4 LB pour 1 LT. De même, quel est ce ratio au niveau des sites de l'inflammation suite à une infection ? La question du lieu où se déroule la régulation de la réponse T par les cellules B se pose encore. Il a par exemple été décrit que les LB PD-L1<sup>forts</sup> sont capables de limiter la réponse humorale en inhibant la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Tfh au niveau folliculaire (Khan, Hams *et al.* 2015).

### **3) Comment prolifèrent les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en présence des lymphocytes B ?**

Tout comme les LB, les cellules T ont de multiples phénotypes associés avec des caractéristiques fonctionnelles (Mahnke, Beddall *et al.* 2012). Il est commun de distinguer les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques des LT CD4<sup>+</sup> parmi les LT CD3<sup>+</sup>. Nous avons démontré que l'inhibition de la prolifération T est aussi efficace, que les cellules B soient cultivées avec des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. De même, lorsque les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ne sont pas séparés les uns des autres, ils prolifèrent de la même manière. Une fois isolés des cellules T CD4<sup>+</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> ont-ils le même comportement (et inversement) ?

Tenter de répondre à cette question revient à traiter de la notion de ciblage cellulaire. En effet, il est possible que lorsque l'hétérogénéité des LT CD3<sup>+</sup> est rompue, les cellules B puissent inhiber la prolifération des cellules T

isolées en les ciblant. Sur le plan expérimental, nous avons procédé à des tris cellulaires de certaines populations de LT, afin de rendre nos cultures relativement homogènes.

## **B) Les lymphocytes B régulent une cible de façon spécifique**

D'abord, nous avons séparés par tri cellulaire les LT CD8<sup>+</sup>, des LT CD4<sup>+</sup> mémoires (CD45RO<sup>+</sup>), des LT CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup>). La distinction entre les LT CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs s'explique par le fait que nous souhaitons être plus précis dans la distinction des sous-populations de LT.

### **1) Ciblage cellulaire : l'inhibition de la prolifération est spécifique d'une population de lymphocytes T**

Khoder *et al.* ont décrit que les cellules B mémoires IgM<sup>+</sup> et transitionnelles ont la capacité d'inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> préalablement isolés (Khoder, Sarvaria *et al.* 2014). A l'inverse, nous avons observé que les cellules B inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> mémoires et induisent celle des LT CD8<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Ces résultats particulièrement intéressants montrent que lorsque les populations de LT sont séparées avant la mise en culture, leur comportement en présence des cellules B est complètement différent, en comparaison aux cultures réalisées avec un compartiment lymphocytaire T « complet ». Ces expériences semblent confirmer que la séparation des populations de LT « perturbe » leur réponse cellulaire face aux LB. De même, nos résultats montrent que les LB ciblent préférentiellement certaines populations de LT pour en inhiber la prolifération. En revanche, nous n'avons pas déterminé par quels mécanismes les cellules B régulent la prolifération des LT mémoires. Par exemple, nous pouvons nous intéresser aux Treg. Sont-ils CD45RO<sup>+</sup> comme les LT mémoires ou bien CD45RO<sup>-</sup> comme les LT naïfs ? Cette question se pose car les outils d'isolation cellulaire que nous avons utilisés ne nous permettaient pas de dépleter nos échantillons en Treg. Il est décrit *ex vivo* qu'environ la moitié des Treg FoxP3<sup>+</sup> expriment CD45RA et l'autre moitié CD45RO (Zhang, Chang Li *et al.* 2013). En outre, la littérature décrit que les Treg induits dérivent de LT naïfs activés (Tran, Ramsey *et al.* 2007; Hill, Hall *et al.* 2008; Xiao, Kroemer *et al.* 2008), mais il semblerait aussi que les LT mémoires puissent être à l'origine d'une expansion de Treg (Vukmanovic-Stejic, Zhang *et al.* 2006). Dans notre cas, ces informations

soutiennent le fait que l'inhibition de la prolifération des LT mémoires pourrait en partie se faire *via* l'induction de Treg dans la culture, mais pas exclusivement. En effet, la prolifération des LT naïfs, parmi lesquels l'induction de Treg est possible, n'est pas inhibée.

Plusieurs mécanismes cellulaires sont probablement engagés pour conférer aux cellules se potentiel régulateur face aux LT mémoires. Nous avons souhaité nous pencher sur une autre fonction suppressive peut décrite qui est l'induction de la mort cellulaire par les LB. Ces derniers, nommés LB « killers », sont par exemple capables d'induire l'apoptose des LT CD4<sup>+</sup>, notamment au travers de la production de la protéine FasL ligand du récepteur de mort Fas (Klinker, Reed et al. 2013).

## **2) L'induction de la mort des lymphocytes T par les cellules B « killers »**

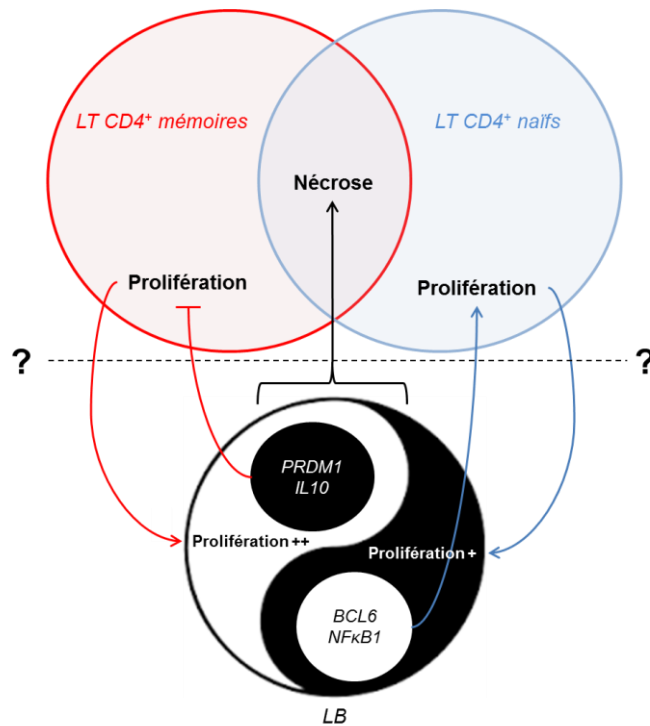
Les LT mémoires et naïfs entrent d'avantage en nécrose lorsqu'ils sont cultivés avec des cellules B. Cet effet supresseur des LB est plus important sur les LT mémoires. La mort cellulaire et la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> ont été étudiées chez la souris. Il est décrit qu'une part des LT mémoires est capable de se diviser tandis que d'autres LT mémoires ne prolifèrent pas. Il est donc probable que la survie de ces deux populations de LT CD4<sup>+</sup> mémoires soit différente (de Souza, Swanson et al. 2002; Seddon, Tomlinson et al. 2003). Ainsi, il a été décrit que la population de LT mémoires pouvant se diviser répondrait à l'engagement du TCR et aux peptides présentés *via* le CMHII des CPAs. En revanche, la population des LT CD4<sup>+</sup> mémoires qui ne prolifèrent pas nécessiterait l'IL-7 pour sa survie (Swain 2000; de Souza, Swanson et al. 2002; Swain, Agrewala et al. 2002; Seddon, Tomlinson et al. 2003). Marrack et Kapler ont décrit que la balance entre les protéines anti-apoptotique Bcl-2 et pro-apoptotique Bim joue un rôle important dans la mort des LT CD4<sup>+</sup> mémoires, tout comme l'expression de Fas (Marrack and Kappler 2004). Les articles présentés précédemment traitent des LT mais l'impact des LB sur la mort des cellules T n'y est pas évoqué. En outre, notons que dans nos expériences les LT mémoires cultivés seuls survivent. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression de FasL par les LB mis en culture avec les différentes populations de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, afin de déterminer la cause moléculaire de l'induction de la mort des LT CD4<sup>+</sup> mémoires. De même, évaluer la production de GrB par les LB nous permettrait d'éclaircir leur rôle de cellules « killers ».

## C) Les lymphocytes B s'adaptent à leur cible cellulaire

### 1) La prolifération et la survie des cellules B

La prolifération des cellules B peut être induite *in vitro* par des *stimuli* polyclonaux, de façon Ag-spécifique ou bien *via* un « cross-link » du BCR (Mond and Brunswick 2003). La contribution que peuvent avoir les populations de LT sur la prolifération des cellules B reste à éclaircir. Nos expériences démontrent, qu'en présence des LT CD4<sup>+</sup> mémoires et naïfs, les LB prolifèrent, même sans l'ajout de facteurs solubles ou d'Ac stimulants anti-IgM ou anti-IgD. Cependant, ils prolifèrent peu en présence des LT CD8<sup>+</sup>. Ces observations soulignent le fait qu'en plus d'avoir une action inhibitrice spécifique sur les LT CD4<sup>+</sup> mémoires, les LB sont capables de s'adapter à cette population de LT, et proliférer. Il a été intéressant d'observer que les LB survivent de façon équivalente, qu'ils soient cultivés avec des LT CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> naïfs ou CD4<sup>+</sup> mémoires. Ces résultats sous-entendent que seules certaines fonctions des LB sont modifiées, et que leurs réponses cellulaires sont particulièrement contrôlées, en fonction du type de LT avec lequel ils se trouvent. Plusieurs questions se posent. Quelles particularités ont les LT mémoires pour être inhibés par les LB ? Quelles modifications intrinsèques ont permis aux cellules B de devenir régulatrices de la prolifération et de la survie des LT mémoires ?

Nous émettons l'hypothèse qu'il existe une communication intercellulaire qui aboutit à l'induction de cellules B régulatrices. Cependant, nous ne pouvons pas déterminer si les cellules B ciblent spécifiquement les LT CD4<sup>+</sup> mémoires, ou si ces LT ciblent les LB avant de les orienter en cellules inhibitrices. Enfin, les LB régulateurs de la prolifération et de la survie des LT CD4<sup>+</sup> mémoires ont-ils un programme transcriptionnel différent des cellules B effectrices qui induisent la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup> naïfs ?



**FIGURE 58 : Représentation de la plasticité des lymphocytes B au travers des fonctions régulatrices ou effectrices qu’elles exercent sur les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et naïves.** Les lymphocytes B sont plastiques et peuvent inhiber la prolifération des LT ou l’induire en fonction de la population qu’ils ciblent. Ils induisent également la mort des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et naïves. Ces fonctions sont associées avec une expression différentielle des gènes *PRDM1*, *IL10*, *BCL6* et *NFκB1*. Cependant, nous ne savons pas encore quels sont les intermédiaires qui sont à l’origine des différentes fonctions présentées par les LB régulateurs et les LB effecteurs. En retour, les LT sont capables d’induire la prolifération des cellules B.

## 2) Les lymphocytes B suppresseurs surexpriment les gènes *IL10* et *PRDM1*

Il est décrit chez la souris que les cellules B IL-10<sup>+</sup> induites *in vivo* par des LPS surexpriment le gène *prdm1* (Maseda, Smith et al. 2012). Au cours de l’ontogénèse des LB, l’expression de *prdm1* s’oppose à celle de *bcl6* pour permettre la différenciation terminale des cellules B en plasmocytes (Oracki, Walker et al. 2010). Nous montrons que les LB régulateurs des LT CD4<sup>+</sup> mémoires expriment d’avantage *PRDM1* et *IL10* en comparaison aux cellules B cultivées avec des LT CD4<sup>+</sup> naïfs. Les cellules B qui induisent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs semblent avoir un profil transcriptionnel qui s’oppose à celui des LB régulateurs, car ils surexpriment *BCL6*. Ces données suggèrent que la régulation de la prolifération des LT pourrait être associée avec l’expression de gènes impliqués dans la différenciation terminale en plasmocytes.

Nous avons également étudié l'expression de p50, membre de la famille NFκB. Lorsque p50 s'associe avec p65 pour former un hétérodimère, elle participe à la voie canonique NFκB1. Cette voie canonique peut être associée à une réponse inflammatoire, à la survie, ainsi qu'à la prolifération (Hayden and Ghosh 2008; Gerondakis, Fulford et al. 2014). Nous pouvons supposer que la hausse d'expression de *NFκB1* dans les LB qui induisent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs s'oppose au rôle inhibiteur de l'IL-10 dont le gène est surexprimé dans les LB régulateurs de la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> mémoires. Cependant, nous ne savons pas encore quels sont les intermédiaires qui sont à l'origine de cette activité régulatrice des LB. En effet, quels sont les facteurs solubles mis en jeu ? Quels sont les récepteurs engagés à la surface des LT ? Le contact cellulaire est-il indispensable ?

De même, nous avons vu dans la première étude que certaines sous-populations de LB, comme les LB T2 et LB T3 sont plus performantes que d'autres pour inhiber la prolifération des cellules T. Il est donc probable que parmi les LB qui inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> mémoires, certaines populations aient ce potentiel régulateur, et d'autres non. Nous pourrions donc être plus précis quant à la caractérisation d'un programme transcriptionnel « Breg-spécifique », en étudiant les gènes exprimés par des populations de LB régulatrices plus spécifiques.

Nous avons montré dans cette seconde étude que le microenvironnement cellulaire joue un rôle majeur sur les fonctions et le programme transcriptionnel de cellules B. Les patients atteints de pathologies comme le cABMR possèdent un « terrain immunologique » particulier où la tolérance est altérée. L'environnement des cellules B au sein de ses patients est différent de celui retrouvé dans les volontaires sains, notamment à cause des traitements immunosuppresseurs qu'ils reçoivent. Dans la partie qui va suivre, nous avons souhaité discuter et émettre des perspectives sur les LB Tr. et les Breg en transplantation.



### **III. Les lymphocytes B transitionnels et régulateurs en transplantation rénale**

#### **A) Le rejet humoral chronique semble influencé par une perturbation du compartiment lymphocytaire B**

Les étapes qui précèdent le développement du cABMR n'étaient jusqu'alors pas clairement établies. En effet, même s'il est évident que les cellules B ont un rôle dans la production de DSA, rien ne permettait d'expliquer le fait que certains patients alloimmunisés n'atteignent pas le stade III critique de rejet. Notre étude a permis d'évaluer les étapes probables qui précèdent le cABMR. Ainsi, les anomalies de distribution des populations cellulaires B semblent précéder un défaut des LB pour inhiber la prolifération des LT. Cette anomalie fonctionnelle pourrait être associée avec une inflammation exagérée et une destruction tissulaire du transplant. En effet, il est décrit dans le cABMR que les lymphocytes T, notamment Th17, sont invasifs et infiltrent le rein ([Deteix, Attuil-Audenis et al. 2010](#); [Nankivell and Alexander 2010](#)).

La hausse des cellules B mémoires post-switch, soutient le fait que la présence de DSA est à associer avec la commutation de classe. Il serait intéressant de déterminer les sous-classes d'IgG produites dans les patients cABMR, en comparaison aux autres patients avec DSA. En effet, il est par exemple décrit que la production d'IgG4 est plutôt associée avec un rejet infraclinique (Infra), tandis que le rejet aigu se caractérise par des taux élevés d'IgG3 ([Lefaucheur, Viglietti et al. 2015](#)). Même si le rôle des cellules B mémoires dans le cABMR semble délétère, il a été démontré que certains patients non-traités tolérants possèdent d'avantage de cellules B mémoires avec un phénotype inhibiteur, en comparaison aux patients stables bénéficiant d'une immunosuppression ([Pallier, Hillion et al. 2010](#)). De plus, [Le Texier et al.](#) ont décrits que chez les rats qui tolèrent la greffe rénale, les cellules B qui infiltrent le transplant ont un ratio d'ARNm IgG/IgM inférieur aux LB présents dans le rein greffé des animaux qui développent un rejet chronique ([Le Texier, Thebault et al. 2011](#)). Il est particulièrement intéressant de noter que les cellules B présentes dans le sang d'animaux tolérants ont un blocage partiel de la commutation de classe.

La diminution de la fréquence de LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> dans les patients DSA<sup>+</sup>, est probablement à mettre en miroir avec l'augmentation des cellules B mémoires post-switch. En effet, il est décrit que les LB Tr. semblent avoir un rôle dans la tolérance de la greffe rénale (Shabir, Girdlestone et al. 2015). Cependant, nous n'avons pas constaté de corrélation entre le pourcentage de LB Tr. et la capacité qu'ont les cellules B à limiter la prolifération des LT chez les patients DSA<sup>+</sup>. Il est possible que les deux groupes de valeurs ne corrèlent pas car le groupe DSA<sup>+</sup> est hétérogène. En outre, il est probable que de nombreux paramètres inconnus influencent le potentiel régulateur des cellules B. Notons aussi que nous avons tenté d'associer deux paramètres fondamentalement différents, puisque l'un concerne un phénotype tandis que l'autre reflète une fonction. En effet, nous n'avons pas déterminé si les cellules B Tr. des patients sont fonctionnellement compétentes pour présenter des propriétés régulatrices. Pour répondre à cette question, il serait envisageable de dépléter le compartiment lymphocytaire B des patients DSA<sup>+</sup> en cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup>, puis de réaliser des tests fonctionnels *in vitro*, afin d'évaluer l'importance de cette population dans la régulation de la réponse T des patients. Cette approche a déjà été envisagée pour des échantillons sanguins de patients lupiques afin de pallier au problème de la quantité de cellules disponibles (Blair, Norena et al. 2010). Enfin, notons qu'il serait intéressant de réaliser des expériences sur l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires par les cellules B des patients DSA<sup>+</sup>. En effet, Nouël *et al.* ont décrit que les cellules B de patients cABMR sont défailtantes pour inhiber la réponse Th1 (Nouël, Segalen et al. 2014).

En ce qui concerne l'étude phénotypique, il aurait été particulièrement enrichissant de déterminer la composition de la population des LB Tr. CD24<sup>forts</sup> CD38<sup>forts</sup> parmi les groupes de patients DSA<sup>+</sup> et stables. En effet, y étudier la distribution des LB Tr. CD27<sup>+</sup>, T1, T2 et T3 nous auraient apporté des informations importantes quant à la possible implication des LB T3 dans la tolérance périphérique. Cependant, nous ne disposons malheureusement pas des outils nécessaires pour le réaliser lorsque l'étude BHL a débuté.

Des études se sont intéressées à l'expansion de Treg *ex vivo*, destinés à être transférés dans des receveurs, dans le but d'induire la tolérance d'une greffe, d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques (Sicard, Koenig et al. 2015). Au vu de l'ensemble des études portées sur la régulation B, il semblerait qu'une thérapie par

transfert cellulaire de Breg soit prometteuse, notamment dans le domaine de la transplantation. L'une des difficultés majeures semblent reposée sur la génération *ex vivo* de Breg autologues. En effet, même si un transfert autologue permet de pallier aux problèmes de compatibilité, les voies qui permettraient d'expandre des cellules B *ex vivo* (réellement régulatrices « à long terme » *in vivo*) restent à définir. Malgré tout, l'activation des voies TLRs, CD40 et du BCR semblent avoir montré leur efficacité, notamment pour induire des B10 immunomodulateurs.

## **B) Le suivi longitudinal est prometteur pour déterminer la cinétique d'apparition des anomalies de distribution**

Les patients suivis dans l'étude longitudinale qui sont greffés depuis un an et qui ne possèdent pas de DSA font partie du groupe ST de l'étude BHL. L'une des principales critiques qui concerne ce groupe ST, est qu'il contient des patients qui ont un délai de transplantation moyen moins important que les patients ST-DSA<sup>+</sup> et cABMR. La moyenne des délais de transplantation calculés lors des inclusions est croissante, des patients ST vers ceux cABMR, en passant par les patients ST qui ont des DSA.

C'est principalement pour cette raison qu'il sera essentiel de poursuivre l'étude longitudinale afin de suivre les patients sur une cinétique suffisamment longue pour nous permettre d'avoir un phénotype des cellules B au moment où la présence de DSA produites *de novo* est détectée. Cela confirmerait l'hypothèse émise suite à l'étude BHL, selon laquelle les DSA seraient responsables des anomalies de distribution.

Il a été intéressant de constater que le pourcentage de LB Tr. ne corrèle pas avec le délai de transplantation (données non représentées). Cette information suggère que la durée durant laquelle les patients sont exposés aux traitements immunosuppresseurs n'est pas en cause dans l'anomalie de distribution des cellules B Tr.

Nous avons constaté que le fait que les patients aient eu une pathologie autoimmune mise en cause dans la dysfonction rénale ont un défaut de repopulation en LB Tr. à 12 mois. Ce point nous amène à évoquer le statut infectieux des patients. Les infections par des *Mycobacteria* ont une incidence sur l'émergence de l'autoimmunité (Machado Ribeiro and Goldenberg 2015). Suite à une transplantation d'organe solide dans des patients infectés

par *Mycobacterium kansasii*, il peut survenir un syndrome inflammatoire au cours de la reconstitution du compartiment lymphocytaire après immunosuppression. Lemoine *et al.* conseillent de respecter une cinétique précise pour appliquer des traitements antibactériens et immunosuppresseurs face à cette infection (Lemoine, Laurent *et al.* 2015). Au-delà de la question du traitement, il se pose celle de l'influence d'une infection sur la distribution des populations de cellules B. En effet, il est possible que le syndrome inflammatoire évoqué précédemment privilégie l'expansion de cellules B ayant plutôt un profil pro-inflammatoire et/ou humoral, au détriment de LB considérés comme régulateurs. De même, il est possible que l'immuno-déplétion induite par des traitements de maintien comme la cyclosporine ciblent préférentiellement certaines populations de cellules B, possiblement régulatrices.

Les traitements d'induction pourraient également avoir un effet à long terme sur la repopulation B. En effet, il serait possible que les thymoglobulines ne permettent pas l'expansion de cellules B Tr. à 12 mois post-greffe, contrairement aux Ac-anti-IL-2R. Ces données restent très préliminaires car le nombre de patients dans le groupe traité par thymoglobulines est particulièrement faible. L'étude THYMO B évoquée précédemment permettra de répondre à certaines questions posées sur les effets des traitements d'induction.

# CONCLUSION

Le potentiel régulateur des cellules B, largement associé avec la production d'IL-10, a été mis en évidence dans des modèles murins de pathologies spécifiques d'Ag. Les cellules B Tr. CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> ont été décrites comme régulatrices, au travers de la production d'IL-10, de l'inhibition de la prolifération T, ainsi que de la suppression de la polarisation Th1. Nous avons montré que cette population est hétérogène, et composée de LB T1, T2, T3 et Tr. CD27<sup>+</sup>. Les LB T3 anergiques qui contiennent des proB10 semblent jouer un rôle dans la tolérance périphérique en limitant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup>, tandis que les LB Tr. CD27<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> nouvellement décrits inhibent la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Notons que les LB T1 et Tr. CD27<sup>+</sup> se différencient rapidement en cellules productrices d'Ac suite à la reconnaissance de signaux de l'immunité innée. Ceci soulève dans notre première étude la notion de plasmablastes régulateurs. La production d'IL-10 est en partie dépendante des signaux perçus, provenant du microenvironnement. Nous avons décrit que les LB s'adaptent aux cellules avec lesquelles ils sont cultivés. En effet, les cellules B régulent spécifiquement les LT CD4<sup>+</sup> mémoires (et non naïfs), en limitant leur prolifération avant d'induire une mort cellulaire. Ces caractéristiques fonctionnelles pourraient être associées avec une modification du programme transcriptionnel, permise par la plasticité des cellules B, qui se polarisent en Breg de façon ciblée. L'expression des gènes *PRDM1* et *IL10* serait associée avec une signature Breg spécifique en culture mixte autologue, en opposition avec celle des gènes *NF $\kappa$ B1* et *BCL6*. La transplantation rénale est un excellent modèle physiopathologique, pour étudier l'importance de certaines populations de LB dans la tolérance immunologique. L'étude BHL nous a permis de confirmer que les LB Tr. ont probablement un rôle important dans cette tolérance du greffon. La présence de DSA semble limiter l'émergence de LB Tr., même si le pourcentage de cellules B CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> n'est *a priori* pas associé avec la capacité des LB à réguler la prolifération T pour les patients alloimmunisés. L'étude longitudinale a aussi montré la sensibilité des LB Tr. face au contexte physiopathologique présent après une transplantation rénale. En effet, la maladie d'origine ainsi que les traitements d'induction et de maintien auraient probablement un impact négatif sur les LB Tr. CD24<sup>fortes</sup> CD38<sup>fortes</sup> lors de la repopulation B.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Allman, D., R. C. Lindsley, et al. (2001). "Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation." *J Immunol* **167**(12): 6834-6840.
- Anolik, J. H., J. Barnard, et al. (2007). "Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy." *Arthritis Rheum* **56**(9): 3044-3056.
- Arnon, T. I., R. M. Horton, et al. (2013). "Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress." *Nature* **493**(7434): 684-688.
- Aviszus, K., M. K. Macleod, et al. (2012). "Antigen-specific suppression of humoral immunity by anergic Ars/A1 B cells." *J Immunol* **189**(9): 4275-4283.
- Bagnara, D., M. Squillario, et al. (2015). "A Reassessment of IgM Memory Subsets in Humans." *J Immunol*.
- Balazs, M., F. Martin, et al. (2002). "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses." *Immunity* **17**(3): 341-352.
- Barnett, L. G., H. M. Simkins, et al. (2014). "B cell antigen presentation in the initiation of follicular helper T cell and germinal center differentiation." *J Immunol* **192**(8): 3607-3617.
- Batten, M., J. Groom, et al. (2000). "BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes." *J Exp Med* **192**(10): 1453-1466.
- Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 6934-6938.
- Benitez, A., A. J. Weldon, et al. (2014). "Differences in mouse and human nonmemory B cell pools." *J Immunol* **192**(10): 4610-4619.
- Bindon, C. I., G. Hale, et al. (1988). "Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q." *J Exp Med* **168**(1): 127-142.
- Blair, P. A., L. Y. Norena, et al. (2010). "CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." *Immunity* **32**(1): 129-140.
- Bouaziz, J. D., S. Calbo, et al. (2010). "IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro." *Eur J Immunol* **40**(10): 2686-2691.
- Bourke, E., D. Bosisio, et al. (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**(3): 956-963.
- Brenner, D., H. Blaser, et al. (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die." *Nat Rev Immunol* **15**(6): 362-374.
- Brent, G. A. (2008). "Clinical practice. Graves' disease." *N Engl J Med* **358**(24): 2594-2605.
- Brouard, S., A. Dupont, et al. (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant* **5**(2): 330-340.
- Browne, C. D., C. J. Del Nagro, et al. (2009). "Suppression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production is a key determinant of B cell energy." *Immunity* **31**(5): 749-760.
- Brunstein, C. G., J. S. Miller, et al. (2011). "Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics." *Blood* **117**(3): 1061-1070.
- Camacho, S. A., M. H. Kosco-Vilbois, et al. (1998). "The dynamic structure of the germinal center." *Immunol Today* **19**(11): 511-514.
- Cambier, J. C. (2013). "Autoimmunity risk alleles: hotspots in B cell regulatory signaling pathways." *J Clin Invest* **123**(5): 1928-1931.
- Capolunghi, F., S. Cascioli, et al. (2008). "CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies." *J Immunol* **180**(2): 800-808.
- Capone, G., C. Fasano, et al. (2015). "EBV-Associated Cancer and Autoimmunity: Searching for Therapies." *Vaccines (Basel)* **3**(1): 74-89.
- Cariappa, A., C. Boboila, et al. (2007). "The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations." *J Immunol* **179**(4): 2270-2281.
- Caron, G., S. Le Gallou, et al. (2009). "CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells." *J Immunol* **182**(12): 7595-7602.
- Carsetti, R., G. Kohler, et al. (1995). "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." *J Exp Med* **181**(6): 2129-2140.



- Carsetti, R., M. M. Rosado, et al. (2004). "Peripheral development of B cells in mouse and man." *Immunol Rev* **197**: 179-191.
- Carter, N. A., E. C. Rosser, et al. (2012). "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." *Arthritis Res Ther* **14**(1): R32.
- Carter, N. A., R. Vasconcellos, et al. (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* **186**(10): 5569-5579.
- Chan, V. W., F. Meng, et al. (1997). "Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation." *Immunity* **7**(1): 69-81.
- Cherukuri, A., D. M. Rothstein, et al. (2014). "Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells." *J Am Soc Nephrol* **25**(7): 1575-1585.
- Chung, J. B., M. Silverman, et al. (2003). "Transitional B cells: step by step towards immune competence." *Trends Immunol* **24**(6): 343-349.
- Cinamon, G., M. A. Zachariah, et al. (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." *Nat Immunol* **9**(1): 54-62.
- Colgan, S. P., R. M. Hershberg, et al. (1999). "Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13938-13943.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-569.
- Cornall, R. J., J. G. Cyster, et al. (1998). "Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection." *Immunity* **8**(4): 497-508.
- Cuss, A. K., D. T. Avery, et al. (2006). "Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity." *J Immunol* **176**(3): 1506-1516.
- Cyster, J. G., J. I. Healy, et al. (1996). "Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45." *Nature* **381**(6580): 325-328.
- D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, et al. (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells." *J Exp Med* **178**(3): 1041-1048.
- Daien, C. I., S. Gailhac, et al. (2014). "Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity." *Arthritis Rheumatol* **66**(8): 2037-2046.
- Dalai, S. K., S. Mirshahidi, et al. (2008). "Anergy in memory CD4+ T cells is induced by B cells." *J Immunol* **181**(5): 3221-3231.
- Daridon, C., J. O. Pers, et al. (2006). "Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome." *Arthritis Rheum* **54**(7): 2280-2288.
- de Masson, A., J. D. Bouaziz, et al. (2015). "CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease." *Blood* **125**(11): 1830-1839.
- de Souza, A. R., B. Swanson, et al. (2002). "Some properties of T cells in animals." *Adv Exp Med Biol* **512**: 121-128.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." *J Exp Med* **174**(5): 1209-1220.
- Deteix, C., V. Attuil-Audenis, et al. (2010). "Intra-graft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection." *J Immunol* **184**(9): 5344-5351.
- Di Ianni, M., F. Falzetti, et al. (2011). "Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation." *Blood* **117**(14): 3921-3928.
- Ding, Q., M. Yeung, et al. (2011). "Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice." *J Clin Invest* **121**(9): 3645-3656.
- Duggal, N. A., J. Upton, et al. (2013). "An age-related numerical and functional deficit in CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) B cells is associated with an increase in systemic autoimmunity." *Aging Cell* **12**(5): 873-881.

- Eskdale, J., P. Wordsworth, et al. (1997). "Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus." *Tissue Antigens* **49**(6): 635-639.
- Ettinger, R., G. P. Sims, et al. (2005). "IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells." *J Immunol* **175**(12): 7867-7879.
- Evans, J. G., K. A. Chavez-Rueda, et al. (2007). "Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis." *J Immunol* **178**(12): 7868-7878.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-1212.
- Feske, S. (2007). "Calcium signalling in lymphocyte activation and disease." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 690-702.
- Fillatreau, S. (2015). "Pathogenic functions of B cells in autoimmune diseases: IFN-gamma production joins the criminal gang." *Eur J Immunol* **45**(4): 966-970.
- Fillatreau, S., C. H. Sweenie, et al. (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* **3**(10): 944-950.
- Finbloom, D. S. and K. D. Winestock (1995). "IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes." *J Immunol* **155**(3): 1079-1090.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* **170**(6): 2081-2095.
- Flores-Borja, F., A. Bosma, et al. (2013). "CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." *Sci Transl Med* **5**(173): 173ra123.
- Fuchs, E. J. and P. Matzinger (1992). "B cells turn off virgin but not memory T cells." *Science* **258**(5085): 1156-1159.
- Gao, N., J. Dresel, et al. (2014). "Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheumatol* **66**(10): 2849-2861.
- Gauld, S. B., R. J. Benschop, et al. (2005). "Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling." *Nat Immunol* **6**(11): 1160-1167.
- Gaya, M., A. Castello, et al. (2015). "Host response. Inflammation-induced disruption of SCS macrophages impairs B cell responses to secondary infection." *Science* **347**(6222): 667-672.
- Gerondakis, S., T. S. Fulford, et al. (2014). "NF-kappaB control of T cell development." *Nat Immunol* **15**(1): 15-25.
- Giltiay, N. V., C. P. Chappell, et al. (2013). "Overexpression of TLR7 promotes cell-intrinsic expansion and autoantibody production by transitional T1 B cells." *J Exp Med* **210**(12): 2773-2789.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-1786.
- Goodnow, C. C., R. Brink, et al. (1991). "Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes." *Nature* **352**(6335): 532-536.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, et al. (1988). "Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice." *Nature* **334**(6184): 676-682.
- Griffin, D. O., N. E. Holodick, et al. (2011). "Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70." *J Exp Med* **208**(1): 67-80.
- Griffin, D. O. and T. L. Rothstein (2012). "Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity." *Mol Med* **18**: 1003-1008.
- Grohmann, U., F. Fallarino, et al. (2003). "Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO." *Trends Immunol* **24**(5): 242-248.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-1101.
- Grondal, G., H. Kristjansdottir, et al. (1999). "Increased number of interleukin-10-producing cells in systemic lupus erythematosus patients and their first-degree relatives and spouses in Icelandic multicase families." *Arthritis Rheum* **42**(8): 1649-1654.
- Groom, J., S. L. Kalled, et al. (2002). "Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome." *J Clin Invest* **109**(1): 59-68.

- Groom, J. R., C. A. Fletcher, et al. (2007). "BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells." *J Exp Med* **204**(8): 1959-1971.
- Grossmann, M., L. A. O'Reilly, et al. (2000). "The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression." *EMBO J* **19**(23): 6351-6360.
- Haas, M., B. Sis, et al. (2014). "Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions." *Am J Transplant* **14**(2): 272-283.
- Hagn, M., E. Schwesinger, et al. (2009). "Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21." *J Immunol* **183**(3): 1838-1845.
- Harris-Arnold, A., C. P. Arnold, et al. (2015). "Epstein-Barr Virus Modulates Host Cell MicroRNA-194 to Promote IL-10 Production and B Lymphoma Cell Survival." *Am J Transplant*.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* **132**(3): 344-362.
- Heesters, B. A., R. C. Myers, et al. (2014). "Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries." *Nat Rev Immunol* **14**(7): 495-504.
- Heine, G., G. Drozdenko, et al. (2014). "Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts." *Eur J Immunol* **44**(6): 1615-1621.
- Hill, J. A., J. A. Hall, et al. (2008). "Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells." *Immunity* **29**(5): 758-770.
- Ho, A. S., Y. Liu, et al. (1993). "A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11267-11271.
- Honjo, T., M. Muramatsu, et al. (2004). "AID: how does it aid antibody diversity?" *Immunity* **20**(6): 659-668.
- Huang, Y., G. F. Wilkinson, et al. (2010). "Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor." *Br J Pharmacol* **159**(1): 237-251.
- Hussain, S. and T. L. Delovitch (2007). "Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner." *J Immunol* **179**(11): 7225-7232.
- Ito, S., P. Ansari, et al. (1999). "Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1." *Blood* **93**(5): 1456-1463.
- Iwata, Y., T. Matsushita, et al. (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." *Blood* **117**(2): 530-541.
- Jacob, J., G. Kelsoe, et al. (1991). "Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres." *Nature* **354**(6352): 389-392.
- Jahrsdorfer, B., S. E. Blackwell, et al. (2006). "B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation." *Blood* **108**(8): 2712-2719.
- Jahrsdorfer, B., A. Vollmer, et al. (2010). "Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion." *Blood* **115**(6): 1156-1165.
- Jeannin, P., S. Lecoanet, et al. (1998). "IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10." *J Immunol* **160**(7): 3555-3561.
- Kaminski, D. A., C. Wei, et al. (2012). "Advances in human B cell phenotypic profiling." *Front Immunol* **3**: 302.
- Katsikis, P. D., C. Q. Chu, et al. (1994). "Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis." *J Exp Med* **179**(5): 1517-1527.
- Katz, S. I., D. Parker, et al. (1974). "B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions." *Nature* **251**(5475): 550-551.
- Kessel, A., T. Haj, et al. (2012). "Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells." *Autoimmun Rev* **11**(9): 670-677.
- Khan, A. R., E. Hams, et al. (2015). "PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity." *Nat Commun* **6**: 5997.
- Khoder, A., A. Sarvaria, 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**(13): 2034-2045.
- Kiefer, K., M. A. Oropallo, et al. (2012). "Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells." *Immunol Cell Biol* **90**(5): 498-504.

- Klein, U., R. Kuppers, et al. (1997). "Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans." Blood **89**(4): 1288-1298.
- Klein, U., K. Rajewsky, et al. (1998). "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells." J Exp Med **188**(9): 1679-1689.
- Klinker, M. W. and S. K. Lundy (2012). "Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes." Mol Med **18**: 123-137.
- Klinker, M. W., T. J. Reed, et al. (2013). "Interleukin-5 supports the expansion of fas ligand-expressing killer B cells that induce antigen-specific apoptosis of CD4(+) T cells and secrete interleukin-10." PLoS One **8**(8): e70131.
- Krieg, A. M. (2007). "Toll-free vaccines?" Nat Biotechnol **25**(3): 303-305.
- Kristensen, B., L. Hegedus, et al. (2015). "Characterization of Regulatory B Cells in Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis." PLoS One **10**(5): e0127949.
- Krumbholz, M., H. Faber, et al. (2008). "Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity." Brain **131**(Pt 6): 1455-1463.
- Kuhn, K. A., L. Kulik, et al. (2006). "Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis." J Clin Invest **116**(4): 961-973.
- Kumararatne, D. S. and I. C. MacLennan (1981). "Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors." Eur J Immunol **11**(11): 865-869.
- Landolt-Marticorena, C., R. Wither, et al. (2011). "Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B cells in systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **38**(4): 642-651.
- Le Texier, L., P. Thebault, et al. (2011). "Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile." Am J Transplant **11**(3): 429-438.
- Lee, K. M., J. I. Kim, et al. (2012). "Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells." Am J Transplant **12**(8): 2072-2078.
- Lefaucheur, C., D. Viglietti, et al. (2015). "IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury." J Am Soc Nephrol.
- Lemoine, M., C. Laurent, et al. (2015). "Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome Secondary to Mycobacterium kansasii Infection in a Kidney Transplant Recipient." Am J Transplant.
- Lemoine, S., A. Morva, et al. (2011). "Human T cells induce their own regulation through activation of B cells." J Autoimmun **36**(3-4): 228-238.
- Liao, W., J. X. Lin, et al. (2011). "Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages." Nat Immunol **12**(6): 551-559.
- Lindner, S., K. Dahlke, et al. (2013). "Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." Cancer Res **73**(8): 2468-2479.
- Lipsky, P. E. (2001). "Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity." Nat Immunol **2**(9): 764-766.
- Liu, Y., R. Carlsson, et al. (2014). "FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS." Nat Med **20**(3): 272-282.
- Liubchenko, G. A., H. C. Appleberry, et al. (2012). "Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile." J Autoimmun **38**(4): 293-303.
- Loder, F., B. Mutschler, et al. (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**(1): 75-89.
- Lutz, C., B. Ledermann, et al. (1998). "IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells." Nature **393**(6687): 797-801.
- Machado Ribeiro, F. and T. Goldenberg (2015). "Mycobacteria and autoimmunity." Lupus **24**(4-5): 374-381.
- Mackay, F., S. A. Woodcock, et al. (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." J Exp Med **190**(11): 1697-1710.
- Mahnke, Y. D., M. H. Beddall, et al. (2012). "OMIP-013: differentiation of human T-cells." Cytometry A **81**(11): 935-936.

- Maldonado, R. A. and U. H. von Andrian (2010). "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells." Adv Immunol **108**: 111-165.
- Marrack, P. and J. Kappler (2004). "Control of T cell viability." Annu Rev Immunol **22**: 765-787.
- Martin, F. and J. F. Kearney (2002). "Marginal-zone B cells." Nat Rev Immunol **2**(5): 323-335.
- Maseda, D., K. M. Candando, et al. (2013). "Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN-gamma+CD4+ T cell numbers during colitis development in mice." J Immunol **191**(5): 2780-2795.
- Maseda, D., S. H. Smith, et al. (2012). "Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo." J Immunol **188**(3): 1036-1048.
- Matsumoto, M., A. Baba, et al. (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." Immunity **41**(6): 1040-1051.
- Matsumoto, M., Y. Fujii, et al. (2011). "The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production." Immunity **34**(5): 703-714.
- Matsuoka, K., J. Koreth, et al. (2013). "Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease." Sci Transl Med **5**(179): 179ra143.
- Matsushita, T., K. Yanaba, et al. (2008). "Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression." J Clin Invest **118**(10): 3420-3430.
- Mauri, C., D. Gray, et al. (2003). "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells." J Exp Med **197**(4): 489-501.
- Maynard, C. L., L. E. Harrington, et al. (2007). "Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10." Nat Immunol **8**(9): 931-941.
- McCoy, C. E., F. J. Sheedy, et al. (2010). "IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors." J Biol Chem **285**(27): 20492-20498.
- McNab, F., K. Mayer-Barber, et al. (2015). "Type I interferons in infectious disease." Nat Rev Immunol **15**(2): 87-103.
- Merrell, K. T., R. J. Benschop, et al. (2006). "Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire." Immunity **25**(6): 953-962.
- Meyer-Bahlburg, A., S. F. Andrews, et al. (2008). "Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation." J Exp Med **205**(1): 155-168.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, et al. (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." Immunity **16**(2): 219-230.
- Mond, J. J. and M. Brunswick (2003). "Proliferative assays for B cell function." Curr Protoc Immunol **Chapter 3**: Unit 3 10.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2005). "GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase." Immunity **22**(5): 633-642.
- Nankivell, B. J. and S. I. Alexander (2010). "Rejection of the kidney allograft." N Engl J Med **363**(15): 1451-1462.
- Neta, R. and S. B. Salvin (1974). "Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity." J Immunol **113**(6): 1716-1725.
- Neves, P., V. Lampropoulou, et al. (2010). "Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection." Immunity **33**(5): 777-790.
- Newell, K. A., A. Asare, et al. (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-1847.
- Newell, K. A. and C. P. Larsen (2006). "Tolerance assays: measuring the unknown." Transplantation **81**(11): 1503-1509.
- Nouel, A., P. Pochard, et al. (2015). "B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in a CTLA-4 dependent manner." J Autoimmun **59**: 53-60.
- Nouel, A., I. Segalen, et al. (2014). "B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection." Kidney Int **85**(3): 590-599.
- Nouel, A., Q. Simon, et al. (2014). "Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation." Front Immunol **5**: 11.

- Oh-Hora, M., M. Yamashita, et al. (2008). "Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance." Nat Immunol **9**(4): 432-443.
- Oliver, A. M., F. Martin, et al. (1997). "Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses." Eur J Immunol **27**(9): 2366-2374.
- Oliver, A. M., F. Martin, et al. (1999). "IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells." J Immunol **162**(12): 7198-7207.
- Oracki, S. A., J. A. Walker, et al. (2010). "Plasma cell development and survival." Immunol Rev **237**(1): 140-159.
- Ozaki, K., R. Spolski, et al. (2002). "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production." Science **298**(5598): 1630-1634.
- Palanichamy, A., J. Barnard, et al. (2009). "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy." J Immunol **182**(10): 5982-5993.
- Pallier, A., S. Hillion, et al. (2010). "Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype." Kidney Int **78**(5): 503-513.
- Panitch, H., D. Goodin, et al. (2005). "Benefits of high-dose, high-frequency interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis are sustained to 16 months: final comparative results of the EVIDENCE trial." J Neurol Sci **239**(1): 67-74.
- Pascual, V., Y. J. Liu, et al. (1994). "Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil." J Exp Med **180**(1): 329-339.
- Pearse, R. N., R. Feinman, et al. (1991). "Characterization of the promoter of the human gene encoding the high-affinity IgG receptor: transcriptional induction by gamma-interferon is mediated through common DNA response elements." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11305-11309.
- Petro, J. B., R. M. Gerstein, et al. (2002). "Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling." J Biol Chem **277**(50): 48009-48019.
- Pillai, S. and A. Cariappa (2009). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." Nat Rev Immunol **9**(11): 767-777.
- Poe, J. C., S. H. Smith, et al. (2011). "Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice." PLoS One **6**(7): e22464.
- Qian, L., C. Qian, et al. (2012). "Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcgammaIIbhi regulatory B cells through IFN-beta and CD40L." Blood **120**(3): 581-591.
- Qian, Y., C. Wei, et al. (2010). "Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data." Cytometry B Clin Cytom **78 Suppl 1**: S69-82.
- Qiu, P., E. F. Simonds, et al. (2011). "Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE." Nat Biotechnol **29**(10): 886-891.
- Quach, T. D., N. Manjarrez-Orduno, et al. (2011). "Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM." J Immunol **186**(8): 4640-4648.
- Richardson, C., A. S. Chida, et al. (2013). "Molecular basis of 9G4 B cell autoreactivity in human systemic lupus erythematosus." J Immunol **191**(10): 4926-4939.
- Riley, J. K., K. Takeda, et al. (1999). "Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action." J Biol Chem **274**(23): 16513-16521.
- Rolf, J., V. Motta, et al. (2005). "The enlarged population of marginal zone/CD1d(high) B lymphocytes in nonobese diabetic mice maps to diabetes susceptibility region Idd11." J Immunol **174**(8): 4821-4827.
- Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." Immunity **42**(4): 607-612.
- Rosser, E. C., K. Oleinika, et al. (2014). "Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production." Nat Med **20**(11): 1334-1339.
- Rowland, S. L., K. F. Leahy, et al. (2010). "BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling." J Immunol **185**(8): 4570-4581.
- Sabat, R., G. Grutz, et al. (2010). "Biology of interleukin-10." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 331-344.
- Saulep-Easton, D., F. B. Vincent, et al. (2015). "The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells." Leukemia.

- Savan, R., S. Ravichandran, et al. (2009). "Structural conservation of interferon gamma among vertebrates." Cytokine Growth Factor Rev **20**(2): 115-124.
- Schubert, R. D., Y. Hu, et al. (2015). "IFN-beta treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity." J Immunol **194**(5): 2110-2116.
- Schwartzberg, P. L., L. D. Finkelstein, et al. (2005). "TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation." Nat Rev Immunol **5**(4): 284-295.
- Seddon, B., P. Tomlinson, et al. (2003). "Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells." Nat Immunol **4**(7): 680-686.
- Shabir, S., J. Girdlestone, et al. (2015). "Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study." Am J Transplant **15**(5): 1384-1391.
- Sharma, M. D., L. Huang, et al. (2013). "An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos." Immunity **38**(5): 998-1012.
- Shen, P., T. Roch, et al. (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.
- Sicard, A., A. Koenig, et al. (2015). "Cell therapy to induce allograft tolerance: time to switch to plan B?" Front Immunol **6**: 149.
- Simon, Q., J. O. Pers, et al. (2015). "In-depth characterization of CD24CD38 transitional human B cells reveals different regulatory profiles." J Allergy Clin Immunol.
- Sims, G. P., R. Ettinger, et al. (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." Blood **105**(11): 4390-4398.
- Smith, K. G., T. D. Hewitson, et al. (1996). "The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci." Eur J Immunol **26**(2): 444-448.
- Spencer, S. D., F. Di Marco, et al. (1998). "The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor." J Exp Med **187**(4): 571-578.
- Stanic, B., W. van de Veen, et al. (2015). "IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses." J Allergy Clin Immunol **135**(3): 771-780 e778.
- Su, T. T. and D. J. Rawlings (2002). "Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development." J Immunol **168**(5): 2101-2110.
- Suryani, S., D. A. Fulcher, et al. (2010). "Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells." Blood **115**(3): 519-529.
- Swain, S. L. (2000). "CD4 T-cell memory can persist in the absence of class II." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1395): 407-411.
- Swain, S. L., J. N. Agrewala, et al. (2002). "Regulation of memory CD4 T cells: generation, localization and persistence." Adv Exp Med Biol **512**: 113-120.
- Takakubo, Y. and Y. T. Kontinen (2012). "Immune-regulatory mechanisms in systemic autoimmune and rheumatic diseases." Clin Dev Immunol **2012**: 941346.
- Tangye, S. G., Y. J. Liu, et al. (1998). "Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27." J Exp Med **188**(9): 1691-1703.
- Teague, B. N., Y. Pan, et al. (2007). "Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus." J Immunol **178**(12): 7511-7515.
- Tran, D. Q., H. Ramsey, et al. (2007). "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype." Blood **110**(8): 2983-2990.
- Turner, M., A. Gulbranson-Judge, et al. (1997). "Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool." J Exp Med **186**(12): 2013-2021.
- van de Veen, W., B. Stanic, et al. (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 1204-1212.
- van der Neut Kolfsochten, M., J. Schuurman, et al. (2007). "Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange." Science **317**(5844): 1554-1557.
- van der Zee, J. S., P. van Swieten, et al. (1986). "Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies." Clin Exp Immunol **64**(2): 415-422.

- Vazquez, M. I., J. Catalan-Dibene, et al. (2015). "B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment." *Cytokine* **74**(2): 318-326.
- Vetrie, D., I. Vorechovsky, et al. (1993). "The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases." *Nature* **361**(6409): 226-233.
- Volpe, J. M. and T. B. Kepler (2009). "Genetic correlates of autoreactivity and autoreactive potential in human Ig heavy chains." *Immunome Res* **5**: 1.
- Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, et al. (2006). "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo." *J Clin Invest* **116**(9): 2423-2433.
- Wang, N., H. Liang, et al. (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." *Front Immunol* **5**: 614.
- Wang, R. X., C. R. Yu, et al. (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." *Nat Med* **20**(6): 633-641.
- Wardemann, H., S. Yurasov, et al. (2003). "Predominant autoantibody production by early human B cell precursors." *Science* **301**(5638): 1374-1377.
- Weiler, S., J. A. Ademokun, et al. (2015). "ID helix-loop-helix proteins as determinants of cell survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro." *Mol Cancer* **14**: 30.
- Weller, S., M. C. Braun, et al. (2004). "Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire." *Blood* **104**(12): 3647-3654.
- Wirhith, S. and A. Lanzavecchia (2005). "ABC1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells." *Eur J Immunol* **35**(12): 3433-3441.
- Wolf, S. D., B. N. Dittel, et al. (1996). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice." *J Exp Med* **184**(6): 2271-2278.
- Xiao, X., A. Kroemer, et al. (2008). "OX40/OX40L costimulation affects induction of Foxp3+ regulatory T cells in part by expanding memory T cells in vivo." *J Immunol* **181**(5): 3193-3201.
- Yanaba, K., J. D. Bouaziz, et al. (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." *Immunity* **28**(5): 639-650.
- Yang, X., J. Yang, et al. (2014). "T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus." *PLoS One* **9**(2): e88441.
- Yoshizaki, A., T. Miyagaki, et al. (2012). "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions." *Nature* **491**(7423): 264-268.
- Zha, B., L. Wang, et al. (2012). "Decrease in proportion of CD19+ CD24(hi) CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease." *PLoS One* **7**(11): e49835.
- Zhang, X., X. Chang Li, et al. (2013). "CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells." *PLoS One* **8**(10): e77322.
- Zheng, S. G., J. H. Wang, et al. (2006). "TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells." *J Immunol* **176**(6): 3321-3329.