



Contrôle de la fonction régulatrice des lymphocytes B : effet du Glatiramer Acetate

Kahina Amrouche

► To cite this version:

Kahina Amrouche. Contrôle de la fonction régulatrice des lymphocytes B : effet du Glatiramer Acetate. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0091 . tel-01981472

HAL Id: tel-01981472

<https://theses.hal.science/tel-01981472>

Submitted on 15 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.



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

Kahina Amrouche

Préparée au Laboratoire d'Immunologie,
Pathologie et Immunothérapie INSERM
ERI29/EA 2216

Contrôle de la fonction régulatrice des lymphocytes B: Effet du Glatiramer Acetate

Thèse soutenue 11 Décembre 2015

devant le jury composé de :

Christophe Baron / Rapporteur

PU-PH, EA 4245, Université François Rabelais, Tours, France.

Jean-Marie BERTHELOT / Rapporteur

Docteur, CHRU Nantes, Nantes, France.

Jacques-Olivier PERS / Membre

PU-PH, INSERM ERI29/EA 2216, Université de Bretagne
Occidentale, Brest, France.

Christophe JAMIN / Directeur de thèse

MCU-PH, INSERM ERI29/EA 2216, Université de Bretagne
Occidentale, Brest, France.

« La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité; elle fournira à l'Homme le seul moyen qu'il ait pour améliorer son sort. » Ernest Renan.

*Cette thèse est dédiée à mon papa de cœur Dahí et
à ma regrettée sœur de cœur Lília Ilhem Amrouche.*

Remerciement

C'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué participé, partagé et accompagné ce parcours doctoral, ce chemin de vie qui s'achève. Je remercie chacun de vous personnellement j'ai une pensée pour ceux qui ne sont plus là malheureusement à qui je dédie cette thèse. « Il y'a quelque chose de plus fort que la mort, c'est la présence des absents dans la mémoire des vivants » Jean Ormesson. A ma lyly.

J'adresse mes remerciements à M. BERTHELOT et M. Baron qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont accordé à ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Christophe Jamin pour avoir dirigé cette thèse et de m'avoir guidée tout au long de ce parcours doctoral. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'a accordée et que ce travail est à la hauteur de ses espérances.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Pr. Jacques-Olivier PERS qui m'a accueillie dans son laboratoire. Au-delà de son implication à la réussite de ce travail, il m'a permis une initiation à l'enseignement, qui est l'une des expériences les plus gratifiantes qu'il m'a été donné de vivre, merci infiniment pour cela.

La thèse est loin d'être un but en soi. C'est un cheminement, une expérience de vie, des rencontres formidables et des souvenirs indélébiles, je pense à Audrey, Marie-michèle, Yosra, Achouak, «notre» Christine, Ersi et Christina qui ont particulièrement compté pour moi. Mille mercis !

Je remercie tous les anciens et nouveaux thésards et sans oublier tous les internes et nombreux stagiaires de l'équipe EA 2216. Merci pour les nombreux bons moments passés ensemble. En toute occasion la bonne humeur est de mise, alors merci et ne changez surtout pas, vous êtes super ! « Pierre », Lénague, Thomas, Marjolaine, Quentin, Delphine, Carole, Alex, Luca, Sébastien, Thomas G. Edwige, Juliette, Marie, Amandine, Sally, Alois...

Je n'oublie évidemment pas de remercier chaleureusement les techniciennes, les secrétaires du laboratoire et l'ensemble de l'équipe EA 2216 : Annie, Christine, Nelly, Sylvie, Jean-François, Christelle, Laëtitia, Ben, Sophie, Anne, Patrice. Simone et Geneviève merci pour votre stayle !

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à mes professeurs passionnés et passionnants qui ont jalonné mon parcours d'étudiante, mon professeur de sciences naturelles le regretté M. Bakli à qui j'aurais tant souhaité remettre cette thèse, à mes professeurs d'immunologie M. Oumouna, M. Baron, M. Y. Lebranchu. Merci pour tout.

Mes remerciements vont aussi à mon amie et binôme Fatima, mon amie d'enfance Amel, à ma grande famille en Algérie, à mes parents, mes adorables Beaux-Parents, ma sœur Fella, mon frère Aghiles et bien évidemment à mon Amour de mari Areski ! Pour leur soutien indéfectible, leur encouragement et leur amour. Je remercie particulièrement mon papa pour sa relecture et qui s'est sans doute arraché les cheveux pour essayer de comprendre le sens souvent tortueux de mes phrases. Promis cette fois c'est belle est bien la dernière, le chapitre est clos.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERE

1. LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS	1-14
1.1 LES EVENEMENTS MARQUANTS DE L'HISTOIRE DU BREG	1-14
1.2 LES MULTIPLES FACETTES DU LYMPHOCYTE B REGULATEUR	1-18
1.2.1 LE BREG CHEZ LA SOURIS.....	1-18
1.2.2 LES B10 CHEZ LA SOURIS.....	1-19
1.2.3 LES B REGULATEURS TIM-1 ⁺	1-19
1.2.4 LES B REGULATEURS IL-35 ⁺	1-20
1.2.5 LES B10 (Br1) CHEZ L'HOMME	1-22
1.2.6 LES LB REGULATEURS GRANZYME B ⁺	1-25
1.2.7 LE PHENOTYPE BREG DANS LE CANCER	1-26
1.2.8 LES B REGULATEURS IL-33 ⁺	1-28
1.2.9 LES B REGULATEURS CD73 ⁺ OU LES BREGS CD73 ⁻ ?	1-29
1.2.10 LES B REGULATEURS DU TISSUS ADIPEUX	1-30
1.2.11 LES B REGULATEURS INDUITS	1-30
1.2.12 LES B REGULATEURS PLASMABLASTES.....	1-31
1.3 ONTOGENESE ET DEVELOPPEMENT DES BREGS DE 2010 A 2014	35
1.3.1 CHEZ LA SOURIS	35
1.3.2 CHEZ L'HOMME.....	38
1.4 SIGNAUX INDUCTEURS DE B REGULATEURS.....	41
1.4.1 LE CONTACT CELLULAIRE ET L'INTERACTION CD40/CD40L	41
1.4.2 LA SIGNALISATION DU BCR.....	43
1.4.3 LE RECEPTEUR A L'IL-21.....	45
1.4.4 LES VOIES DES TLRs.....	46
1.4.5 AUTRES SIGNAUX INDUCTEURS DE BREGS.....	49
1.4.6 LES UV ET VITAMINE D	50
1.4.7 LES CYTOKINES INDUCTRICES DE BREGS	51
1.4.8 CONCLUSION.....	56
1.5 LE BREG, UNE CELLULE POLYVALENTE	57
1.5.1 INDUCTION DE TREGS.....	57
1.5.2 SUPPRESSION DES T PRO-INFLAMMATOIRES	61
1.5.3 CONTROLE DE LA FONCTION DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES	66
1.5.4 ENTRAVE LA SURVEILLANCE IMMUNITAIRE DES CELLULES NK	70
1.5.5 INHIBITION DU SOI « INTERACTION BREG ET LB ».....	71
1.5.6 CONCLUSION.....	74
2. LES B REGULATEURS DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES	77
2.1 LA SCLEROSE EN PLAQUES.....	77
2.1.1 CHEZ LA SOURIS (L'ENCEPHALOMYELITIS EXPERIMENTALE AUTO-IMMUNE)	77
2.1.2 CHEZ L'HOMME.....	78
2.2 LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN	79
2.2.1 CHEZ LA SOURIS	79
2.2.2 CHEZ L'HOMME :	81
2.3 LE DIABETE DE TYPE I.....	82
2.3.1 CHEZ LA SOURIS	82

2.3.2	CHEZ L'HOMME.....	82
2.4	L'ARTHRITE INDUITE PAR LE COLLAGENE	83
2.4.1	CHEZ LA SOURIS	83
2.4.2	CHEZ L'HOMME.....	84
2.5	LE LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ.....	85
2.5.1	ROLE PATHOGENE ET PROTECTEUR DES LB DANS LE LED	86
2.5.2	ORIGINE DU DYSFONCTIONNEMENT DES BREGS DANS LE LED	91
3.	LE GLATIRAMER ACETATE	96
3.1	SERENDIPITE DU GLATIRAMER ACETATE	96
3.2	CHIMIE ET BIODISPONIBILITE DU GLATIRAMER ACETATE	99
3.3	MECANISMES D'ACTION DU GA DANS LA SEP ET L'EAE.....	102
3.3.1	MODULATION DES LT CD4 ⁺	103
3.3.2	MODULATION DES LT CD8 ⁺	108
3.3.3	MODULATION DES TREGS	110
3.3.4	MODULATION DES TH17	113
3.3.5	MODULATION DES CELLULES NK	114
3.3.6	MODULATION DES MONOCYTES	116
3.3.7	MODULATION DES CELLULES DENDRITIQUES	116
3.3.8	MODULATION AU SEIN DU SYSTEME NEVEUX CENTRAL	119
4.	GLATIRAMER ACETATE ET LYMPHOCYTES B: DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE A L'HOMME	124
4.1	PLACE DU LB DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP	124
4.2	GLATIRAMER ACETATE ET REPOSE HUMORALE	128
4.3	EFFET DU GLATIRAMER ACETATE SUR LES LYMPHOCYTES B	131
4.3.1	CHEZ LA SOURIS	131
4.3.2	CHEZ L'HOMME.....	135
4.1	FIXATION DU GLATIRAMER ACETATE SUR LES LYMPHOCYTES B	136
4.2	EFFET THERAPEUTIQUE DU GA SUR LES LB DANS LA SCLEROSE EN PLAQUES.....	137
5.	EFFICACITE THERAPEUTIQUE DU GA DANS D'AUTRES MALADIES AUTO-IMMUNES	141
5.1	UVEORETINITE AUTO-IMMUNE EXPERIMENTALE (EAU)	141
5.2	LES MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN (IBDs)	141
5.3	LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE.....	142
5.4	ARTHRITE INDUITE PAR LE COLLAGENE	143
5.5	LE DIABETE NON OBESE	143
5.6	LE MODELE SPONTANE DE LUPUS ERYTHEMATEUX SYSTEMIQUE.....	144
6.	OBJECTIF DE LA THESE	147
7.	MATERIEL ET METHODES.....	150
7.1	MILIEUX DE CULTURES.....	150
7.2	PATIENTS ET CONTROLES	150
7.3	PURIFICATION DES LYMPHOCYTES B ET LYMPHOCYTES T	151
7.4	ANTICORPS	153
7.5	PREPARATION DU GLATIRAMER ACETATE	154
7.6	MICROSCOPIE CONFOCALE.....	155

7.7	CULTURES CELLULAIRES	155
7.8	MESURE DE LA PROLIFERATION ET DE LA SURVIE CELLULAIRE DES LB	158
7.9	MESURE DE LA PROLIFERATION	159
7.10	TRI CELLULAIRE	160
7.11	MESURE DE LA PRODUCTION D'IFN- γ PAR LES LYMPHOCYTES T	161
7.12	EVALUATION DE LA PRESENCE DE LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....	161
7.13	ELISAs.....	161
7.14	ANALYSES STATISTIQUES	162
8.	RESULTATS	164
8.1	LE GA POTENTIALISE OU RESTAURE L'EFFET REGULATEUR DES LB <i>IN VITRO</i>.....	164
8.1.1	LE GA POTENTIALISE LA FONCTION REGULATRICE DE LB HUMAINS DE TEMOINS SAINS.....	164
8.1.2	LE GA RESTAURE LA FONCTION REGULATRICE DES LB HUMAINS DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE 165	
8.1.3	FIXATION DU GA SUR LES LB <i>IN VITRO</i>	167
8.1.4	LE GA EXERCE SON EFFET SUPPRESSEUR SUR LE B MEMOIRE <i>IN VITRO</i>	171
8.1.5	LA PRE-STIMULATION DES LB D'AMYGDALES PAR LE GA ACCROIT LEUR FONCTION BREG.....	173
8.2	MODE D'ACTION DU GA SUR LES LB	175
8.2.1	FIXATION DU GA SUR LES LB D'AMYGDALES	177
8.2.1	ROLE DE LA FIXATION DU GA SUR LES MOLECULES HLA-DR DANS LA REGULATION	181
8.2.2	FIXATION DU GA SUR LES LB D'AMYGDALES.	187
8.2.3	EFFET DU GA SUR LES SOUS POPULATIONS LB MATURES ET MEMOIRES D'AMYGDALES.....	190
8.2.4	EFFET DU GA SUR LA SURVIE ET LA PROLIFERATION DES LB D'AMYGDALES	195
8.3	EFFET DU GA SUR LE PHENOTYPE BREG.....	197
8.4	EFFET DU GA SUR LE PHENOTYPE DES BREGS CHEZ LES PATIENTS LED.....	200
9.	DISCUSSION.....	206
9.1	ETUDE DE L'INDUCTION DE LA FONCTION REGULATRICE DES LB HUMAINS	207
9.1.1	DANS UN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE.....	207
9.1.2	DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE (Le LED)	209
9.2	RESTAURATION DE LA FONCTION REGULATRICE DES LB <i>IN VITRO</i>	212
9.2.1	ETUDE DE LA FONCTION REGULATRICE DES LB PRE-STIMULES PAR LE GLATIRAMER ACETATE	212
9.2.2	LES VOIES DE SIGNALISATION POSSIBLEMENT EMPRUNTEES PAR LE GA	214
9.3	FIXATION DU GLATIRAMER ACETATE SUR LES LB	216
9.4	IDENTIFICATION DE LA SOUS-POPULATION LB A L'ORIGINE DES EFFETS DU GA	218
9.5	MECANISME D'ACTION DU GLATIRAMER ACETATE	220
9.5.1	LE GLATIRAMER ACETATE ET LA CPA.....	220
9.5.2	REPOSE CLINIQUE ET REPOSE IMMUNOLOGIQUE DU GLATIRAMER ACETATE.....	224
9.6	MODES DE FIXATION ET LES VOIES D'ENTRÉE POSSIBLE DU GA DANS LE LB.	226
9.6.1	LE GLATIRAMER ACETATE, ANTIGENE UNIVERSEL ?.....	226
9.6.2	LE GLATIRAMER ACETATE ET LE BCR.....	229
9.7	ROLE DE LA FIXATION DU GA SUR LA MOLECULE HLA-DR DANS LA REGULATION.....	231
9.8	MODE D'INTERNALISATION DU GLATIRAMER ACETATE	233
9.8.1	LE GA CO-LOCALISE AVEC DE NOMBREUSES MOLECULES A LA SURFACE DES LB.....	235
9.8.2	LES MECANISMES DETERMINANTS LES VARIABILITES DE FIXATION DU GA	237
9.9	EFFET DU GLATIRAMER ACETATE SUR LES SOUS POPULATIONS LB	242
9.10	LE GA ACCROIT UNIQUEMENT LA FONCTION REGULATRICE DES LB MEMOIRES.....	243
9.10.1	LE GA FAVORISE LE CONTROLE DE LA PROLIFERATION T PAR LES LB MEMOIRES	243
9.10.2	LE GA AFFECTE LA PRODUCTION D'IL-10 PAR LES LB MEMOIRES	245

9.11	MECANISME D’ACTION DU GLATIRAMER ACETATE SUR LES B MEMOIRES.....	248
9.11.1	EFFET DU GA SUR LA SURVIE ET LA PROLIFERATION DES LB MEMOIRES	248
9.11.2	EFFET DU GA SUR LE PHENOTYPE BREG.....	250
9.12	LE GA RESTAURE LE PHENOTYPE DES BREGS PRODUCTEURS D’IL-10 IN VITRO CHEZ LES PATIENTS LED	253
10.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES DU PROJET.....	258

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Caractéristiques fonctionnelles des Bregs.	73
Figure 2 :	Rôle protecteur et pathogénique des LB dans le lupus.	90
Figure 3 :	Structure du Glatiramer acetate.	101
Figure 4 :	Antagonisme entre le GA et la protéine MBP 82-100 pour le TCR.	104
Figure 5 :	Mécanisme d'action du GA	121
Figure 6 :	Influence des LB issus de souris traitées au GA sur le développement de la réponse immunitaire.	134
Figure 7 :	Rôle possible du LB dans l'effet protecteur du GA dans l'auto-immunité.	139
Figure 8 :	Protocole du marquage du GA ou de la BSA au FITC	154
Figure 9 :	Protocole de la stimulation des LB d'amygdales par le GA avant ou pendant la co-culture avec les LT autologues	156
Figure 10 :	Protocole expérimental utilisé avec le système transwell	157
Figure 11 :	Protocole expérimental mis en place pour l'étude de la prolifération des sous populations LB matures et LB mémoires triés	158
Figure 12 :	Analyse de la prolifération des lymphocytes	159
Figure 13 :	Protocole expérimental mis en place pour l'étude des sous-populations LB mature et mémoires triées	160
Figure 14 :	Protocole expérimental mis en place pour la stimulation des LB d'amygdales par le GA	162
Figure 15 :	La pré-stimulation des LB par le GA potentialise ou restaure leur fonction suppressive.	166
Figure 16 :	Caractérisation de la fixation du Glatiramer acetate sur les LB.	168
Figure 17 :	Les LB fixant fortement le GA sont retrouvés au sein du compartiment mémoire.	170
Figure 18 :	Rôle du LB mémoire dans l'induction de la fonction Breg en présence de GA.	172
Figure 19 :	La pré-stimulation des LB d'amygdales par le GA accroît leur fonction Breg.	174
Figure 20 :	Le mode d'action du GA est contact cellulaire dépendant mais Treg indépendant.	176
Figure 21 :	Caractérisation de la fixation du GA sur les LB.	178
Figure 22 :	Cinétique de la fixation GA sur les LB.	180
Figure 23 :	Rôle des molécules HLA-DR dans l'induction de la fonction Breg par le GA.	183
Figure 24 :	Effet du GA dans l'interaction LB/ LT.	186
Figure 25 :	Les B mémoires des organes lymphoïdes secondaires fixent fortement le GA.	189
Figure 26 :	Le GA accroît uniquement la fonction régulatrice des LB mémoires.	192
Figure 27 :	Le GA induit une augmentation de la production d'IL-10 dans les LB mémoires.	194
Figure 28 :	Effet du GA sur la prolifération et la survie des LB.	196
Figure 29 :	Le GA est responsable du phénotype Breg des LB mémoires des organes lymphoïdes secondaires.	199
Figure 30 :	La pré-stimulation des LB lupiques par le GA favorise un phénotype Breg.	203
Figure 31 :	Schéma représentant les modes de fixation et les voies d'entrée possible du GA dans le LB.	239
Figure 32 :	Mécanisme d'action du Glatiramer acetate sur le LB humain in vitro	241

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	<i>Phénotype et fonction des Bregs chez la souris et chez l'Homme</i>	1-34
Tableau 2 :	<i>Mécanismes d'action du Glatiramer Acetate.</i>	122
Tableau 3 :	<i>Effets du Glatiramer acetate dans d'autres modèles murins d'auto-immunité</i>	145

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

AC	Anticorps
Ag	Antigène
ARNm	Acide ribonucléique messager
B10	Lymphocyte B sécréteur d'IL-10
BAFF	B-cell activating factor belong to TNF family
Bcl-6	B cell lymphoma de type 6
BCR	B cell receptor
Bm	Lymphocyte B mature
Breg (s)	Lymphocyte B régulateur(s)
BSA	Bovine serum albumin
CD40L	CD40 ligand
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CG	Centre germinatif
CMH I et II	Complexe Majeure d'histocompatibilité de Type I et II
CPA	Cellules Présentatrices d'antigènes
CpG-ODN	Cytidine phosphate guanosine oligodeoxynucleotide
CTL	Lymphocyte T CD8 ⁺ cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic t-lymphocyte antigen 4
CXCL-13	Chemokine (c-x-c motif) ligand 13
CXCR	Chemokine (c-x-c motif) receptor
DCm ou DCi	Cellule dendritique mature ou immature
EAE	Encéphalite auto-immune expérimentale
EBV	Epstein-barr virus
FasL	Fas ligand
FITC	Isothiocyanate de fluoresceine
Foxp3	Forkhead box p3
GITR-L	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor ligand
HLA	Human leucocyte antigen
ICOS	Induced costimulatory
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-6/10/12/21	Interleukine 6/10/12/21...
IL21R	Interleukine 21 récepteur
IMF	Intensité moyenne de fluorescence
IRF-4	Interferon regulatory factor de type 4
KLH	Keyhole limpet hemocyanin

LB T1 et T2	Lymphocyte B transitionnel de type 1 et de type 2
LB ZM	Lymphocyte B de la zone marginale
LED	Lupus érythémateux disséminé
LPS	Lipo-polysaccharide
LT	Lymphocyte T
MBP	Myelin basic protein
MO	Moelle osseuse
MOG	Myelin basic glycoprotein
MyD88	Myeloid differential factor 88
NK	Cellule natural killer
OLS	Organe lymphoïde secondaire
OVA	Ovalbumine
Pax-5	Paired box 5
PBS	Phosphate buffered saline
PC5 et 7	Phycoerythrine-cyanine 5 et 7
PD-1	Programmed death de type 1
PD-L1 et L2	Programmed cell death 1 ligand 1 et ligand 2
PI3 Kinase	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PLP	Proteolipid protein
Prdm1	Gene codant pour le facteur blimp-1
Rag 1/2	Recombination activating gene de type 1/2
RORγt	Receptor orphelin de rétinoïde
SAC	Staphylococcus aureus cowan strain i
SEP	Sclérose en plaques
SNC	Système nerveux central
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription-3
TCR	T cell receptor
Tfh	Lymphocyte T folliculaire
TGF-β	Tumor growth factor de type beta
Th1/2/17	T helper de type 1 et 2/17
TIM-1	T-cell Ig mucin-1
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor de type α
Tr1	Lymphocyte T régulateur de type 1
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRITC	Tetra methyl rhodamine isothiocyanate
UV	Ultra violet

INTRODUCTION

LE LYMPHOCYTE B REGULATEUR

1. Les Lymphocytes B régulateurs

1.1 Les évènements marquants de l'histoire du Breg

La découverte des lymphocytes T régulateurs (Tregs) pouvait laisser entrevoir l'existence de lymphocytes B régulateurs (Bregs). Alors que le lymphocyte T n'est sollicité que tardivement, une fois l'antigène (Ag) scindé en peptides, le lymphocyte B (LB), grâce à son récepteur de membrane B cell Receptor (BCR), capte l'Ag rapidement sous sa forme native. Il aurait pu donc être prédit que les Bregs intervenaient plus tôt que les Tregs (Mauri et al. 2008).

Tout commence dans les années 50, d'une observation selon laquelle certains déficits immunitaires B étaient associés à des manifestations d'auto-immunité (cytopénies) (Cunningham-Rundles 2011). En 1974, Kartz et collaborateurs concrétisent un peu plus cette relation et démontrent que la déplétion du compartiment B dans une préparation de splénocytes annule la capacité d'inhiber la réponse d'hypersensibilité retardée dans le cochon d'Inde lors de son transfert adoptif (Katz et al. 2006). C'est ainsi qu'une première conclusion d'une régulation de la fonction T par des LB suppresseurs est clairement apportée. Il s'en est suivi des études montrant que le transfert adoptif de LB activés par un antigène aboutit à un état de tolérance dans des souris receveuses naïves, en favorisant notamment, la différenciation de LT suppresseurs (L'Age-Stehr et al. 1980, Shimamura et al. 1984).

En 1983, Kennedy et Thomas, en réalisant un transfert adoptif de splénocytes pré-stimulés par un complexe immunoglobuline Ig Dinitrophenyl humaine, vont évoquer une différenciation de LB régulateurs spécifiques de l'antigène capable d'empêcher une réponse immunitaire secondaire anti-hapten (Kennedy et al. 1983). Malgré toutes ces observations encourageantes de

l'époque, le rôle suppresseur des LB dans la régulation immunitaire sera négligé durant une décennie encore. Il a fallu attendre 1996 grâce aux travaux publiés par Wolf Janeway et ses collègues pour réellement mettre en évidence cet effet Breg dans les maladies auto-immunes (Wolf et al. 1996). Ils observent que les souris déficientes en LB, immunisées avec de la protéine basique de la myéline (MBP) dans un adjuvant complet de Freund's sont atteintes d'une forme plus sévère d'Encéphalite Expérimentale Auto-immune (EAE) sans rémission spontanée habituelle en comparaison avec les souris sauvages. Cette observation va susciter de nombreux travaux démontrant de plus en plus ce rôle Breg chez la souris.

Fillatreau, Anderson et collaborateurs démontrent que l'exacerbation de l'EAE dans les souris μ MT est la conséquence spécifique d'une déficience en LB producteurs d'IL-10 (Fillatreau et al. 2002). Mizoguchi et Bhan, vont être les premiers à véritablement adopter le terme de B régulateurs pour les cellules B affichant des propriétés inhibitrices (Mizoguchi et al. 2002, Mizoguchi et al. 2006). Ils rapportent que la déficience B dans des souris atteintes d'une colite spontanée conduit à un début précoce de la maladie avec une exacerbation de l'inflammation intestinale. Au départ, ils s'accordent à penser à une protection dépendante des anticorps (AC) puisqu'ils observaient qu'une injection d'Ig purifiés de souris déficientes en TCR α atténuait la colite dans les souris μ MT receveuses. Finalement, ils démontreront que des Bregs se différencient dans un environnement inflammatoire chronique. Ces LB affichent une singularité phénotypique avec une forte expression de CD1d, produisent de l'IL-10 et suppriment la progression de l'inflammation intestinale. Ces Bregs régulent à la baisse directement la cascade associée à l'inflammation, par une activation de l'IL-1 β et de la voie STAT-3. Finalement, on sait aujourd'hui que leur première conclusion n'est pas totalement à exclure grâce aux travaux de Maseda et de son équipe. Nous savons aujourd'hui que les Bregs producteurs d'IL-10 sont

transitoires puisqu'ils se différencient *in vivo* en plasmablastes à fort potentiel régulateur producteurs d'IgG et d'IgM (Maseda et al. 2012).

Mauri et collaborateurs est une équipe qui a grandement apportée à nos connaissances actuelles du Breg, aussi bien chez la souris que chez l'Homme. Ils démontrent une fonction suppressive des LB producteurs d'IL-10 dans l'arthrite induite par le collagène (CIA) (Mauri et al. 2003). En 2014, ils évoquent une interdépendance des manifestations inflammatoires de l'arthrite sur le microbiote intestinal commensal. Le microbiote intestinal induirait la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 par les cellules dendritiques et les macrophages. Ces derniers favorisent à la fois la différenciation Th17 et la survenue de l'arthrite (Wu et al. 2010, Shaw et al. 2012). Ces mêmes signaux par le microbiote induisent la différenciation des Bregs. Comme si le microbiote permettait aux Bregs de devenir fonctionnellement suppressifs et les chargerait dans un second temps à supprimer l'arthrite induite par un antigène (Rosser et al. 2014). Le microbiote intestinal favoriserait donc à la fois une réponse pro-inflammatoire et une réponse régulatrice. C'est un équilibre auquel concède notre système immunitaire afin de rapidement éliminer l'infection tout en étant capable de réduire au minimum les dommages collatéraux inflammatoires.

D'autre part, les résultats des modèles expérimentaux ont depuis confirmé que la déplétion en LB pouvait paradoxalement induire des allergies (asthmes, eczéma) ou des maladies auto-immunes (EAE, colites, cirrhoses biliaires, arthrites, diabètes), qui seraient corrigées par l'apport de LB syngéniques (Noh et al. 2011). Par exemple, dans le lupus, les effets décevants du rituximab pourraient provenir du fait que l'effet bénéfique de la déplétion des LB effecteurs soit associé à la déplétion simultanée de Bregs (Jamin et al. 2008). De ce fait, on sait aujourd'hui que

ces derniers sont déjà moins nombreux dans le lupus à l'état basal (Blair et al. 2010), (Lemoine et al. 2011), (Gao et al. 2014).

En plus du rôle des Bregs dans le contrôle de l'inflammation auto-immune largement documenté grâce au modèle murin. Chez l'Homme, il y a de plus en plus d'arguments en faveur d'une signature Breg dans divers modèles de tolérance telles que la transplantation, la grossesse, la tolérance à long terme des apiculteurs au venin d'abeille ou encore des infections par un parasite extracellulaire comme les helminthes (Correale et al. 2008) (Newell et al. 2010) (Pallier et al. 2010) (Rolle et al. 2013); (van de Veen et al. 2013).

En conclusion, les Bregs peuvent être considérés comme des régulateurs clés dans plusieurs états pathologiques grâce à leur production d'IL-10. L'IL-10 est largement utilisé pour se substituer à un potentiel marqueur de Breg dans de nombreuses études. Cependant, il est important de ne pas oublier que l'IL-10 produit par les LB peut aussi agir de manière autocrine comme facteur de survie et de croissance. Par conséquent, très vite une recherche approfondie d'un phénotype caractéristique est envisagée par les spécialistes du Breg. Tandis que la quête à l'identification d'un unique marqueur de la population Breg continue, les nombreuses investigations entreprises ces 10 dernières années ont révélé qu'aucun marqueur ne définit de façon spécifique un Breg aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Les données disponibles dans la littérature à ce sujet sont résumées dans la prochaine partie et suggèrent que le Breg n'est pas une seule et unique population homogène mais que plusieurs sous-types peuvent être identifiés avec des populations qui partagent des caractéristiques avec aussi bien les LB immatures naïfs que les LB matures ou encore mémoires.

1.2 Les multiples facettes du Lymphocyte B régulateur

Depuis la première description du Breg en 2002 par Mizoguchi (Mizoguchi et al. 2002) jusqu'à ce jour; le phénotype Breg n'a pas été clairement défini. Aucun marqueur ne le détermine de façon spécifique et certaine, aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Tout compte fait, les données disponibles dans la littérature suggèrent que le Breg n'est pas une seule et unique population homogène mais que plusieurs sous types de LB peuvent être discriminés selon les différentes conditions inflammatoires établies. **(Tableau1)** Dans cette partie nous allons décrire les divers phénotypes de Bregs murins et humains rapportés dans littérature.

1.2.1 Le Breg chez la souris

Depuis les années 2000, plusieurs sous-populations de LB ont été identifiées comme Breg chez la souris, chacune avec un ensemble de marqueurs de surface. Mizoguchi en 2002 a décrit une population régulatrice de LB splénique $CD21^{inter} CD23^{+} CD1d^{+}$ (Mizoguchi et al. 2002). Par la suite, l'équipe de Claudia Mauri (Evans et al. 2007) a décrit une population avec un phénotype de LB transitionnels précurseurs de la zone marginale (T2 - MZP). Cette population $CD21^{Fort} CD23^{Fort} IgM^{+}$ est identifiée comme responsable de la régulation dans un modèle d'arthrite induite par le collagène. Ce phénotype va être confirmé dans un autre modèle murin d'arthrite (Carter et al. 2011) puis de lupus (Blair et al. 2009). Une autre équipe (Watanabe et al. 2007) a défini en 2007 la population régulatrice comme provenant de la zone marginale de la rate et exprimant les marqueurs $CD21^{High} CD23^{faible}$. L'année suivante en 2008 a été marquée par la découverte des LB dits B10 dont le phénotype, à ce jour bien établi de Breg producteurs d'IL-10 est $CD5^{+} CD1d^{fort}$ (Yanaba et al. 2008).

1.2.2 Les B10 chez la souris

Chez la souris, les Br1 ou «B10» sont surtout présents dans la rate et la cavité péritonéale mais peuvent être détectés dans le sang où ils représentent 1 % à 3 % des LB. Les B10 (Yanaba et al. 2009) sont définis par leur fonction c'est-à-dire par leur capacité à sécréter des quantités importantes d'IL-10. La recherche du phénotype des LB producteurs d'IL-10 dans la souris fut posée en utilisant une approche constante à déterminer le phénotype des LB qui pourraient, après purification et stimulation *in vitro*, exprimer de l'IL-10. Cette stratégie a permis d'identifier une petite population de LB CD1d^{fort} CD5⁺ qui représente 15 à 20 % des cellules de la souris C57BL/6. Cette sous population partage des marqueurs de surface communs avec un ensemble de sous-populations de LB bien définie phénotypiquement tels que les B1-a CD5⁺, les LB de la zone marginale CD1d^{fort} CD23⁻ IgM^{fort} et les précurseurs B T2 de la zone marginale CD1d^{fort} CD23⁺ IgM^{fort} qui incontestablement contiennent tous des B10 et des précurseurs pro-B10 (Mizoguchi et al. 2006, Serra et al. 2006, Matsushita et al. 2008, Yanaba et al. 2008). Les B10 chez la souris sont principalement IgD^{faible} IgM^{fort} (moins de 10% co-expriment l'isotype IgG ou IgA) et ils peuvent se différencier en cellules productrices d'AC poly réactifs ou d'isotypes IgM ou IgG spécifiques de l'Ag (Maseda et al. 2012).

1.2.3 Les B régulateurs TIM-1⁺

L'équipe de Ding en 2011 a tenté d'identifier un marqueur de surface dominant des B10 compétents. Ils ont montré que les LB IL-10⁺ sont enrichis dans le compartiment des LB exprimant la molécule de co-stimulation T cell Ig domain and Mucin domain protein 1 (TIM-1) et que les LB TIM-1⁺ sont enrichis dans le compartiment CD1d^{fort} CD5⁺. Seuls les LB TIM-1⁺ et non pas les LB TIM-1⁻ peuvent transférer la tolérance dans l'allogreffe (Ding et al. 2011).

Cependant les LB IL-10⁺ ont été aussi présents dans le compartiment TIM-1⁻ et les LB TIM-1⁺ également présents dans le compartiment non CD1d^{fort} CD5⁺.

Les LB TIM-1⁺ sont 8 à 20 plus enrichis en IL-10 en comparaison avec toutes les autres sous-populations de LB et 70% des LB IL-10⁺ sont TIM-1⁺. TIM-1 à défaut d'être un marqueur caractéristique du Breg pourrait représenter un marqueur inclusif pour les Bregs IL-10⁺ (Ding et al. 2011). Cependant, le marquage intracellulaire de l'IL-10 cytoplasmique s'avère finalement la seule manière à ce jour d'objectiver l'ensemble de la sous population de LB IL-10 compétent.

L'expression de TIM-1 reflète un état particulier d'activation B puisque cette molécule peut être induite dans des cellules TIM-1⁻ suite à une stimulation *in vitro*. Ainsi, les LB TIM-1⁻ peuvent réguler à la hausse l'expression de TIM-1 *in vivo* dans les souris receveuses suite à leur transfert adoptif (Ding et al. 2011). Ce qui suggère que les LB TIM-1⁻ peuvent acquérir la capacité à exprimer TIM-1 et l'IL-10 sous des stimulations appropriées et par conséquent c'est un contre-argument à l'existence d'une sous-population régulatrice unique et innée. De récents travaux ont identifié une stimulation impliquée dans la production d'IL-10 par les B TIM-1⁺. Le domaine mucine de TIM-1 jouant le rôle de récepteur de la phosphatidyl sérine des cellules apoptotiques, la fixation des corps apoptotiques au récepteur mucine TIM-1 sans nécessité d'internalisation induit la production d'IL-10 dans les LB TIM-1⁺ (Yeung et al. 2015) (Xiao et al. 2015).

1.2.4 Les B régulateurs IL-35⁺

Deux études complémentaires ont récemment identifié les LB IL-35⁺ aussi bien comme inducteurs que médiateurs de la fonction Breg. Wang et collaborateurs ont montré que cette cytokine induit des Bregs qui secrètent à la fois de l'IL-10 et de l'IL-35 (Breg IL-35⁺). L'IL-35 joue un rôle dans la régulation de l'inflammation dans un modèle murin d'auto-immunité

oculaire (EAU) et l'absence de production d'IL-35 par les LB dans les souris augmente la survie après infection par *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Wang et al. 2014).

Pour tester l'importance de l'IL-35 *in vivo*, Shen et collaborateurs ont induit l'EAE dans un modèle de souris dont les LB sont déficients en chaîne P35 ou EBi3 de la cytokine IL-35. Ils constatent une aggravation importante de l'EAE associée à une protection renforcée contre la septicémie induite par *Salmonella Enterica serovar Typhimurium* en comparaison à celle observée dans les souris sauvages. Ces résultats viennent compléter le rôle de l'IL-35 décrit à la même période par Wang et collaborateurs et confirment l'importance de IL-35 dérivée du LB dans la régulation de l'inflammation *in vivo* (Shen et al. 2014). Dans le modèle d'infection à *Salmonella*, la production d'IL-10 et d'IL-35 est presque totalement restreinte aux plasmocytes CD138⁺, un marqueur qui n'a pas été exploré par Wang et collaborateurs. En revanche, les deux études mettent en avant un enrichissement en IL-35 au sein de la population LB exprimant CD1d et TIM-1 suggérant un phénotype qui se chevauche.

De manière intéressante, les T2-MZP des souris déficientes en P35 ont une fonction régulatrice normale ce qui suggère que la fonction suppressive de cette sous-population de Breg n'est pas liée à la production d'IL-35 (Vasconcellos et al. 2011).

Une différence majeure entre les deux études citées plus haut est la relation de l'IL-35 et de l'IL-10 dans la fonction régulatrice. Shen et collaborateurs ont remarqué qu'au niveau du pic d'expansion des Bregs, les LB exprimant l'IL-35 représentent environ 3% des plasmocytes CD138⁺ alors que les cellules exprimant l'IL-10 sont estimées à 12% de cette population et une faible population de plasmocytes exprime à la fois l'IL-35 et l'IL-10. Wang et collaborateurs suggèrent que l'IL-35 dérivée des LB représente une part régulatrice importante indépendante de

l'IL-10. Ils ont de plus présenté des résultats préliminaires chez des individus sains, indiquant que l'IL-35 induit aussi de l'IL-10 dans les LB chez l'Homme.

Ces études sur l'IL-35 dérivée des LB sont comparables aux données existantes sur les LT pour lesquels cette cytokine est à la fois produite par les Tregs et inductrice de Tregs (Collison et al. 2007, Collison et al. 2010). Sachant que les Bregs IL-35⁺ peuvent induire des Tregs, il pourrait y avoir une boucle de rétrocontrôle entre les Tregs et les Bregs qui serait dépendante de l'IL-35, consentant à potentialiser la réponse immunosuppressive.

Après plus de 10 années de focalisation sur l'IL-10 comme inducteur d'une immunosuppression médiée par les LB, l'identification de cette nouvelle sous population Breg IL-35⁺ suscite plus de questions encore qu'elle ne permet d'apporter de réponses à cet univers de plus en plus complexe du Breg. Notamment, la question de son appartenance ou non à la même sous population Breg IL-10⁺ précédemment décrite.

1.2.5 Les B10 (Br1) chez l'Homme

Chez l'Homme 0,6 % des LB du sang périphérique aurait une fonction de Br1 (B10) mais 5 % aurait la capacité de se transformer en Br1 (proB10), en particulier les CD24^{fort} CD27⁺ (Iwata et al. 2011). Le pourcentage de Br1 peut augmenter à 15 % pour les LB CD19^{faible} CD5⁺ mais ces cellules ont alors une tendance plus marquée à l'apoptose (17% versus 4 % pour les autres lymphocytes B) (Lee et al. 2011).

Une autre étude a montré que les B10 ne relèvent d'aucune des sous-populations de LB définies plus haut mais seraient plutôt dans le compartiment CD27⁺ et CD38^{fort} (Bouaziz et al. 2010). L'expression du CD27 est un marqueur qui caractérise les LB mémoires bien que certains LB mémoires puissent être CD27⁻ (Klein et al. 1998, Agematsu et al. 2000, Sanz et al. 2008). Les proportions des sous-populations de LB CD27⁺ peuvent également être augmentées au cours des

maladies auto-immunes et ont été proposées comme marqueur de l'activité de ces maladies (Klein et al. 1998, Agematsu et al. 2000, Sanz et al. 2008).

Iwata et son équipe identifient également sur les B10 humains la présence des molécules CD48 et CD148 (Iwata et al. 2011). CD48 est un marqueur d'activation du LB (Yokoyama et al. 1991) et CD148 est considéré comme un marqueur des LB mémoires humains (Tangye et al. 1998). La conclusion de Iwata est que le phénotype CD24^{fort} CD148⁺ des B10 et des précurseurs pro-B10 pourrait indiquer leur sélection dans le compartiment de LB mémoires durant le développement ou bien pourrait représenter une sous-population LB distincte qui partage des marqueurs de surface communs avec les LB mémoires. Sachant que la capacité de prolifération des B10 humains dans le sang en réponse à une stimulation par un mitogène est plus forte que celle des autres LB, les auteurs y voient un argument supplémentaire en faveur d'un phénotype mémoire du Breg chez l'Homme (Iwata et al. 2011).

Comme observés dans les B10 de la souris (Yanaba et al. 2009), les LB transitionnels humains sont rares (2 à 3% des LB) dans le sang d'un adulte. Ils sont caractérisés par le phénotype CD10⁺ CD24^{fort} CD38^{fort} et sont également CD27⁻ (Klein et al. 1998, Agematsu et al. 2000). Puisque l'expression du CD10 est un marqueur bien admis pour déterminer les cellules qui appartiennent au compartiment des LB transitionnels (Wardemann et al. 2003), sa présence suggère que ces cellules n'ont pas nouvellement migré de la moelle osseuse. En résumé, les B10 humains partagent des caractéristiques phénotypiques avec d'autres sous-populations de LB mais actuellement il n'existe pas de marqueur phénotypique connu exclusif des B10.

Notre équipe a montré que tout LB humains stimulés de façon adéquate sont capables de produire de l'IL-10 et qu'après activation ces LB ont un phénotype de cellules activées IgD⁺ CD38^{fort} CD24^{fort} CD5^{fort} (JLemoine et al. 2011). Snir et collaborateurs rapportent eux que seuls

les LB exprimant fortement le CD25 (B CD25^{fort}) pourraient être des Bregs synthétisant de grandes quantités de TGF- β (Snir et al. 2011).

L'expression du CD5 par les LB humains correspond à un état d'activation, mais ne permet pas de définir une population particulière dans l'ontogénie B, à la différence du CD5 murin qui définit une population de LB non conventionnels dits B1 (Youinou et al. 1999). Cette observation est en faveur de l'acquisition du phénotype et de la fonction Breg par n'importe quel LB plutôt qu'en faveur du caractère inné. Allant dans ce sens une récente étude rapporte que les Bregs sont enrichis dans les B CD24^{fort} CD27⁺ et dans une sous-population de plasmablastes CD24⁺CD27^{fort} CD38^{fort}. La différenciation *in vitro* des LB humains en plasmablastes et plasmocytes augmente le nombre de LB producteurs d'IL-10. Les patients présentant une maladie du greffon contre l'hôte GVHD chronique après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques ont une baisse du nombre de Bregs et de plasmablastes producteurs d'IL-10 proportionnelle à la sévérité de la GVHD (de Masson et al. 2015).

Cependant, tout n'est pas clair. Chez les patients greffés tolérants sans traitement immunosuppresseur, il a été rapporté une expansion de LB non effecteurs dans le sang périphérique (Newell et al. 2010), (Silva et al. 2012). De surcroît, dans l'une de ces études, les patients présentent une expansion de la proportion de B naïfs / B transitionnels qui partagent plusieurs similarités phénotypiques avec les Bregs identifiés par l'équipe de Mauri et Blair (Newell et al. 2010). A l'inverse, une autre étude suggère que ces patients présentent une augmentation du pourcentage de LB associée à un phénotype inhibiteur rappelant les B10 murin (Pallier et al. 2010).

La grossesse ou gestation est un autre état de tolérance à l'allo-antigène favorisant l'expansion d'une population Breg CD19⁺ CD24^{fort} CD27⁺ impliquée dans la tolérance au fœtus.

Les LB CD19⁺ des femmes enceintes produisent de grandes quantités d'IL-10 et suppriment la production de TNF- α lorsqu'ils sont mis en co-culture avec des T effecteurs (Rolle et al. 2013). Les apiculteurs qui présentent une tolérance à long terme au venin d'abeille allergène ont quant à eux des LB producteurs d'IgG₄ qui sont CD25^{fort} et CD71^{fort} et seraient CD73⁻ (van de Veen et al. 2013). Nous verrons que ces phénotypes B CD71⁺ et CD73⁻ sont associés au Breg.

1.2.6 Les LB régulateurs granzyme B⁺

Récemment, une étude a montré que l'IL-21 induit des Bregs exprimant le granzyme B résident au sein du microenvironnement de différents types de tumeurs notamment mammaire, ovarienne, cervicale, colorectale et dans le carcinome de la prostate (Lindner et al. 2013). L'IL-21 induisant le granzyme B serait plus importante dans les B CD5⁺ que dans les B CD5⁻ en réponse aux signaux TLR et BCR. Ces Bregs granzyme B⁺ présentent un phénotype CD19⁺ CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ CD147⁺ CD70⁺ et expriment les molécules de régulation IL-10, CD25, IDO, associées à une expression faible de CD24, CD27 et IgD. Cette population peut infiltrer les tumeurs solides où elle est observée à proximité des LT producteurs d'IL-21. Les auteurs suggèrent que cette population de LB pourrait contribuer à la modulation des réponses immunitaires adaptatives par un mécanisme similaire aux Tregs qui permettrait l'échappement de certaines tumeurs à la réponse immunitaire anti-tumorale (Lindner et al. 2013).

Récemment une équipe a identifié une autre population Breg exprimant la perforine chez les patients atteints de sclérose en plaque (SEP). Cette population Breg, enrichie dans le liquide céphalo-rachidien des patients, possède un profil mémoire CD19⁺CD25⁺, CD19⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ et CD19⁺ FoxP3⁺ (de Andres et al. 2014). Cette sous population Breg CD25^{fort} FOXP3⁺ semble exercer un effet suppresseur sur la prolifération T CD4⁺ via en partie la voie perforine/granzyme.

1.2.7 Le phénotype Breg dans le cancer

Selon la revue générale de Zhang en 2015, la tumeur éduque les LB à déployer leurs propriétés régulatrices. Dans un modèle expérimental murin de tumeur EMT-6, Zhang et collaborateurs démontrent que les LB au sein de la rate ainsi qu'au niveau des ganglions lymphatiques drainants les tumeurs, sont intrinsèquement immunosuppresseurs. Cette nouvelle population Breg est qualifiée de tBreg (T pour tumeur). C'est suite à leur migration au site de la tumeur que les LB affichent un phénotype Breg et augmentent l'expression de LAP/TGF- β (membrane-bound TGF- β) ainsi que de CD25, CMHII et des molécules de co-stimulations CD86 et PDL-1 (Zhang et al. 2013), (Zhang et al. 2015). De plus, une sous-population de LB acquiert également la compétence à produire de l'IL-10. Les LB provenant de ces tumeurs suppriment la prolifération des LT *in vitro*, induisent l'expansion de Tregs *in vitro et in vivo*, suppriment la production d'IFN- γ et inhibent l'activité des T CD8⁺ cytolytiques. Ainsi, ces Breg entravent la réponse immunitaire anti-tumorale favorisant la croissance de la tumeur. Olkhanud et collaborateurs décrivent quant à eux, une sous-population de LB dans un modèle murin de tumeur pulmonaire 4T1. Cette sous-population LB ressemble aux LB matures B2 CD19⁺ CD25^{fort} CD69^{fort} (Olkhanud et al. 2011) qui expriment constitutivement le facteur STAT-3 et affichent un phénotype B7-H1, CD81, CD86, CD62L and IgM. Ces tBreg facilitent l'établissement de métastases pulmonaires en partie grâce à la conversion des LT CD4⁺ en Treg par un mécanisme dépendant du TGF- β (Zhou et al. 2010). Une autre étude dans le même modèle murin 4T1 suggère que les tumeurs produisent des métabolites 5-lipoxygénase qui participent au développement du phénotype Breg via le récepteur PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α). Des métabolites tels que les leukotriènes B4 activent PPAR α dans les LB et cette activation serait indispensable au développement de la fonction des tBreg (Wejksza et al. 2013).

Certains auteurs mettent en évidence des Bregs qui expriment constitutivement le facteur STAT-3 chez la souris dans un modèle de mélanome B16 et dans le modèle MB49 (Yang et al. 2013). Pareillement chez l'Homme cette population est également suggérée dans le cancer de mélanome et de prostate (Kortylewski et al. 2007). Le développement de Breg $\text{TNF-}\alpha^+$ durant la carcinogenèse squameuse semble favoriser également l'échappement et donc la croissance tumorale (Schioppa et al. 2011).

1.2.8 Les B régulateurs IL-33⁺

Un article en 2014 met en évidence une population Breg IL-33⁺. L'IL-33 protège les souris de l'inflammation des muqueuses et est associée à l'induction d'une sous-population B dont le phénotype est non conventionnel CD19⁺ CD25⁺ CD1d^{fort} IgM^{fort} CD5⁻ CD23⁻ TIM-1⁻ et qui ne semble appartenir ni aux B1a CD5⁺ ni à la lignée des B2 CD23⁺ (Sattler et al. 2014). Ces Bregs IL-33⁺ partagent certaines caractéristiques phénotypiques avec différentes sous-populations de Bregs précédemment décrites mais diffèrent dans l'expression d'autres marqueurs de surface notamment ceux des cellules productrices d'IL-10, B1a ou B10 (CD5⁺) (Yanaba et al. 2008), des B2 (CD23⁺) (Dalwadi et al. 2003) ou encore des B-TIM-1 (CD5⁺ TIM-1⁺) (Ding et al. 2011). Bien qu'ils soient différents par l'expression du marqueur CD11b, ils sont plus proches de la lignée des B1b, CD1d^{fort} IgM⁺ CD5⁻ CD11b⁺ CD23⁻, une sous-population de LB innée précédemment décrite pour être induite dans un environnement inflammatoire chronique associé avec une forte activité de l'IL-1 (Mizoguchi et al. 2002).

1.2.9 Les B régulateurs CD73⁺ ou les Bregs CD73⁺ ?

Une autre nouvelle population Breg décrite par l'équipe de Rothstein (Ding et al. 2011, Kaku et al. 2014, Yeung et al. 2015) a été mise en évidence chez la souris, identifiée non pas sur la base d'une sécrétion d'IL-10 mais sur la base d'une forte expression de CD73. Le CD73 est une ecto-enzyme capable de générer de l'adénosine à partir de l'AMP. Contrairement aux B-1 et aux B10, CD73 n'est pas exprimé sur les B2 conventionnels. Les auteurs suggèrent que les cellules B-1 CD73^{fort} peuvent être considérés comme une population Breg chez la souris puisqu'elles sont capables de supprimer l'inflammation associée à une colite induite par du Sulfate de Dextran (DSS) *in vivo*. De surcroît, ils suggèrent que cette population B-1 CD73⁺ est une population innée puisqu'aucune stimulation n'est nécessaire à son expression. En revanche, une stimulation par du LPS peut en réduire l'expression. De plus, le nombre absolu de cellules sécrétant l'IL-10 est extrêmement limité à l'état de repos alors que 30 à 50 % des B-1 au repos et des B10, expriment le CD73. La fonction régulatrice passerait donc par la production d'adénosine immunosuppressive générée par le CD73. Cette fonction serait constitutive et subsisterait tant que le substrat est présent (Kaku et al. 2014).

Chez l'Homme, l'expression de CD39 et de CD73 déjà mise en évidence sur les Tregs naturels (nTreg) et sur les Tregs induits (Tr1), a également été constatée à la surface d'une population de LB CD25⁺. Cette population LB, de la même manière que les nTreg et les Tr1, utilise ses enzymes pour l'hydrolyse de l'ATP exogène en AMP et adénosine immunosuppressives (Saze et al. 2013). Les LB CD73⁺ CD39⁺ au repos augmentent la prolifération des TCD4⁺ et TCD8⁺. En revanche, après activation *in vitro*, ils régulent à la baisse l'expression de CD73 et produisent principalement de l'AMP 5' et inhibent la prolifération et la production de cytokines par les LT. Globalement, cette population B CD73⁺CD39⁺ serait capable

de réguler sa propre prolifération et de diminuer les effets potentiellement nocifs des T activés (Saze et al. 2013). La même année, grâce à des techniques d'analyse du génome complet humain, une population Br1 productrice d'IL-10 exprimant de forts niveaux de CD25 et de CD71 avec un faible niveau de CD73 a été identifiée. Le tri de cette population B CD25⁺ CD71⁺ CD73⁻ permet un enrichissement en Br1, producteurs de fortes quantités d'IL-10 capables de supprimer la prolifération des T CD4⁺ spécifiques des allergènes du venin d'abeille, la phospholipase A₂. Cette population induite est celle retrouvée chez les apiculteurs qui présentent une tolérance à long terme au venin d'abeille allergène évoqué précédemment (van de Veen et al. 2013).

1.2.10 Les B régulateurs du tissu adipeux

Des Bregs adipeux identifiés sur un phénotype CD1d^{faible} CD5^{-/faible} CD11b^{faible} CD21/CD35^{faible} CD23^{-/faible} CD25⁺ CD69⁺ CD72^{fort} CD185⁻ CD196⁺ IgM⁺ IgD⁺ ont été décrits. Ces Bregs maintiennent l'homéostasie du tissu adipeux et limitent l'inflammation associée à l'obésité. Ces Bregs seraient innés et sensibles à des stimulations continues inductrices de Bregs dans leur environnement qui pourraient expliquer leur fonction (Nishimura et al. 2013).

1.2.11 Les B régulateurs induits

De manière intéressante, l'équipe de Rafei en 2009 a montré qu'une protéine de fusion GIFT15 obtenue grâce à la combinaison du GM-CSF et d'IL-15 peut induire une population de Breg dans un modèle murin d'EAE (Rafei et al. 2009). Les Bregs identifiés présentent un phénotype intermédiaire entre des B10 CD1d^{fort} CD5⁺, des Bregs T2-MZP et des plasmocytes exprimant le CD138 (Rafei et al. 2009). En 2008, l'équipe de Tretter a mis en évidence une population Breg induite par une stimulation SAC et IL-2 endogène. Ces cellules B sont CD19⁺ CD25^{fort} (Tretter et al. 2008). Récemment Qian et collaborateurs ont rapporté que les cellules

dendritiques stimulées par l'IFN-beta et le CD40L pouvaient favoriser la différenciation des B spléniques en B producteurs d'IL-10, de phénotype CD19^{fort} FcyIIb^{fort} (Qian et al. 2012).

1.2.12 Les B régulateurs plasmablastes

Une seconde approche pour identifier les Bregs revient à déterminer le phénotype des LB qui sont réellement capable de produire de l'IL-10 *in vivo* sans aucune stimulation préalable *ex-vivo*. Étonnamment, cette approche a permis de mettre en évidence un phénotype de plasmablastes capables de réguler l'immunité via des mécanismes indépendants de la simple production d'anticorps (AC), notamment par la sécrétion d'IL-10 et/ou d'IL-35. Ce phénotype de plasmablastes CD19⁺CD138^{fort} serait la source majeure d'IL-10 dérivée des LB *in vivo* (Maseda et al. 2012), (Shen et al. 2014).

Ce rôle unique des cellules plasmocytaires comme fournisseur précoce d'IL-10 fut caractérisé tout d'abord dans un modèle d'infection par une bactérie pathogène, *Salmonella Typhimurium*, un modèle d'infection dans lequel est rapporté un rôle suppressif de l'IL-10 produit par les LB (Neves et al. 2010). De plus, Shen et collaborateurs ont montré que les cellules exprimant l'IL-10 sont positives pour l'ARNm de Prdm1, un facteur impliqué dans la différenciation des LB en plasmocytes. Ils montrent que les cellules plasmocytaires seraient la source majeure d'IL-10 non seulement durant l'infection par *S. enterica Typhimurium*, mais également dans un autre modèle murin d'EAE (Shen et al. 2014).

Ces résultats confirment que les plasmocytes sont beaucoup plus que de simples cellules vouées à remplir la fonction de production d'AC. Elles sont capables notamment de produire des cytokines régulatrices qui peuvent aboutir à une palette d'effets suppresseurs. Dans la littérature il est intéressant de relever que des sous-populations distinctes de plasmocytes peuvent produire d'autres cytokines. Les cellules B1 sont capables de se différencier en plasmocytes

CD19⁺CD138⁺ producteurs de GM-CSF dans un modèle murin de septicémie induite par des techniques de ponction ligature du caecum (Rauch et al. 2012). Des cellules plasmocytaires exprimant aussi bien la synthase inductible NO (iNO) que le TNF sont décrites dans la lamina propria de l'intestin grêle chez la souris (Fritz et al. 2012). Par conséquent, une meilleure caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces sous-populations de plasmocytes est désormais nécessaire pour confirmer l'existence de plasmocytes régulateurs.

En conclusion, de nouvelles sous-populations de Bregs ne cessent de s'ajouter, finalement l'étude des Bregs se heurte aux mêmes difficultés que celles rencontrées pour les Tregs : fonction régulatrice transitoire; absence de phénotype unique, différences selon les espèces. L'étude des sous-types de Bregs selon leur homologie avec les sous-populations de Tregs existantes (Tr1, Th3, Treg Foxp3⁺) est une autre manière d'appréhender la caractérisation phénotypique des Bregs (Br1, Br3, B Foxp3⁺). Cet aspect a fait l'objet d'une revue générale en 2013 dans la revue Joint Bone Spine que vous retrouverez dans la section annexe (Article en annexe).

Les investigations sur les Bregs se multiplient. Il semble que plusieurs sous populations de Breg existent mais ont-elles un précurseur commun ? Nous aborderons plus en détaille dans le chapitre suivant intitulé ontogénèse et développement des Bregs ce nouvel aspect dans l'histoire du Breg.

BREGS	SOURIS	HOMME	MECANISMES	REFERENCES
T2-MZP	CD19 ⁺ CD1d ^{fort} CD21 ^{fort} CD23 ^{fort} CD24 ^{fort} IgD ^{fort} IgM ^{fort}	-	Retrouvés dans la rate, produisent de l'IL-10, induisent des Tregs, inhibent les T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺ .	<i>Blair et col.2009;</i> <i>Carter et col. 2011;</i> <i>Evans et col.2007;</i> <i>Schioppa et col.2011</i>
Bregs (de la zone marginale)	CD19 ⁺ CD1 ^{fort} CD21 ^{fort} CD23 ⁻ CD24 ^{fort}	-	Retrouvés dans la rate, produisent de l'IL-10, induisent des Tregs, inhibent les T CD4 ⁺ et les T CD8 ⁺ .	<i>Bankoti et col., 2012;</i> <i>Gray et col., 2007;</i> <i>Miles et col., 2012</i>
B10	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{fort}	CD19 ⁺ CD24 ^{fort} CD27 ⁺	Retrouvés dans la rate chez la souris et dans le sang périphérique chez l'Homme, produisent de l'IL-10, inhibent les T CD4 ⁺ effecteurs, les monocytes et les cellules dendritiques.	<i>Horikama et col., 2013;</i> <i>Iwata et col., 2011;</i> <i>Matsushita et col., 2010;</i> <i>Yanaba et col., 2008</i>
Plasmocytes	CD138 ⁺ CMH-11 ^{lo} B220 ⁺ et CD138 ^{fort} , IgM ⁺ , TACI ⁺ , CXCR4 ⁺ CD1d ^{fort} , TIM-1 ^{fort}	-	Retrouvés dans la rate, produisent de l'IL-10 et de l'IL-35, inhibent les cellules NK, les neutrophiles et les T CD4 ⁺ effecteurs.	<i>Neves et col., 2010;</i> <i>Shen et col., 2014</i>
Bregs Tim1 ⁺	Tim-1 ⁺ CD19 ⁺	Tim1 ⁺ CD19 ⁺	Retrouvés dans la rate (souris), patients HIV et transplantés rénaux (Homme), produisent de l'IL-10, induisent des Tregs, inhibent les T CD4 ⁺ et notamment la réponse HIV T CD4 ⁺ .	<i>Ding et col. , 2011;</i> <i>Xiao et col. 2012;</i> <i>Liu J et col. 2014;</i> <i>Shi BY et col. 2011</i>
Plasmablastes	CD138 ⁺ CD44 ^{fort}	CD19 ⁺ CD24 ^{fort} CD27 ^{inter} CD38 ^{fort}	Retrouvés dans les ganglions lymphatiques drainants chez la souris et dans le sang périphérique chez l'Homme, produisent de l'IL-10, inhibent les cellules dendritiques et les T CD4 ⁺ .	<i>Matsumoto et col., 2014</i>
Cellules immatures	-	CD19 ⁺ CD24 ^{fort} C D38 ^{fort}	Retrouvées dans le sang périphérique et aux sites d'inflammation, produisent de l'IL-10, induisent des Tregs, inhibent les cellules Th1 et Th17, inhibent la réponse T CD8 spécifique du virus et maintiennent l'homéostasie des iNKT. Elles sont déficientes chez les patients lupiques et les patients atteints d'arthrite rhumatoïde.	<i>Blair et col. 2010;</i> <i>Bosma et col. 2012;</i> <i>Das et col. 2012;</i> <i>Flores-Borja et col. 2013</i>
Br1	-	CD19 ⁺ CD25 ^{fort} CD71 ^{fort} CD73 ^{faible}	Retrouvés dans le sang, impliqués dans la tolérance à l'allergène, inhibe les T CD4 ⁺ spécifiques de l'antigène, produisent de l'IL-10 et des AC spécifiques de l'allergène IgG4. Inhibent la prolifération des T CD4 ⁺ T CD8 ⁺ <i>in vitro</i> .	<i>Van de Veen et col. 2013</i>
Bregs GrB ⁺	-	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺ GrB ⁺	Retrouvés dans les infiltrats tumoraux, inhibent les T CD4 ⁺ , mécanismes de suppression IL-10, IDO et GrB dépendant.	<i>S.Linder et col., 2013</i>

Bregs IL-10 ⁺ adipeux	CD1d ^{faible} CD5 ⁻ /faible CD11b ^{faible} CD21/CD35 ^{faible} CD23 ^{-/faible} CD25 ⁺ CD69 ⁺ CD72 ^{fort} CD185 ⁻ CD196 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺	-	Retrouvés dans les tissus adipeux	<i>S. Nishimura et col., 2013</i>
Tumor-evoked Bregs	CD19 ⁺ B220 ⁺ CD25 ⁺	-	Retrouvés dans les tumeurs solides, induisent des Tregs, favorisent les métastases pulmonaires.	<i>Wejksza et col., 2013</i>
B-1a B killer	CD5 ⁺ FasL ⁺ CD178 ⁺	-	Retrouvés dans la rate, lors d'infections parasitaires, induisent l'apoptose des T CD4 ⁺ , produisent des AC naturels de type IgM.	<i>Lundy SK et col., 2009; Lundy SK et col., 202</i>
Bregs GIFT-15	B220 ⁺ CD21 ⁺ CD22 ⁺ CD23 ⁺ CD24 ⁺ CD1d ⁺ CD138 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺	-	Produisent de l'IL-10, suppriment la production d'IFN-γ et suppriment les symptômes de l'EAE.	<i>Rafei M. et col. 2009</i>
Bregs PDL-1 ^{fort}	CD19 ⁺ PD-L1 ^{fort} TACI ⁺	-	Réduisent les Tfh CD4 ⁺ PD-1 ⁺ CXCR5 ⁺	<i>Adnan R. Khan et col., 2015</i>
Plasmocytes intra- tumoraux	IgA ⁺		Retrouvés dans les tumeurs, préviennent le développement de T cytotoxiques par un mécanisme IL-10 et PD-L1 dépendant.	<i>Shalapour S et col. 2015)</i>
Bregs CD73 ^{fort}	B220 ⁺ CD39 ⁺ CD73 ⁺	CD39 ⁺ CD73 ⁺	Suppriment l'inflammation associée à la colite induite par le DSS <i>in vivo</i> , produisent de l'adénosine, inhibent les TCD4 ⁺ , mécanismes d'action indépendant de l'IL-10.	<i>Saze Z. et col. 2013; Kaku H. et col. 2014</i>
i Bregs (induit)	-	CD19 ⁺ CD25 ^{fort}	Produisent du TGF-β et de l'IDO, induisent l'expansion de Tregs IL-10 ⁺ et TGF-β ⁺ .	<i>Tretter, Venigalla et al. 2008. Nouel A et col. 2015</i>

Tableau 1 : Phénotype et fonction des Bregs chez la souris et chez l'Homme

1.3 Ontogénèse et développement des Bregs de 2010 à 2014

Il fut suggéré que les Bregs T2-MZP pourraient être des précurseurs aux B10 Breg. Toutefois, la relation de ces sous-populations entre elles ou encore avec les Bregs TIM-1⁺ n'a jamais été parfaitement étudiée (Kalampokis et al. 2013). Une image plus détaillée de l'ontogénèse des Bregs et de leur développement à travers la réponse immunitaire ou auto-immune est une information manquante et pourtant indispensable à leur exploitation thérapeutique future. L'ontogénèse des Bregs a récemment fait un bond important et surprenant avec la mise en évidence d'une propriété commune partagée par un ensemble de sous-populations Breg. Ces dernières seraient essentiellement des LB spléniques PAX5⁺ à l'étape du développement avant leur différenciation terminale en plasmocytes (Mauri et al. 2012).

1.3.1 Chez la souris

L'histoire commence en 2012, lorsque Maseda et collaborateurs suggèrent pour la première fois que les LB spléniques B10 PAX5⁺ pourraient rapidement se différencier en plasmablastes après activation *in vitro* et *in vivo* bien qu'ils n'aient pas vérifié la capacité régulatrice des plasmablastes filles (Maseda et al. 2012).

Deux années plus tard, Shen et collaborateurs rapportent que les Bregs exprimant l'IL-10 et l'IL-35 sont retrouvés principalement au sein du pool de plasmocytes CD138⁺ dans l'EAE et l'infection murine à *Salmonella* (Shen et al. 2014). A cette même période, Matsumoto et collaborateurs développent ces aspects et montrent que les plasmablastes endogènes IL-10⁺ dans les ganglions lymphatiques drainant des souris EAE sont importants dans le contrôle de l'inflammation auto-immune. Les auteurs montrent que les souris qui présentent une déficience des gènes *Irf4* et *Prdm1* dans les LB, gènes contrôlant la différenciation des plasmocytes,

développent une maladie plus sévère que les souris contrôles. De plus, ils démontrent que la transcription de *Irf4* est importante pour favoriser la transcription d'IL-10 dans les Bregs puisque IRF4 se fixe sur la région promotrice du gène de l'IL-10 (Matsumoto et al. 2014). Le résultat le plus étonnant dans leur article est la non nécessité des LB spléniques dans le développement de la fonction Breg et l'acquisition de leur fonction dans les ganglions lymphatiques drainants. Il a précédemment été suggéré que le site des Bregs protecteurs pouvait ne pas être nécessairement la rate. Pour exemple, on peut évoquer le modèle de souris *Gnai2*^{-/-} de colite dans lequel les souris sont déficientes en sous unité α i2 de la protéine G. La majorité des Bregs capables de contrôler la colite est retrouvée dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Wei et al. 2005). Matsumoto et collaborateurs mettent en lumière une mécanistique intéressante à ce phénomène en examinant les effets d'une splénectomie ou d'une déficience spécifique du CD62L sur les LB, (un récepteur permettant aux LB d'entrer dans les ganglions lymphatiques), sur l'évolution de l'EAE et sur la génération de plasmablastes régulateurs. Leurs résultats sont pour le moins surprenants et riches d'enseignements. La splénectomie n'affecte pas la sévérité de la maladie ni la génération de plasmablastes CD138⁺ CD44^{fort} dans les ganglions lymphatiques drainants. Cependant, dans le cas des souris n'ayant pas le CD62L sur les LB, les plasmablastes sont indécélables dans ces organes lymphoïdes (OL) et ces souris sont incapables de guérir de l'EAE. De manière similaire, le transfert adoptif de LB *Sell*^{-/-} (Codant pour le CD62L) à des souris déficientes en LB ne permet pas d'inhiber l'EAE par la même voie que le transfert adoptif de LB sauvages (Matsumoto et al. 2014). En résumé, les auteurs démontrent qu'en absence d'expression du CD62L, les LB ne passent pas au sein des ganglions lymphatiques et par conséquent les plasmablastes régulateurs ne sont pas générés.

L'exclusion de la rate comme site d'activité du Breg est surprenant puisqu'il est un contraste marquant pour la majorité des travaux rapportés à ce jour. En particulier, le transfert de B10 Breg spléniques a été rapporté permettant d'abroger l'EAE (Kalampokis et al. 2013). L'explication soulevée par les auteurs est que l'effet protecteur du transfert des B10 spléniques pourrait être le résultat d'une régulation des B10 au sein des ganglions lymphatiques drainants et dans un deuxième temps leurs différenciations en plasmablastes.

Pour analyser cette hypothèse, il pourrait être intéressant d'évaluer si des B10 déficients pour les gènes nécessaires au développement des plasmocytes *Irf4* ou *Prdm1*, seraient encore capables d'inhiber le développement de l'EAE et si le transfert de ces B10 pourrait être détecté dans les ganglions lymphatiques drainants. Des questionnements auxquels des réponses ne tarderont probablement pas à venir. Il est maintenant bien admis que les B10 ont une activité régulatrice à une étape qui précède leur développement en cellules productrices d'AC, cependant étant donné les résultats de Matsumoto et collaborateur, il est fort possible qu'ils parachèvent un potentiel régulateur total seulement après leurs différenciations en plasmablastes. L'observation de Maseda et collaborateurs en 2012 vient renforcer cette hypothèse. Ils ont démontré d'une part que les LB $CD5^+ CD1d^{fort}$ (B10) se différenciaient considérablement en plasmablastes en culture et que d'autre part leur transfert adoptif de souris KO en *IL-21Rec*, *CD40* et *CMHII* qui sont indispensables à la différenciation des plasmocytes dans des souris *CD19^{-/-}*, ne permettait pas de réduire le développement de l'EAE (Yoshizaki et al. 2012). En définitif, on peut entrevoir à partir des travaux de Maseda et Matsumoto, une première représentation mécanistique de l'efficacité clinique d'une thérapie cellulaire de B10 dans l'EAE décrite il y a de cela 19 ans par l'équipe de Janeway et affinée par Fillatreau en 2002 (Wolf et al. 1996), (Fillatreau et al. 2002).

1.3.2 Chez l'Homme

Finalement les questions émergentes sur le développement des Bregs B10 murins sont récentes et en sont encore à leur éclosion. Chez l'Homme, il y a de plus en plus d'intérêt porté aux plasmablastes régulateurs bien qu'un lien direct entre le Breg et le plasmablaste producteur d'IL-10 n'a pas encore été défini et reste difficile à établir. Néanmoins, Matsumoto et collaborateurs rapportent des résultats sur les LB humains qui suggèrent ce lien (Matsumoto et al. 2014). Les auteurs montrent qu'une combinaison de 4 stimulations CpG, IL-2, IL-6 et IFN- γ utilisées conjointement induit un développement des LB immatures naïfs en cellules de type plasmablastes CD27^{fort}CD38⁺ exprimant de l'IL-10. Ils montrent qu'il y a plus d'IL-10 produit par le développement des LB immatures naïfs que par les plasmablastes provenant des LB mémoires ou de LB matures stimulés. Malheureusement, la fonction suppressive de ces plasmablastes « induits » n'a pas été évaluée dans cette étude (Matsumoto et al. 2014).

Etant donné que les Bregs humains dans la littérature sont souvent activés par différents stimuli pour induire une fonction suppressive (stimulation CD40, TLR, BCR), des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer par exemple si les Bregs à phénotype immature CD38^{fort} CD24^{fort} sont en fait des précurseurs pour des cellules régulatrices de type plasmablastes. Chez les individus sains, les LB CD24^{fort} CD38^{fort} possèdent une capacité à supprimer la production de cytokines inflammatoires des LT de manière IL-10 dépendante (Blair et al. 2010, Lemoine et al. 2011). Des auteurs comme Duddy et Weber ont également observé une production d'IL-10 plus importante dans les LB naïfs en comparaison aux LB mémoires (Duddy et al. 2007), (Weber et al. 2010). Il faut préciser que dans ces deux études, les sous-populations LB sont stimulées 5 à 7 jours, ce qui interroge de savoir si ce qui a été évalué n'était finalement pas la production par des plasmablastes régulateurs. Au regard des nouvelles données de l'étude de

Matsumoto et collaborateurs, la production d'IL-10 par les plasmablastes différenciés à partir de LB naïfs serait plus importante que celle induite par des LB mémoires stimulés.

Finalement, les signaux qui vont permettre une fonction suppressive des LB sont comparables à ceux responsables du contrôle de l'immunité humorale. Ce qui peut sous-entendre que le programme moléculaire LB de la différenciation plasmocytaire est étroitement lié à celui d'une acquisition d'une fonction suppressive. De surcroît, l'absence d'une stimulation donnée est suffisante pour réduire fortement les effets régulateurs des LB et le cours de la maladie auto-immune. En revanche, les conséquences restent modérées en ce qui concerne l'immunité humorale. C'est comme si les LB ont besoin continuellement de signaux stimulateurs pour maintenir l'activité suppressive alors que l'immunité humorale peut se maintenir indépendamment d'une re-stimulation grâce à la persistance de plasmocytes à longue durée de vie, ces observations supposent-elles que des plasmocytes régulateurs mémoires n'existent pas ? L'hypothèse est séduisante et reste cependant à être vérifiée.

En conclusion, Shen et collaborateurs se sont focalisés sur les plasmocytes spléniques CD138⁺ alors que Matsumoto et ses collaborateurs ont étudié les plasmablastes CD138⁺CD44^{fort} des ganglions lymphatiques. On peut alors imaginer la dichotomie suivante : les plasmocytes régulateurs IL-35⁺ agiraient au niveau central tandis que les plasmocytes régulateurs IL-10⁺ se retrouvent uniquement dans les ganglions lymphatiques (Shen et al. 2014), (Matsumoto et al. 2014). Les travaux de Masada puis de Matsumoto et Shen apportent des données surprenantes qui bouleversent dès lors les consensus sur l'origine, l'évolution ou le destin du Breg. Les cartes sont à nouveau redistribuées sur la fonction du Breg et du plasmablaste régulateur dans le processus auto-immun. Une meilleure caractérisation des sous-populations de plasmocytes est nécessaire à

présent pour confirmer l'existence de plasmocytes régulateurs et pour mieux en évaluer leur fonction.

Une autre question majeure demeure sans réponse à ce jour, est-ce que toutes les cellules B pourraient acquérir une fonction B suppressive en réponse à des signaux environnementaux ou est ce que la régulation serait finalement l'affaire d'une sous-population de LB spécifique. Cette dernière hypothèse est peu probablement, c'est ce que nous allons voir dans le prochain chapitre.

1.4 Signaux inducteurs de B régulateurs

Lorsqu'on se penche sur la description découlant de la littérature du caractère inné ou induit des Bregs, ces derniers ne semblent pas spontanément régulateurs. La fonction suppressive n'est induite qu'après un signal spécifique dispensé dans un contexte immunologique opportun. L'activité régulatrice d'un LB est contrôlée, circonscrite et dans la grande majorité des cas notamment chez la souris est spécifique de l'antigène d'intérêt et est également transitoire. Un exemple du caractère induit du Breg est rapporté dans le modèle de colite ulcéraire (souris déficientes en TCR α) par Mizoguchi et collaborateurs. Dans ce modèle, les LB voient l'expression de l'IL-10 augmentée dans les ganglions lymphatiques mésentériques uniquement dans les souris malades mais pas dans les souris TCR α déficientes non malades du même âge (Mizoguchi et al. 2002). Un autre exemple encore plus évocateur est que les LB issus de souris naïves ne secrètent pas constitutivement de l'IL-10. Cette production nécessite une activation préalable par des signaux appropriés (Yanaba et al. 2008).

Globalement, l'induction de la fonction régulatrice dans les LB passe par les trois grandes voies connues d'activation du LB à savoir la stimulation par le CD40, par le BCR et par les TLRs. A cela s'ajoute tout récemment le rôle potentiel de la cytokine IL-21 dans la génération et la fonction des B10 (Yoshizaki et al. 2012, Tedder et al. 2014, Kaltenmeier et al. 2015, Yoshizaki et al. 2015).

1.4.1 Le contact cellulaire et l'interaction CD40/CD40L

L'équipe qui a sans doute le mieux décrit le rôle de la stimulation CD40 dans l'induction de Breg est l'équipe de Claudia Mauri. Leur travail sur le rôle du CD40 dans la régulation commence en 2000 avec le modèle d'arthrite induite par le collagène (Mauri et al. 2008). Les

souris DBA/1-TCR- β développent une arthrite sévère lorsqu'elles sont immunisées par le collagène de type 2 (CII). Les auteurs évaluent l'effet d'un traitement par un anticorps anti-CD40 dans le développement de la pathologie. Ils montrent que les souris traitées par l'anticorps développent une pathologie moins sévère et retardée. Pour mieux caractériser cet effet, les auteurs évaluent la production de cytokines par les splénocytes en réponse au CII en présence ou non de cet anticorps anti-CD40. Les splénocytes traités par l'anti-CD40 présentent une sécrétion plus faible d'IFN- γ mais plus forte d'IL-10. Ils parachèvent l'étude en montrant que les splénocytes issus de souris DBA/1-TCR- β immunisées par le CII et ayant reçu l'anti-CD40 ne transfèrent pas l'arthrite à des souris SCID, contrairement à des splénocytes de souris immunisées seulement par le CII. C'est la première démonstration de l'implication fondamentale du CD40 dans la protection contre l'arthrite (Mauri et al. 2008). Dans un second papier, ils incriminent le LB dans cet effet protecteur par des expériences de déplétion. Les souris recevant les splénocytes dépourvus de cellules dendritiques et traités par l'anti-CD40 sont protégées de l'arthrite induite par le CII. En revanche, les souris recevant des splénocytes dépourvus cette fois-ci de LB et traités par l'anti-CD40 développent une arthrite plus sévère. En 2009, ils réitèrent une nouvelle fois ces expériences en parvenant toujours aux mêmes conclusions, dans un modèle murin de lupus MRL/lpr (Blair et al. 2009).

Toujours sur la même ligne, il est décrit que l'expression ectopique du CD40L (CD154) dans les souris transgéniques est associée à une augmentation du signal CD40 et augmente le nombre de B10 (Higuchi et al. 2002). Poe et collaborateurs montrent que les souris CD22 KO exprimant le CD40L ectopique présentent une augmentation considérable du nombre de LB CD1d^{fort} CD5⁺ et de B10 (Poe et al. 2011). Chez l'Homme, notre équipe et d'autres ont

précédemment montré que la stimulation du CD40 *in vitro* est inductrice de la fonction Breg (Lemoine et al. 2011).

Il a récemment été démontré que les mastocytes affectent le compartiment des Bregs. Bien qu'ils ne soient pas capables d'induire la production d'IL-10 dans les LB, les mastocytes semblent jouer un rôle important dans l'expansion des B10 *in vivo*. En effet, durant la phase de rémission d'une inflammation intestinale induite par le dextran-sulfate-sodium, une augmentation significative des LB CD19⁺ IL-10⁺ est observée dans les souris sauvages mais pas dans des souris déficientes en mastocytes. L'expansion de B10 médiée par les mastocytes est partiellement abrogée en présence d'un AC anti-CD40L ou encore dans les souris déficientes en CD40L restreinte uniquement aux mastocytes (Mion et al. 2014). Il semble une fois de plus que l'axe CD40/40L joue un rôle dans l'expansion des Bregs.

1.4.2 La signalisation du BCR

La spécificité, l'affinité et la signalisation du BCR sont des facteurs d'identification connus du développement des B10 chez la souris. L'importance de la diversité du BCR est démontrée par le fait que les B10 et B10-pro sont réduits d'environ 90% dans les souris transgéniques avec un BCR fixe déterminé (Yanaba et al. 2009). Les souris dans lesquelles tous les LB expriment un unique BCR sans rapport de spécificité antigénique développent une EAE chronique suite à une immunisation avec le peptide MOG, équivalente à celle observée dans les souris déficientes en LB producteurs d'IL-10 (Fillatreau et al. 2002).

Dans l'EAE, la signalisation BCR semble être importante dans la phase précoce du développement *in vivo* du Breg. Les souris déficientes en CD19 dans lesquelles le signal BCR est réduit ont 70% à 80% de réduction de cellules B10 et B10pro (Yanaba et al. 2008). Les souris développent également une EAE sévère associée à une baisse de production d'IL-10 par les LB.

A l'inverse, on retrouve une expansion des B10 dans des souris transgéniques avec un CD19 humain où la surexpression du CD19 augmente le signal BCR.

Un constituant important de la fonction régulatrice des LB semble être la spécificité antigénique. Les LB réactifs à MOG isolés des souris EAE en rémission secrètent de l'IL-10 suite à une re-stimulation via leur BCR en présence de co-sigaux appropriés (Fillatreau et al. 2002). L'absence du CD22 qui affaiblit normalement le signal BCR et CD19 induit également une augmentation du nombre de B10 (Higuchi et al. 2002).

L'induction de Breg IL-10⁺ par la liaison aux cellules T TIM-1 met davantage en évidence l'importance du signal BCR dans le développement des B10. Chez la souris, la stimulation des Bregs par des AC monoclonaux anti-TIM-1 induit une libération d'IL-10 et prévient le rejet d'allogreffes pancréatiques (Ding et al. 2011). En effet, le signal BCR et la liaison TIM-1 sont étroitement associés. D'une part, l'engagement du BCR induit TIM-1 dans les LB (Ding et al. 2011); (Wong et al. 2010) et d'autre part, la liaison TIM-1 augmente le signal BCR, puisque la production d'AC *in vitro* et *in vivo* est augmentée (Ma et al. 2011).

L'importance des signaux associés au BCR est encore mise en évidence par le fait que les molécules d'interactions stromales STIM1 et STIM2 responsables de l'activation du flux calcique dans le cytosol du réticulum endoplasmique des LB sont nécessaires à la production d'IL-10 dans les LB (Matsumoto et al. 2011). En effet, les LB qui ne possèdent pas ces molécules perdent la propriété de production d'IL-10 après stimulation PMA et ionomycine durant 5h. Jin et collaborateurs ont mis en évidence l'implication de BLNK, une protéine adaptatrice essentielle des voies de signalisation du BCR, nécessaire au développement optimal des LB, et dans la production d'IL-10 dans les B10. Ainsi, bien que les B10 soient présents dans les souris KO BLNK, la production d'IL-10 par ces cellules est sévèrement réduite aussi bien *in vivo* qu'*in*

vitro. Ces souris développent également une EAE plus sévère qui peut être rétablie par le transfert adoptif de LB spléniques provenant de souris sauvages. BLNK est également nécessaire au signal de transduction et d'activation de la phosphorylation de STAT-3 induit par le LPS dans les LB CD1d^{fort} CD5⁺. De surcroît, l'IL-10 produit suite à cette stimulation agit de manière autocrine favorisant l'expansion des LB producteurs d'IL-10 (Jin et al. 2013).

Sun en 2012 a induit une population Breg suppressive en incubant des LB naïfs avec un antigène approprié conjugué à la sous-unité B de la toxine du choléra. Ce qui a permis à une majorité de LB, quelle que soit leur spécificité BCR, d'apprêter et de présenter l'antigène et d'induire l'expression de LAP/TGF- β . Après transfert adoptif, ces cellules produisent de l'IL-10. La co-culture *in vitro* de cette population Breg induite avec des LT naïfs et en présence de l'antigène d'intérêt, génère des Tregs Foxp3⁺. De surcroît, *in vivo* ces Bregs après transfert adoptif induisent des Tregs Foxp3⁺ et concourent à une suppression et une déplétion des LT effecteurs. Encore plus intéressant, dans un modèle d'EAE le transfert adoptif de cette population Breg induite préalablement *ex vivo* avec l'antigène de myéline MOG conjugué à la sous unité B de la toxine du choléra permet d'augmenter le nombre de Tregs dans les souris receveuses et supprime la prolifération des T spécifiques de MOG ainsi que la production d'IL-17 et d'IFN- γ et enfin prévient le développement de l'EAE. C'est la première étude qui suggère aussi clairement que n'importe quel LB stimulé *in vitro* avec un antigène d'intérêt couplé à la sous unité B de la toxine choléra peut être utilisé dans les thérapies cellulaires pour induire une suppression spécifique dans une maladie auto-immune (Sun et al. 2012).

1.4.3 Le récepteur à l'IL-21

Le rôle unique de l'IL-21R dans le développement des B10-Breg est apportée pour la première fois par l'étude de Yoshizaki en 2012 (Yoshizaki et al. 2012). Cette équipe montre que

les LB déficients en IL21-R sont incapables de transférer une protection contre l'EAE à des souris receveuses. De plus, la stimulation *ex-vivo* des LB CD19⁺ spléniques avec de l'IL21 induit une augmentation de 3 fois de la fréquence des B10 et 5 fois plus de sécrétion d'IL-10 en comparaison à une stimulation par du milieu uniquement. De manière intéressante, l'IL-21 induit une triple augmentation de LB IL-10⁺ au sein de la sous population B CD1d^{fort} CD5⁺ splénique mais n'induit pas de LB IL-10⁺ au sein de la sous-population LB CD1d^{faible} CD5⁻. Il est surprenant de constater que les B10 et non B10 expriment à des niveaux équivalents l'IL-21-R et qu'*ex-vivo* le nombre de B10, B10 pro et de B CD1d^{hi} CD5⁺ est similaire dans les souris KO en IL21-R, CMH II et en CD40. Néanmoins, l'IL-21R, le CMH II et le CD40 semblent être nécessaire aux fonctions effectrices des B10, du moins dans l'EAE (Yoshizaki et al. 2012). Bien que convaincante, il reste à confirmer cette observation dans d'autres modèles murins et chez l'Homme. Une autre équipe a mis en évidence, au sein de l'environnement tumoral chez l'Homme, la co-localisation de LB exprimant le granzyme B avec des Tregs sécrétant d'IL-21. Une analyse plus approfondie sur des LB du sang périphérique de volontaires sains a permis de montrer que l'IL-21 en culture, combinée à une stimulation du BCR et du TLR7 ou du TLR9, induit la sécrétion de granzyme B par le LB, le granzyme pouvant ensuite inhiber la prolifération des LT CD4⁺ (Lindner et al. 2013).

1.4.4 Les voies des TLRs

Les TLRs représentent une autre classe fondamentale de récepteurs (Jiang et al. 2009) aussi bien dans la régulation que dans l'activation du LB ainsi que pour leur différenciation en cellules sécrétrices d'AC. Lampropoulou a notamment mis en évidence une capacité des LB de souris à exprimer de l'IL-10 par une activation *in vitro* de voies de signalisation induites par une stimulation TLR. Cette expression d'IL-10 n'étant pas induite par des signaux émis par une

stimulation BCR et/ou CD40 (Lampropoulou et al. 2008). Les B10 peuvent être conditionnés à produire de l'IL-10 par les ligands de TLR-4 ou TLR-9. Chez la souris, il a été montré que les B10 pro acquièrent la capacité à fonctionner comme des B10 après une maturation *in vitro* par du LPS, en absence ou non d'agoniste anti-CD40 (DiLillo et al. 2010). La signalisation TLR-4 et TLR-9 passe par MyD88 pour une maturation optimale et une induction d'IL-10 dans les B10 pro et les B10 suite une stimulation LPS ou CpG, respectivement (Yanaba et al. 2009). Néanmoins, MyD88 n'est pas indispensable au développement des B10 puisqu'ils se développent normalement dans les souris Myd88 KO (Yanaba et al. 2009). Le nombre de LB ayant la capacité à produire de l'IL-10 dans les souris KO pour MyD88 suite à une stimulation CD40 ou PMA et inomycine est équivalente à celle des souris sauvages et les B10 et B10 pro, sont présents à une fréquence normale dans ces souris. De ce fait, alors que la signalisation TLR n'est pas nécessaire au développement des B10, l'expression de MyD88 est nécessaire au LPS pour induire une expression optimale d'IL-10 dans les LB et sa sécrétion *in vitro*. L'implication des signaux TLRs dans la production de l'IL-10 par les B10 fut démontrée finalement que récemment par l'équipe de Miles (Miles et al. 2012). Miles en 2007 montrera tout d'abord que les cellules apoptotiques apportent des signaux endogènes qui déclenchent l'induction de Bregs et la production d'IL-10, conduisant à l'amélioration de l'arthrite induite par le collagène chez les souris (Gray et al. 2007). Les cellules apoptotiques sont capables d'induire dans les B spléniques la production d'IL-10 augmentant à leur tour la production d'IL-10 des LT spécifiques de l'antigène. Miles montre par ailleurs que les LB CD27⁺ répondent par la sécrétion d'IL-10 mais pas les cellules traitées par la DNAase. Plus tard, en 2012 cette même équipe ira plus loin dans l'étude du lien entre cellules apoptotiques et induction de Bregs. Gardant leur modèle de souris d'arthrite induite par le collagène de Type 2, les auteurs montrent cette fois ci que la production d'IL-10 dans les LB est

stimulée par le contact avec les cellules apoptotiques. La reconnaissance par le BCR de complexes d'ADN présents à la surface des cellules apoptotiques favoriserait aussi l'engagement du TLR9 des LB, ce qui stimule leur production d'IL-10. Ils feront également la démonstration de l'implication du signal TLR9 dans la protection apportée par l'injection de cellules apoptotiques dans l'EAE en observant une absence d'effets protecteurs des corps apoptotiques dans l'EAE chez les souris TLR9 KO. C'est finalement l'équipe qui a le mieux décrit ce mécanisme de protection apporté par les corps apoptotiques, confirmant les observations de Bouaziz en 2010 indiquant que la stimulation du TLR9 est un puissant inducteur d'IL-10 dans les LB chez l'Homme (Bouaziz et al. 2010).

Les composants de la mort cellulaire peuvent donc représenter un des éléments physiologiques déclencheur du développement des Bregs en offrant une combinaison de signaux BCR et TLRs. D'autres signaux libérés de cellules apoptotiques qui ne stimulent ni les TLRs ni le BCR peuvent aussi être impliqués, tels que les alarmines dont l'identité reste à être établie.

Les B10-pro et les B10 ont récemment été identifiés chez l'Homme par l'équipe de Tedder (Iwata et al. 2011) et leurs réponses au LPS, CpG ou liaison du CD40 semblent suivre le même schéma de développement que les B10 de la souris. Une différence notable entre les B10 de souris et de l'Homme est l'absence de réponse des B10 pro de la souris au CpG, contrairement à leurs homologues chez l'Homme. Les B10 pro, humains, peuvent être stimulés à se développer *ex vivo* en B10 avec une stimulation LPS, CpG ou par la liaison du CD40. De manière intéressante, la liaison BCR semble augmenter la réponse LB-IL10⁺ en réponse à une stimulation CpG dans une étude (Bouaziz et al. 2010), bien que d'autres équipes ont montré que les signaux générés par le BCR inhibent la capacité du LPS, du CpG et la liaison CD40 à induire la production d'IL-10 cytoplasmique. Nonobstant, une production d'IL-10 après stimulation BCR et CD40 par les LB

est possible dans le cas d'une activation préalable du LB via le TLR (Neves et al. 2010). Il est intéressant de noter que dans une étude publiée en 2004, l'équipe de Amit Bar-Or a montré que la chronologie des signaux du BCR et du CD40 est importante dans l'induction de la production de cytokines par les LB (Duddy et al. 2004). Ainsi, les LB stimulés par le CD40 ont une tendance à sécréter de l'IL-10 mais peu de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, les LB stimulés par le BCR puis par le CD40 sécrètent beaucoup de cytokines pro-inflammatoires mais peu d'IL-10. De récents travaux de Lechouane et collaborateurs apportent une explication à l'importance de cette chronologie de signaux TLR-BCR en mettant en évidence l'existence d'un niveau basal de signalisation du BCR dans les LB au repos qui serait déterminant pour leur réceptivité à des agonistes TLRs et CD40 dans un second temps (Lechouane et al. 2013).

1.4.5 Autres signaux inducteurs de Bregs

D'autres signaux sont capables de générer des Bregs. De multiples médiateurs peuvent coopérer avec les TLRs afin d'induire des Bregs. Par exemple, une nouvelle population Breg productrice d'IL-10 constitutivement présente dans les tissus adipeux et qui protège de l'insulino-résistance vient d'être décrite. Les auteurs de cette découverte suggèrent que des acides gras libres (palmitates) sécrétés par les adipocytes issus de la lipolyse des réserves de triglycérides peuvent activer le signal TLR4 favorisant spécifiquement la survie des LB adipeux en induisant la production d'IL-10 et ainsi contribuent à une fonction unique des Bregs du tissu adipeux. Ils montrent que l'IL-10 a un effet autocrine qui augmente le niveau d'IL-10 intracellulaire et sa sécrétion. Ils retrouvent également une surexpression de CXCL12 (SDF-1) dans les tissus adipeux par rapport à d'autres tissus comme les tissus spléniques. Cette chémokine, comme les acides gras libres saturés, stimule la production d'IL-10 dans les LB « adipeux » par activation des voies PI3K / AKt et NF-kB (Nishimura et al. 2013). Cette population cellulaire bien que

décrite par ses auteurs comme une population Breg constitutive innée ne l'est finalement pas vraiment puisqu'elle se trouve dans un environnement particulier dans lequel elle reçoit de façon continue des stimuli favorisant le maintien de leur fonction suppressive.

Autre exemple, de fortes doses d'estrogènes régulent à la hausse la fonction de certains Bregs, au moins chez la souris et dans des modèles d'EAE (Bodhankar et al. 2013).

De plus, il semblerait qu'un des modes d'action du tocilizumab (Assier et al. 2010) est de stimuler l'effet des Bregs. Il est noté une expression accrue de TGF-bêta et de la molécule CD25 à la surface des LB des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) traités au tocilizumab (Snir et al. 2011).

1.4.6 Les UV et vitamine D

Parmi les facteurs environnementaux évoqués dans la génération de Breg, il y a les UV. En effet, ces derniers sont connus pour inhiber les réponses immunitaires vis à vis de différents antigènes bactériens, viraux ou encore fongiques (Howie et al. 1986, Denkins et al. 1989, Jeevan et al. 1989). L'étonnante découverte de Ullrich et collaborateurs est que les LB producteurs d'IL-10 des ganglions lymphatiques, participent à cette tolérance induite par les UV. L'équipe montre d'une part que le transfert adoptif de cellules-FITC⁺ provenant des ganglions lymphatiques de souris sensibles irradiées par les UV à des souris receveuses normales, permet le transfert de cette tolérance. D'autre part, ils incriminent directement les LB dans ce transfert de tolérance puisqu'ils font l'observation que les cellules responsables sont des LB FITC⁺ CD19⁺ B220⁺ productrices d'IL-10 (Matsumura et al. 2006). De manière intéressante, l'induction de cette tolérance par les LB implique la sécrétion et la fixation de PAF (pour facteurs activateurs des plaquettes et de la sérotonine). De plus les LB expriment le récepteur à PAF et à la sérotonine, il

est possible que ces mêmes molécules induisent la production d'IL-10 par les LB (Matsumura et al. 2006).

Plusieurs modèles murin d'EAE ont révélé que la vitamine D (cad : $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) est capable d'inhiber l'induction de la maladie. Dans l'un de ces modèles, utilisant des LT transgéniques avec un TCR spécifique de la protéine MBP, la vitamine D n'est efficace que si des lymphocytes conventionnels sont présents dans les souris déficientes Rag1^- . Un second modèle révélait qu'une voie IL-10 fonctionnelle est nécessaire à la vitamine D pour inhiber l'EAE. Les auteurs démontrent cela aussi bien dans les souris KO en IL-10 que dans les souris KO en IL-10 R_β . Bien que l'identité des cellules productrices d'IL-10 dépendante de la vitamine D ne soit pas mentionnée, il est tentant de supposer que cela pourrait être les Bregs (Nashold et al. 2001, Spach et al. 2006). Chez l'Homme, grâce à modèle *in vitro* il a été montré que la vitamine D favorise la production d'IL-10 par les LB. Quand des LB de donneurs sains sont stimulés par un cross-link BCR/ anti-CD40/ IL-4, la production d'IL-10 dans le surnageant, la fréquence des B producteurs d'IL-10 et la quantité d'IL-10 produite par ces cellules sont augmentées lorsque la vitamine D est ajoutée dans la culture (Heine et al. 2008). Allant dans le même sens, la présence d'un agoniste à la vitamine D favorise également une production plus faible d'IL-10. Cependant, *in vivo*, aucune corrélation entre le niveau sérique de vitamine D n'a pu être mise en évidence avec la fréquence des Bregs chez les patients SEP.

1.4.7 Les cytokines inductrices de Bregs

1.4.7.1 IL-15 et GM-CSF

De manière intéressante, les cytokines impliquées dans la pathogenèse des maladies auto-immunes pourraient aussi contribuer aux fonctions régulatrices des LB. Par exemple dans une récente étude, il fut montré que la fusokine GIFT15 qui est une combinaison de GM-CSF et d'IL-

15 induit des Bregs producteurs d'IL-10. Le transfert adoptif de Breg générés *in vitro* avec la fusokine GIFT-15 conduit à une suppression de la production d'IFN- γ par des T effecteurs et par conséquent supprime les symptômes de l'EAE (Rafei et al. 2009).

1.4.7.2 BAFF

BAFF qui est un membre de la famille des TNF agit comme un régulateur clé de la maturation et la survie des LB. Récemment, une équipe a montré qu'une faible concentration de BAFF peut induire la production d'IL-10 dans les LB à phénotype CD1d^{fort} CD5⁺ qui est similaire au B10 (Yang et al. 2010). La stimulation par la cytokine BAFF peut sélectivement induire l'expansion de LB producteurs d'IL-10 après 3 jours de culture. De plus, un traitement avec la cytokine BAFF *in vivo* augmente le nombre de B producteurs d'IL-10 de la zone marginale (Yang et al. 2010). Ces résultats révèlent une fonction jusqu'ici méconnue de BAFF, qui est celle d'induire des LB à fonction régulatrice.

1.4.7.3 IL-2

Une autre équipe a mis en évidence une population Breg induite par une stimulation avec de l'IL-2 endogène et du SAC (Tretter et al. 2008).

1.4.7.4 IL-35

Deux études complémentaires ont récemment identifié des LB IL-35⁺ aussi bien comme inducteurs que médiateurs de la fonction Breg (Shen et al. 2014). Wang et collaborateurs ont montré que cette cytokine induit des Bregs qui secrètent à la fois de l'IL-10 et de l'IL-35 (Breg IL-35⁺). Ils montrent d'une part un effet de l'IL-35 dans la régulation de l'inflammation dans un modèle murin d'auto-immunité oculaire (EAU) et d'autre part que l'absence de production de l'IL-35 par les LB augmente la survie chez ces souris infectées par *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Wang et al. 2014). Après 72h de stimulation avec du LPS, 8% des LB spléniques

des souris deviennent Breg IL-35⁺ et environ 7% de ces cellules expriment l'IL-10 intracellulaire. Après 72h de stimulation par l'IL-35 environ 35% des LB deviennent des Bregs IL-35⁺ avec environ 18% de ces cellules qui vont produire de l'IL-10. Une étude complémentaire mais indépendante récemment publiée dans *Nature* a testé l'importance de l'IL-35 *in vivo*. Shen et collaborateurs montrent qu'en comparaison aux LB de souris contrôles, les LB déficients en IL-35 expriment plus fortement les molécules de co-stimulations CD80, CD86 et CMHII et fonctionnent comme de plus puissantes cellules présentatrices d'antigènes conduisant à une réponse inflammatoire T plus forte (Shen et al. 2014). Ces altérations génétiques de l'IL-35 dans les LB contribuent à une aggravation substantielle de l'EAE mais à une protection plus efficace contre la septicémie induite par *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, comparativement à celle observée dans les souris sauvages.

De manière intéressante, chez l'Homme la stimulation des LB *in vitro* par la cytokine IL-35 humaine durant 3 jours favorise l'expansion des Bregs IL-10⁺ passant de 1,38% à 30%, mais par contre réduit la prolifération des LB en réponse à une stimulation PMA, suggérant que l'IL-35 pourrait éventuellement être utilisée pour induire des Bregs autologues et traiter les maladies auto-immunes et inflammatoires (Wang et al. 2014). Les études sur l'IL-35 chez l'Homme en sont à leur début mais demeure complexe dans la mesure où actuellement il n'y a pas d'AC spécifique de l'IL-35 humain.

Coreale et collaborateurs ont récemment souligné l'importance des LB producteurs d'IL-35 chez des patients atteints de sclérose en plaque (SEP) infectés par des helminthes. Ces derniers développent une maladie moins sévère que les patients SEP non infectés. Cette étude montre également une production d'IL-10 et d'IL-35 significativement plus importante chez les patients SEP infectés par des helminthes par rapport aux patients non infectés ou encore chez des individus

sains. *In vitro*, la stimulation des LB avec de l'IL-35 favorise la conversion en Breg producteurs d'IL-35 et d'IL-10. La production d'IL-35 augmente après engagement du BCR et bloquer cette production réduit de manière significative la production d'IL-10 par les Bregs. De plus, la co-culture de LT avec des LB issus de patients hébergeant des helminthes inhibe la réponse proliférative d'une lignée LT spécifique de la MBP, la polarisation Th1 et Th17 et elle réduit également la production d'IFN- γ et d'IL-17, tandis que les LB provenant des patients non infectés sont incapables d'inhiber la réponse proliférative ou de réduire la production d'IFN- γ et d'IL-17 dans la culture (Correale et al. 2008), (Correale et al. 2015).

1.4.7.5 IL-1 et IL-6

L'équipe de Rosser en 2014 analyse les signaux inflammatoires qui gouvernent la différenciation des Bregs et la production d'IL-10 dans un contexte inflammatoire microbien. Ils constatent que le microbiote intestinal favorise la différenciation des Bregs dans la rate et dans les ganglions lymphatiques mésentériques. La perturbation du microbiote intestinal par un traitement antibiotique réduit le nombre et la fonction des Bregs. De plus, suite au développement d'une arthrite, l'IL-1 β et l'IL-6 sont produites dans les souris et favorisent directement la différenciation Breg et la production d'IL-10. Les souris KO en IL-6R et IL-1R sur les LB présentent une réduction du nombre de B producteurs d'IL-10 et développent une arthrite plus sévère en comparaison aux animaux contrôles. En résumé, en réponse à des signaux inflammatoires induits par soit la flore bactérienne intestinale soit l'arthrite, les Bregs augmentent en nombre et restreignent l'inflammation excessive (Rosser et al. 2014). On peut imaginer que ce phénomène puisse être extrapolé également à la réponse parasitaire protectrice chez les patients SEP étudiée dans le travail de Correale et ses collaborateurs (Correale et al. 2008).

Chez l'Homme, on peut citer une étude parue en 2012 dans laquelle il est retrouvé une augmentation de la population de LB CD1d^{fort} productrice d'IL-10 dans le sang périphérique d'enfants gabonais infectés par schistosome haematobiumvune (van der Vlugt et al. 2012). En 2014, l'équipe de Hermelijn décèle également un pourcentage élevé des LB exprimant de l'IL-10 intracellulaire et du LAP/TGF-beta1 provenant de donneurs hébergeant le parasite intestinal *Shistosoma Haematobium* en comparaison avec des donneurs non infectés. Les LT produisent moins d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-17 lorsqu'ils sont mis en co-culture avec ces LB. Dans ces conditions, le pourcentage des LT IL-10⁺ et la conversion en LT Foxp3⁺ CD25^{fort} augmente également. De plus, lorsqu'ils induisent une déplétion de la sous population CD1d^{fort} productrice d'IL-10, cela conduit à une diminution des LT IL-10⁺ dans le groupe de donneurs infectés par le parasite, sans que cela affecte les niveaux de Treg Foxp3⁺. En conclusion, cette étude montre que le parasite *Shistosome* peut induire des Bregs fonctionnels contribuant à une hypo-réactivité LT générale et pourrait contribuer à l'instauration d'un environnement tolérogène. Ces observations suscitent de nombreuses questions. Comment les parasites réorientent-ils le système immunitaire, quand on sait que les parasites coexistent avec leurs hôtes humains et animaux depuis des centaines de millions d'années (Capron et al. 2004). Comment une infection par un parasite extracellulaire tel que des helminthes peut induire une population Breg suppressive fonctionnelle? Malgré les preuves croissantes indiquant l'importance des Bregs dans le contrôle de l'inflammation chez l'Homme, beaucoup d'études sont restées au stade de l'observation et un travail plus extensif est nécessaire pour comprendre de quelle manière les Bregs contribuent à ces états d'immunosuppression à long terme. L'étude de Rosser apporte certainement des éléments d'explication à ce lien surprenant. En réponse à des signaux inflammatoires induits par un parasite intestinal ou encore une flore bactérienne intestinale, les Bregs augmentent en nombre et

restreignent l'inflammation excessive favorisant une maladie auto-immune moins sévère chez les patients.

1.4.8 Conclusion

Globalement, les LB peuvent répondre à différents types de stimulations pour devenir des Bregs. Les stimulations varient selon le modèle pathologique étudié et selon le phénotype de LB ayant le potentiel régulateur. Les plus importantes questions non résolues sont liées à la nature des stimuli antigéniques qui induisent le développement des Bregs. Les produits issus de la mort cellulaire, en apportant des stimuli simultanément antigéniques et non antigéniques pourraient représenter un des déclencheurs physiologiques du développement des B10. La clairance des produits antigéniques à une étape ultérieure par des anticorps poly-réactifs anti-IgM tels que ceux produits par les B10 pourrait être bénéfique à la résolution du processus inflammatoire. Des stimuli, antigéniques ou non antigéniques, additionnels non identifiés sont probablement impliqués dans le développement des Bregs. L'identification de tels stimuli apportera des connaissances complémentaires précieuses sur le développement des Bregs pour une future manipulation thérapeutique.

D'autre part, les Bregs comme les plasmablastes régulateurs sont généralement identifiés par leur expression et leur production d'IL-10 alors que le gold standard à l'identification des Bregs reste la démonstration de la suppression *in vivo* ou *in vitro*. Dans la partie qui va suivre nous allons voir que les Bregs affichent de nombreux mécanismes d'action et que la littérature récente incite à penser qu'il est peu probable que tous les mécanismes de suppression soient reliés exclusivement à l'effet suppresseur de l'IL-10.

1.5 Le Breg, une cellule polyvalente

Nous allons voir dans cette partie que les mécanismes d'action des Bregs sont aussi variés que les phénotypes qui les caractérisent. La complexité au niveau de l'acquisition des propriétés régulatrices se retrouve également dans les mécanismes mis en jeu pour effectuer la régulation. Les LB peuvent répondre à différents types de stimulation pour devenir Breg. D'un modèle pathologique à l'autre, d'un phénotype régulateur spécifique à l'autre, les Bregs peuvent exercer une immuno-modulation par de multiples processus. Les LB sont capables de sécréter un vaste panel de cytokines (Harris et al. 2000). Notamment, la sécrétion d'IL-10 qui reste la caractéristique majeure du mode d'action des Bregs. Cependant on attribue également à ces derniers la production d'autres facteurs solubles régulateurs de la réponse immune comme le TGF- β et plus récemment l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO). A cela s'ajoute, la coopération cellule-cellule et notamment la collaboration avec d'autres populations régulatrices démontrées *in vitro et in vivo* dans de nombreux modèles murins.

1.5.1 Induction de Tregs

Les Tregs sont les cellules par excellence du contrôle de l'immunité. Plusieurs indices laissent penser à un lien entre Breg et Treg. Par exemple, il est observé une réduction de la fréquence des Tregs Foxp3⁺ dans les souris μ MT déficientes en LB (Sun, Flach et al. 2008, Tadmor, Zhang et al. 2011). De nombreuses études ont démontré que les LB sont nécessaires au maintien des Tregs Foxp3⁺. Ainsi, dans les souris déficientes en LB, la réponse Treg qui par ailleurs favorise le développement des tumeurs est inhibée, aboutissant à une augmentation de la réponse anti-tumorale. De ce fait, les souris μ MT/BALB/C présentent une résistance au

développement de carcinome mammaire (Tadmor, Zhang et al. 2011). La reconstitution de ces souris par des LB permet de restaurer la réponse des Tregs Foxp3⁺.

Dans un modèle de tolérance orale, la reconstitution des souris μ MT avec des LB de souris sauvages restaure leur capacité à devenir tolérante à l'ovalbumine suite à un régime qui comprend l'administration de multiples doses d'OVA-CTB (Sun, Flach et al. 2008, Tadmor, Zhang et al. 2011). La tolérance orale à l'ovalbumine se traduit par une expression de Treg Foxp3⁺ qui faisait défaut une fois de plus chez les souris μ MT. Dans un modèle d'arthrite induite par un antigène, Carter et son équipe ont démontré que le transfert adoptif de Breg T2-MZP provenant de la rate de souris arthritiques en convalescence, a permis de restaurer le pourcentage de Treg chez les souris μ MT receveuses (Carter, Vasconcellos et al. 2011). L'expression de l'IL-10 par les LB endogènes et tout particulièrement par les Bregs est fondamentale pour leurs facultés à maintenir une population Treg *in vivo*. Effectivement, les souris chimériques dotées d'une déficience en IL-10 uniquement restreinte à la population LB sont incapables de guérir d'une arthrite chronique ou d'une forme rémittente d'EAE (Fillatreau, Sweenie et al. 2002, Carter, Rosser et al. 2012). Une fois de plus, l'aggravation de la maladie constatée dans les souris arthritiques B IL-10 KO s'accompagne d'une baisse des Tregs Foxp3⁺ et des Tr1 producteurs d'IL-10 (Carter, Vasconcellos et al. 2011, Carter, Rosser et al. 2012). D'autres études indiquent que l'injection de la cytokine IL-35 recombinantes ou de Breg IL-35⁺ dans des souris après induction d'une uvéite auto-immune expérimentale réduit la survenue de l'inflammation en induisant des Tregs Foxp3⁺ et en supprimant la réponse T effectrice Th1 et Th17. Il est décrit qu'une production autocrine d'IL-35 au moins dans les Bregs IL-35⁺ induit la production d'IL-10 et le mécanisme final de suppression serait finalement médié par l'IL-10 (Shen et al. 2014, Wang et al. 2014, Wang et al. 2015).

Parfois ce rôle Breg est délétère, notamment dans un contexte tumoral. Les Bregs sensibilisés par les tumeurs produisent de l'IL-10 et peuvent convertir des T CD4 au repos en Treg (Olkhanud, Damdinsuren et al. 2011). En conséquence, les Bregs induisent des Tregs qui coopèrent conjointement pour instaurer un environnement tolérogène favorisant les métastases cancéreuses du poumon ou des ganglions lymphatiques (Olkhanud, Damdinsuren et al. 2011).

Des études dans le domaine de la transplantation suggèrent un rôle unique des Bregs dans la génération de Treg spécifiques d'allo-antigènes. Dans son article en 2007, Chen et ses collaborateurs démontrent que les LB allogéniques activés par le CD40 sont plus efficaces dans la génération de Treg Foxp3⁺ spécifiques de l'allo-antigène que les autres cellules présentatrices d'antigène, notamment les cellules dendritiques. Ainsi, ils démontrent que la génération de Treg allogéniques *in vitro* dépend de l'interaction CD28 du LT avec CD80, CD86 sur les LB allogéniques activés. Ce qui confirme qu'un contact cellulaire est fondamental à cette différenciation Treg (Chen and Jensen 2007). Considérant que les Bregs T2-MZP forment un contact plus stable et plus durable avec les LT par microscopie *in vitro* de cellules vivantes, Carter et collaborateurs suggèrent qu'une interaction prolongée entre LB et LT, est essentielle à la conversion en Treg (Carter, Vasconcellos et al. 2011, Carter, Rosser et al. 2012). D'autant plus fascinant qu'il fut montré que l'induction d'une différenciation en Treg par les Bregs permet aux Treg de migrer vers le site de l'inflammation. On peut évoquer l'exemple démontrant qu'une infection par des Helminthes favorise des Bregs T2-MZP qui suppriment les maladies respiratoires allergiques en facilitant l'infiltration de Treg CD4⁺ CD25⁺ dans les poumons des souris infectées (Amu, Saunders et al. 2010). Pareillement dans l'EAE, la reconstitution par des LB de souris μ MT conduit à une augmentation des Tregs dans le système nerveux central (SNC) soit par la prolifération des Tregs de *novo* soit par la migration de Treg existants vers le site de

l'inflammation. Les travaux de Mann et collaborateurs en 2007 montrent que le transfert de LB KO pour le CD80 et CD86 ne permet pas de restaurer la prolifération et la migration des Tregs, réaffirmant une nouvelle fois la nécessité d'un mécanisme direct et contact dépendant entre Breg et Treg (Sanz, Cortijo et al. 2007). Une autre preuve qui s'ajoute à la contribution du LB dans l'homéostasie des Des Tregs est rapportée dans un modèle de colite induite. Les Tregs et les LB présents dans les tissus lymphoïdes associés aux intestins (GALT) sont tous deux impliqués dans la guérison de la colite. De plus, la déplétion des Tregs conduit à une exacerbation de la colite. D'autre part en absence de LB, la colite est plus sévère, le nombre de Treg est significativement réduit dans le GALT et le transfert de LB atténue la maladie et restaure le nombre de Treg. Le mécanisme d'action est indépendant de l'IL-10 puisque le transfert adoptif de LB IL-10 KO atténue également la colite (Wang et al. 2015).

D'autant plus intéressant que les LB induisent la prolifération des Tregs qui à leur tour permettront la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'IgA (Wang et al. 2015). Ces résultats démontrent que les LB et les Tregs interagissent et coopèrent sans mise en jeu de l'IL-10 dans le but de prévenir les réponses immunitaires excessives qui peuvent conduire à la colite. Ray et collaborateurs ont montré en 2012 que les LB exprimant le GITRL contrôlent le nombre de Treg en induisant leurs proliférations, permettant ainsi de maintenir leur nombre au dessus du seuil nécessaire à la prévention de l'EAE. Les LB joueraient un rôle fondamental dans le contrôle du début de la maladie et de sa sévérité en contrôlant l'homéostasie Treg. Ce maintien de Treg est indépendant des molécules CD80, CD86 CMHII et également de l'IL-10 (Ray et al. 2012). Des travaux antérieurs démontrent la contribution à ce phénomène de cytokines comme le TGF- β et l'IL-6, connues pour dicter la balance entre la différenciation des sous types LT pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Bettelli, Carrier et al. 2006, Veldhoen, Hocking et al.

2006). En effet, en supprimant les cytokines nécessaires à la différenciation des LT pro-inflammatoires et en produisant des cytokines anti-inflammatoires nécessaires à l'induction de Treg, les Bregs peuvent être à la fois des contrôleurs de la réponse T inflammatoire et de la réponse Treg, avec l'objectif ultime de maintenir une homéostasie immunitaire.

Les Bregs humains influencent aussi l'expression de CTLA-4 à la surface des Tregs préexistant par contact direct et sécrétion TGF- β (Kessel et al. 2012).

Il est intéressant de préciser que les Tregs sont particulièrement résistants aux signaux inhibiteurs des Bregs. C'est comme si les Bregs servaient de messagers et préparaient le terrain pour les Tregs avant de s'effacer une fois les Tregs opérationnels. Une fois les Tregs activés ceux-ci ont de ce fait tendance à bloquer l'activité des Bregs notamment par la production de TGF- β qui exerce un effet inhibiteur sur les Bregs (Noh et al. 2012).

1.5.2 Suppression des T pro-inflammatoires

1.5.2.1 Les LT CD4⁺

De nombreux travaux ont fait la démonstration d'un rôle du Breg dans la suppression des réponses pro-inflammatoires Th1 et Th17. Une perturbation des voies nécessaires à l'induction de Breg endogènes exacerbe l'inflammation auto-immune, subordonnée à une réponse T CD4 pro-inflammatoire non contrôlée. Par exemple, une délétion de STIM-1 et STIM-2 conduit à une déficience de la réponse IL-10 dans les LB (Matsumoto, Fujii et al. 2011). Ces souris présentant un défaut en Breg fonctionnels développent une forme plus sévère d'EAE en raison d'une expansion des T CD4⁺ dans la moelle épinière et une augmentation d'IFN- γ et d'IL-17 dans les LT spécifiques du peptide MOG (Matsumoto, Fujii et al. 2011).

De la même façon, lorsque les LB sont incapables de répondre à une stimulation TLR 2/4 (souris chimérique TLR 2 KO TLR 4 KO et MyD88 KO dans les LB), l'EAE est exacerbée en

raison de l'incapacité des LB à produire de l'IL-10 et à supprimer l'activation des LT (Lampropoulou, Hoehlig et al. 2008). Des splénocytes isolés de souris KO en MyD88 dans les LB produisent plus d'IFN- γ , d'IL-17 *in vitro* et prolifèrent davantage que les splénocytes de souris sauvages en réponse au peptide MOG (Lampropoulou, Hoehlig et al. 2008). Plus généralement, dans l'auto-immunité, la génération de souris chimériques ayant un ratio Breg/LB diminué, associée à une production d'IL-10 plus faible conduit à une augmentation de l'expansion des cellules Th1 et des Th17 (Fillatreau, Sweenie et al. 2002, Carter, Vasconcellos et al. 2011).

En utilisant un modèle d'inflammation auto-immun comme l'EAE, il a été montré qu'un transfert adoptif de B10 CD1d^{fort} CD5⁺ ne permet pas d'améliorer la maladie lorsque cette population de LB est issue de souris KO en CD40 et en IL-21R contrairement aux B10 issues de souris sauvages (Yoshizaki, Miyagaki et al. 2012). Ainsi, la suppression des LT CD4 est IL-10 dépendante et semble être la conséquence d'une interaction cellulaire mettant en jeu la paire (ou le duo) CD40-CD40L et implique également une production d'IL-21 par les LT activés (Yoshizaki, Miyagaki et al. 2012).

De plus, les travaux de Ding en 2011 montrent que la population Breg TIM-1⁺ peut transférer la tolérance dans l'allogreffe (Ding, Yeung et al. 2011), associée à une meilleure survie du greffon. Les LT CD4⁺ du receveur produisent moins d'IFN- γ avec un shift global Th1 vers Th2 en comparaison avec les LT CD4⁺ issues de souris n'ayant pas reçu ce transfert adoptif (Ding, Yeung et al. 2011).

Outre la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires par les TCD4, les Bregs peuvent supprimer les réponses inflammatoires en induisant la mort cellulaire des TCD4⁺.

En effet, des études dans le modèle de diabète ont révélé que les LB stimulés par du LPS expriment FasL et du TGF- β . Cette stimulation favorise l'apoptose des LB et des LT lorsqu'ils sont cultivés avec des T CD4⁺ diabétogéniques. De plus, le transfert adoptif des LB stimulés par du LPS inhibe le diabète et les réponses Th1 dans les souris NOD (diabétiques non obèse), un modèle murin de diabète spontanée (Tian, Zekzer et al. 2001). Des études sur des cas de schistosomiasis ont montré qu'en plus de la production d'IL-4 et d'IL-10, les B-1 expriment FasL et ciblent les T CD4 pour induire leur apoptose, ce qui prévient le développement de la granulomateuse par schistosome (Lundy and Boros 2002).

La majorité des B-CD5⁺ expriment fortement la molécule tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL ou CD 253) ainsi que la molécule FasL (CD 178) (Pers, Daridon et al. 2008). Il a été montré que ces LB freinent l'évolution de plusieurs modèles de maladies auto-immunes dont les arthrites au collagène dans laquelle une corrélation inverse a été enregistrée entre le nombre de ces cellules et la sévérité des signes cliniques (Lundy and Fox 2009). Tretter identifie également ce mécanisme d'apoptose des LT CD4 par des Bregs induit chez l'Homme (Tretter et al. 2008).

Ce qui est d'autant plus intéressant est que l'induction d'apoptose par les Bregs, Fas-L ou TRAIL, ne se fait pas de la même manière selon la nature de la cellule T cible. Par exemple, les lymphocytes Th1 s'avèrent plus susceptibles que les lymphocytes Th2 puis viennent les lymphocytes Th17 et les Tregs, ces derniers étant les plus résistants à l'apoptose (Klinker and Lundy 2012). Il en est de même selon la nature des tissus. L'expression accrue de molécules pro-apoptotiques par les Bregs dans certains tissus comme l'œil ou les organes de reproduction, participe à expliquer le privilège immunitaire de ces sites (Klinker and Lundy 2012). On peut souligner que tous les Bregs sont eux-mêmes nettement plus sensibles à l'apoptose que les Tregs.

Toutefois, ces apoptoses des Bregs sont en partie compensées par une prolifération d'autres Bregs (Noh and Lee 2011).

Récemment, une étude a montré que l'IL-21 peut induire des Bregs exprimant le granzyme B résident au sein du microenvironnement de diverses tumeurs. Le Granzyme B est caractérisé par sa fonction classique cytotoxique mais pas seulement. Dans le travail de Linder et collaborateurs en 2013, l'équipe montre que l'IL-21 induit un phénotype Breg chez l'Homme avec l'expression de molécules immuno-régulatrices notamment le granzyme B, l'IL-10, l'IDO et le CD25. Ils montrent aussi que ces LB suppriment la prolifération ou la croissance et l'activation des LT par la dégradation de la chaîne Zeta du TCR de manière granzyme B dépendante et sans activation de la caspase 3 (Lindner et al. 2013).

En conclusion, les effets d'une interaction T CD4/Breg sont variés, entraînant une multitude de réponse allant de l'induction de Treg à une suppression direct des LT pro-inflammatoires en passant par une polarisation des cellules T CD4⁺ en cellules Th2, l'induction de l'apoptose ou encore, comme nous venons de le voir, par l'arrêt de la croissance cellulaire des LT.

1.5.2.2 Les LT CD8⁺

Alors qu'il est bien établi que les Bregs sont capables de modifier un grand nombre d'aspects de la réponse T CD4⁺, leur capacité à supprimer les réponses T CD8⁺ est plus implicite.

En effet, des variabilités de réponses suite à une interaction LB-TCD8 sont rapportées et semble dépendante du modèle de maladie utilisé.

Dans un modèle d'obésité, les LB sont des régulateurs important de l'inflammation dans les tissus adipeux. Cette fonction Breg contribue à la suppression de l'inflammation constitutive dans les tissus adipeux en agissant notamment sur les LT CD8⁺ cytotoxiques résidants.

Mishimura montre qu'un dysfonctionnement des LB contribue à la progression de l'inflammation adipeuse et au développement de diabète chez l'Homme (Nishimura et al. 2013).

Dans le modèle de la carcinogénèse, les souris μ MT sont utilisées pour démontrer que les LB peuvent limiter la surveillance immunitaire des T CD8 (Qin, Richter et al. 1998, Schioppa, Moore et al. 2011). Par exemple dans le modèle du carcinome mammaire, les souris μ MT sont résistantes au développement de tumeurs du poumon. Ces souris affichent une augmentation de la réponse T CD8 cytotoxique (CTL) à l'antigène tumoral du poumon Ts/A, conduisant à une clairance plus efficace des cellules tumorales (Qin, Richter et al. 1998). La question qui se pose ici est de savoir s'il s'agit de l'absence d'effet direct du LB sur les T CD8 qui est en cause ou s'il s'agit d'un effet indirect de la suppression Breg sur les T CD4 puisque les T CD4 sont aussi inhibés dans ce modèle (Qin, Richter et al. 1998).

Limiter les réponses T CD8 par les LB pourrait être intéressant afin de prévenir les éventuels dommages collatéraux induit par une réponse immunitaire excessive dans un contexte infectieux. Par exemple, il a été rapporté que la susceptibilité à *Leishmania donovani* est dépendante des LB activés par la voie MyD88 qui suppriment efficacement la réponse cytotoxique des T CD8 ainsi que la génération de cellules mémoires effectrices au cours de l'infection (Bankoti, Gupta et al. 2012). Les auteurs de cette étude démontrent que ce sont les cellules LB-ZM productrices d'IL-10 qui sont à l'origine de cette suppression puisque leur déplétion augmente le pourcentage de T CD8⁺ granzyme B⁺ (Bankoti, Gupta et al. 2012).

Dans un modèle de carcinome de la peau induit chimiquement, les LB IL-10⁺, CD21d^{fort} CD19⁺ peuvent restreindre la surveillance immunitaire en limitant la migration et l'activation des T CD8⁺ (Schioppa, Moore et al. 2011). En effet, dans les souris sauvages les Bregs parfaitement fonctionnels abrogent la production de CCL5 un puissant chémo-attractant, empêchant

l'infiltration des TCD8 effecteurs dans la peau et aboutissant à la formation de papillome de la peau (Schioppa, Moore et al. 2011). A cela s'ajoute la suppression des réponses T cytotoxiques par les LB qui peut aussi conduire à une anergie des TCD8. Les LB activés par le CD40L ou encore les B transformés par le virus d'Epstein-Barr (Aasi et al.) peuvent amener des TCD8⁺ CD28⁺ à devenir non répondeurs à une stimulation antigénique secondaire (Hollsberg, Batra et al. 1996). Pareillement, dans une autre étude, les LB activés par du LPS peuvent conduire les T CD8 à devenir anergique par la production de TGF- β (Parekh, Prasad et al. 2003). Pour résumé, ces effets démontrent que les interactions Breg/T CD8 sont importantes dans les processus inflammatoires, infectieux et dans le cancer. Bien que la conséquence de cette interaction ne soit pas toujours bénéfique pour l'hôte.

1.5.3 Contrôle de la fonction des cellules présentatrices d'antigènes

Dans les travaux rapportant un effet Breg sur la réponse T inflammatoire, il est souvent démontré que le compartiment des cellules présentatrices d'antigènes est également affecté. Par exemple, le transfert adoptif de LB stimulés par du LPS peut induire la mort des T CD4⁺ ainsi que l'apoptose des cellules présentatrices d'antigènes dans la rate (Tian, Zekzer et al. 2001).

L'une des cibles particulières des Bregs sont les cellules dendritiques sécrétrices d'IL-12 (Lampropoulou, Hoehlig et al. 2008). Les LB inhibent la sécrétion de l'IL-12 dans de nombreux modèles pathologiques afin de réduire la réponse inflammatoire néfaste. L'étude comparative de Moulin et collaborateurs chez des souris B6 sauvages et des souris μ MT présente une analyse de l'influence des LB sur la balance Th1/Th2 induite par les cellules dendritiques (Moulin, Andris et al. 2000).

L'analyse de la réponse immunitaire à la protéine vecteur KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) montre une activation dans les deux type de souris, mais alors que les LT sauvages

sécrètent de l'IFN- γ pro-inflammatoire et de l'IL-4 anti-inflammatoire, les LT des souris μ MT sécrètent beaucoup plus d'IFN- γ mais pas d'IL-4. Les LB sont donc indispensables à l'orientation de la réponse LT vers une réponse Th2 anti-inflammatoire en favorisant la sécrétion de l'IL-4. Plus intéressant encore, les LB exercent cet effet en agissant au niveau des cellules dendritiques. En effet, les souris immunisées par le transfert de cellules dendritiques provenant de souris μ MT n'arrivent pas à restaurer la production d'IL-4 par rapport aux cellules dendritiques provenant de souris sauvages. De plus, la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques μ MT est beaucoup plus importante que celle des cellules dendritiques sauvages. Dans l'ensemble ces résultats montrent que l'absence de LB provoque une augmentation du niveau d'IL-12 qui, à son tour, inhibe la différenciation Th2 par la diminution de l'IL-4 et oriente ainsi vers une réponse Th1 pro-inflammatoire associée à une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ . Les auteurs ont également observé que la surproduction d'IL-12 par les DC chez les souris μ MT est corrélée à une diminution de l'IL-10, connue pour être inhibitrice de l'IL-12 et d'autre part que le transfert de cellules dendritiques provenant de souris déficientes en IL-10 provoque une production accrue de l'IFN- γ . Ce modèle montre bien que les Bregs peuvent induire la régulation de l'immunité en modulant le fonctionnement non pas des LT mais des cellules dendritiques.

Selon Skok et collaborateurs, l'interaction entre Breg et cellules dendritiques est plus complexe (Skok, Poudrier et al. 1999). Les LB naïfs activés par le CD40 orientent les LT vers une réponse Th2 anti-inflammatoire par une production significative d'IL-4 et une production moindre d'IFN- γ . Les LB activés sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-10 mais l'apparition de la sécrétion de ces cytokines est plus rapide sous le contrôle de l'IL-12. En retour, l'IL-10 agit négativement sur l'IL-12 et assure donc un rétrocontrôle négatif. Le résultat global aboutit à une différenciation des LT en Th2 producteurs d'IL-4 associé à une diminution de Th1 producteurs

d'IFN- γ . Ce mécanisme de régulation des LB par l'IL-10 agissant négativement sur la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques a été confirmé chez les souris nouveau-nées (Sun et al. 2005). Les cellules dendritiques du nouveau-né connues comme tolérogènes sont capables de déclencher une réponse Th2. Chez les souris adultes, les mêmes cellules dendritiques orientent plutôt vers une réponse Th1. Une stimulation des cellules dendritiques de souriceaux par du CpG-ODN induit une réponse Th1 *in vitro* mais pas *in vivo* où une réponse Th2 reste dominante. Ces résultats suggèrent qu'elles ont bien le potentiel pour déclencher une réponse Th1 mais qu'elles sont freinées *in vivo* par un environnement tolérogène. Le facteur responsable de l'inhibition de la réponse Th1 serait l'IL-10 produite par les LB. En effet, chez le nouveau né, les LB activés par du CpG-ODN sécrètent de forte quantité d'IL-10 qui agit négativement sur la sécrétion de l'IL-12 par les cellules dendritiques au profit d'une réponse Th2. Les LB responsables de cette régulation sont les LB CD5⁺ qui représentent 30 à 40% de la population de LB chez le nouveau-né. Ce nombre important de LB producteurs d'IL-10 génère une réponse anti-inflammatoire dominante chez le nouveau-né qui reste sensible aux infections. Chez la souris adulte, du fait de la diminution de la fréquence des LB CD5⁺, une réponse Th1 est favorisée par les cellules dendritiques (Sun et al. 2005).

Un rôle original du Breg dans la réponse des cellules présentatrices d'antigènes fut proposé par une équipe dans un modèle d'EAE chronique dans des souris déficiente en LB immunisées par le peptide PLP. Dans ce modèle, le score clinique de la maladie est exacerbé dans les souris μ MT et serait associé à une réponse proliférative et à une production d'IFN- γ plus forte en réponse au peptide PLP en comparaison avec les souris sauvages (Lyons, Ramsbottom et al. 2008).

L'hypothèse des auteurs est que dans les souris sauvages, les LT spécifiques du peptide protéo-lipide (PLP), sont activés par les cellules dendritiques. Suite à cette activation, les LB deviennent les principales cellules présentatrices d'antigènes pour les LT naïfs. De ce fait, les LB empêcheraient la reconnaissance et l'activation de TCD4⁺ par de nouveaux épitopes immunogènes présents dans le système nerveux central suite aux dommages causés par l'inflammation (Lyons, Ramsbottom et al. 2008). D'autres modèles murins vont dans le même sens. Il a été montré que les LB de la ZM des souris lupiques activés par le TLR-9 produisent une quantité d'IL-10 plus importante par rapport aux contrôles. Cette dernière abroge la production d'IL-12 par les splénocytes totaux *in vitro* (Lenert, Brummel et al. 2005). Lors d'une infection par *Leishmania Major*, on retrouve une population de LB IL-10⁺ capables *in vitro* de réguler négativement la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (Ronet, Hauyon-La Torre et al. 2010). Les travaux de notre équipe ont permis de montrer que des LB humains stimulés par les voies CD40 et TLR-9 ont la capacité de réguler les signaux des cellules dendritiques nécessaires à l'induction d'une réponse inflammatoire. Cette régulation B n'est pas restreinte à la production d'IL-12p70, mais concerne également l'expression des molécules HLA-DR, CD80 et CD86. De surcroît, la régulation des LB peut affecter tous les stades de maturation des cellules dendritiques. Les LB humains sont ainsi capables de freiner la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures et de ralentir le processus de différenciation global en cellules dendritiques matures. Parmi les mécanismes d'actions, le contact cellulaire par l'intégrine CD62L est impliqué dans la régulation des molécules CD80, CD86 sur les cellules dendritiques. La production d'IL-12p70 semble être régulée par un contact cellulaire associé à un facteur soluble autre que l'IL-10 (Morva, Lemoine et al. 2012).

Le rôle du Breg dans la régulation des macrophages et des monocytes est beaucoup moins étudié. Dans un modèle de cancer de la peau, les souris TNF KO qui présentent une déficience en LB producteurs d'IL-10 ont une augmentation de l'infiltration par des macrophages F4/80+ dans les tumeurs (Schioppa, Moore et al. 2011). Dans les souris CD19 KO qui n'ont pas de LB CD1d^{fort} CD5⁺, il y a une augmentation de la phagocytose à *Listeria monocytogene* par les macrophages en raison probablement d'un défaut en Breg. Horikawa et ses collaborateurs démontrent en 2013 que les LB CD5⁺ CD1d^{fort} activés par du LPS suppriment la production d'Oxyde Nitrique, de TNF et d'IFN- γ par les macrophages *in vitro* (Horikawa, Weimer et al. 2013). Toutefois cet aspect de la fonction Breg sur ces CPA nécessite davantage d'investigations.

1.5.4 Entrave la surveillance immunitaire des cellules NK

Dans des modèles d'infections et de tumeurs, les Bregs sont capables de supprimer la réponse immune générée par les cellules naturel killer (NK) et les T CD8⁺ (Inoue, Leitner et al. 2006, Bankoti, Gupta et al. 2012). Par exemple, les LB interagissent avec les cellules tumorales exprimant le CD40L aboutissant à la production d'IL-10 par les LB qui à son tour supprime la production d'IFN- γ par les cellules NK (Inoue, Leitner et al. 2006). La reconstitution des souris μ MT avec des LB de souris sauvages restaure la croissance des tumeurs pulmonaires qui s'accompagne d'une inhibition de l'activité des cellules NK (Inoue, Leitner et al. 2006). Dans un autre modèle tumoral dans lequel une tumeur est induite par l'injection d'une lignée cellulaire EMT-6 dans les tissus pulmonaires, les LB s'opposent à la clairance active des tumeurs en induisant des Tregs de manière IL-10 indépendante et en prévenant l'infiltration des cellules NK CD49⁺ dans les tumeurs (Zhang, Eliav et al. 2013). Dans un modèle d'infection, les LB de souris chimériques KO en MyD88 et TLR-2 qui possèdent une réponse LB IL-10 défectueuse, favorisent une augmentation de l'activité des neutrophiles, des cellules NK et des LT conduisant

à une clairance plus efficace des *Salmonelle Typhimurium* (Neves, Lampropoulou et al. 2010). Dans ce modèle, par l'absence de LB producteurs d'IL-10, les neutrophiles sont plus abondants en nombre et produisent plus de TNF- α (Neves, Lampropoulou et al. 2010).

Une nouvelle population B activatrice de la réponse innée est décrite comme étant capable d'altérer les réponses des neutrophiles dans un modèle de septicémie bactérienne en produisant du GM-CSF (Rauch, Chudnovskiy et al. 2012). Les souris chimériques dépourvues de cette population cellulaire ne développent pas de réponse septique exacerbée suite à une ligature et une ponction du coecum en comparaison aux souris contrôles (Rauch, Chudnovskiy et al. 2012). Ceci est dû à une augmentation significative de la population de neutrophiles dans le péritoine et à l'incapacité des neutrophiles dans le sang à phagocyter les *E. coli*, tous deux caractéristiques d'une septicémie sévère (Rauch, Chudnovskiy et al. 2012).

1.5.5 Inhibition du soi « interaction Breg et LB »

Dans beaucoup de modèles de suppression soutenus par les Bregs, on enregistre une baisse de la production d'AC pathogéniques. Ceci pourrait être dû à un effet direct des Bregs sur les LB ou indirect via le contrôle des T helper ou des Tfh (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007), (Gray, Miles et al. 2007), (Mauri, Gray et al. 2003, Miles, Heaney et al. 2012).

Trois mécanismes possibles de suppression de la réponse AC par les Bregs peuvent être envisagés:

1. Les Bregs suppriment les réponses T CD4⁺ notamment des Tfh. En absence de Tfh les LB sont moins capables de subir une maturation en cellules plasmocytaires productrices d'AC (Achour et al. article en révision).
2. Les Bregs induisent des Treg. Ce qui peut contribuer à une suppression globale des réponses inflammatoires, supprimant indirectement la production d'AC.

3. La suppression directe des LB producteurs d'AC par les Bregs. Les Bregs peuvent altérer le microenvironnement cytokinique dans lequel la maturation des plasmocytes à lieu conduisant à une baisse de la réponse humorale.

Le rôle possible des Bregs dans la suppression des LB apparaît plus évident dans les modèles de rat en transplantation cardiaque. Une survie à long terme d'une allogreffe est caractérisée par une accumulation dans le greffon de LB incapables de commuter de la classe IgM à IgG (Le Texier, Thebault et al. 2011). Le transfert adoptif de LB tolérogènes dans une souris receveuse d'un greffon cardiaque permet de prévenir le rejet de l'allogreffe. La suppression du rejet de greffe est associée à une réduction du niveau d'IgG total et une augmentation d'IgG₁, un isotype relié à la réponse Th2 et qui ne contribue pas au rejet d'allogreffe (Le Texier, Thebault et al. 2011). Un shift similaire vers une réponse AC type 2 est observé suite au transfert de Breg dans plusieurs modèles de suppression médié par les Bregs chez le rongeur (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007) ; (Gray, Miles et al. 2007) ; (Mauri, Gray et al. 2003, Miles, Heaney et al. 2012). Ces résultats suggèrent que les Bregs directement ou indirectement via les T helper peuvent altérer la fonction effectrice des LB.

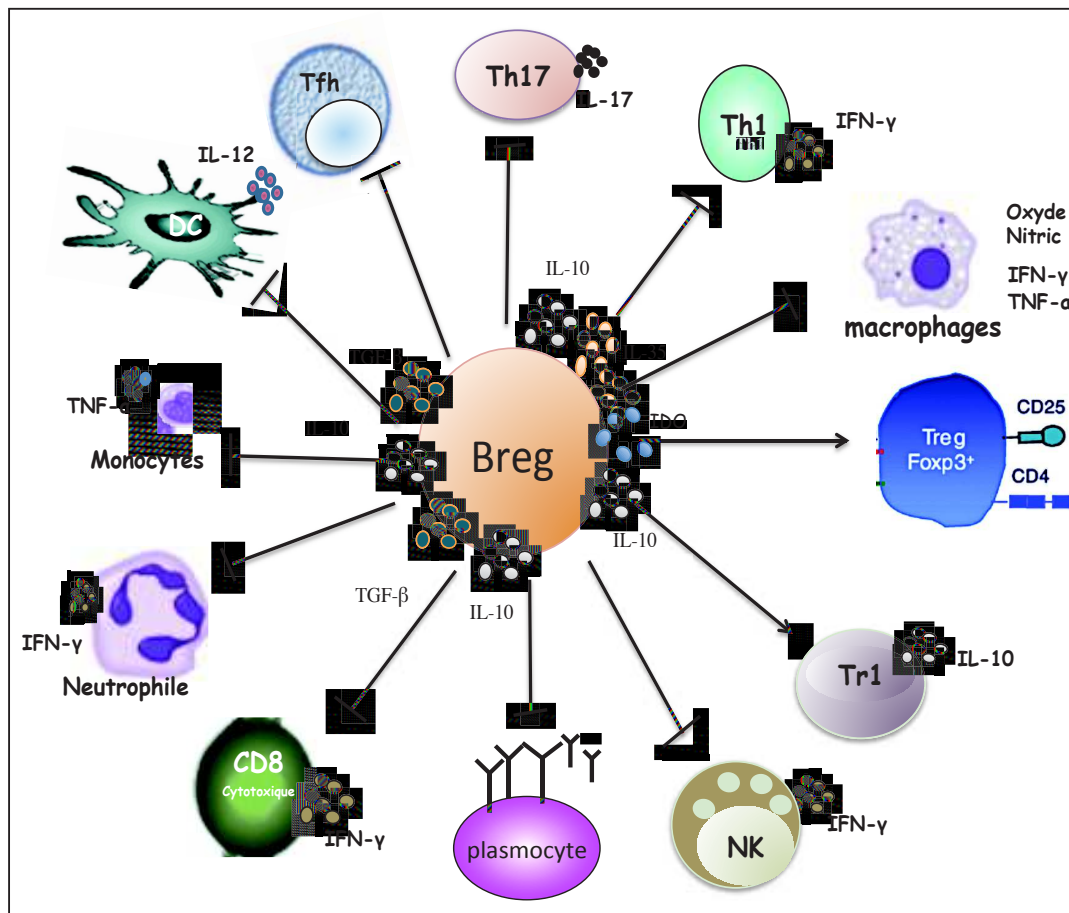


Figure 1 : Caractéristiques fonctionnelles des Bregs.

Par la production de forte quantité d'IL-10, de TGF- β et d'IL-35, les Bregs peuvent supprimer la différenciation des monocytes producteurs de TNF- α , des cellules dendritiques productrices d'IL-12, des cellules Th1 et TCD8+ cytotoxiques, des cellules NK et des neutrophiles producteurs d'IFN- γ . Les Bregs peuvent également induire la différenciation de LT immunosuppresseurs, Foxp3+ et de LT régulateur Tr1. Les Bregs peuvent également inhiber la production d'Oxyde Nitrique, de TNF- α et d'IFN- γ par les macrophages. Enfin, les Bregs peuvent altérer de manière directe ou indirecte via les T helper ou les Tfh, la fonction et la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'auto-AC, conduisant à une baisse de la réponse humorale (Evans, Chavez-Rueda et al. 2007); (Gray, Miles et al. 2007); (Mauri, Gray et al. 2003, Miles, Heaney et al. 2012).

1.5.6 Conclusion

Les Bregs sont essentiels dans le maintien d'un état de tolérance immunitaire, une fonction (qui peut avoir des conséquences / ou qui peut s'avérer) aussi bien protectrice que pathogène. D'un côté, les Bregs suppriment l'inflammation pathogénique qui peut conduire à l'auto-immunité, l'allergie ou le rejet d'allogreffe. D'un autre, les Bregs peuvent contribuer à l'établissement d'un environnement tolérogène associé au développement de cancer et à l'échec de l'élimination du pathogène de l'hôte. Les mécanismes par lesquels les Bregs suppriment les cellules inflammatoires et contribuent à la différenciation des Tregs sont divers et peuvent impliquer des processus à de multiples étapes dont la production de cytokines comme l'IL-10 ou le TGF- β . Par contact cellulaire avec un T CD4, un Breg peut convertir un T naïf en Treg. Cette interaction ferait intervenir une présentation de l'antigène exogène sur le CMHII des Bregs et serait dépendante de la prolongation du contact cellulaire en mettant en jeu des molécules telles que CD80, CD86 avec CTLA-4. Un Breg peut interagir avec différentes cellules cibles. Ces interactions semblent dynamiques, dépendantes de l'expression des récepteurs et des ligands entre le Breg et sa cellule cible. Il a récemment été démontré que les mastocytes affectent le compartiment des Bregs. Durant la phase de rémission d'une inflammation intestinale induite par le Dextran-Sulfate-Sodium, une augmentation significative des LB CD19⁺ IL-10⁺ est observée dans les souris sauvages mais pas dans des souris déficientes en mastocytes. L'axe CD40/40L joue un rôle dans l'expansion de ces Breg. Ces observations n'excluent pas que les Bregs eux même puissent exercer des effets sur les mastocytes. Finalement, comme les cellules du système immunitaire sont intimement interconnectées, les Bregs peuvent initier un effet « domino » dépendant d'une suppression secondaire par de multiples types cellulaires. Par exemple, l'induction de Treg par les B reg va conduire à une baisse de la suppression des cellules

effectrices ou bien l'action suppressive des Bregs sur la production d'IL-12 par les cellules dendritiques va conduire indirectement à une inhibition des processus en aval de l'activation Th1. La multiplicité des effets suppressifs médiés par les Bregs démontre la puissance de la fonction régulatrice immunitaire de ces cellules. Ce qui explique pourquoi dans des modèles de maladies plusieurs composants cellulaires de la réponse inflammatoire sont dérégulés dans les souris déficientes en LB. Le prochain chapitre traitera de cet aspect important du Breg dans le contrôle de la progression des maladies auto-immunes.

LES B REGULATEURS DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES

2. Les B régulateurs dans les maladies auto-immunes

Depuis la découverte du Breg, plusieurs travaux ont tenté de décrypter son rôle dans des modèles d'auto-immunité murins et dans la physiopathologie des maladies auto-immunes chez l'Homme. En voici les principaux exemples qui ont marqué et fait progresser nos connaissances contemporaines de la cellule Breg.

2.1 La sclérose en plaques

2.1.1 Chez la souris (L'Encéphalomyélite Expérimentale Auto-immune)

L'EAE, modèle expérimental de la sclérose en plaque chez l'Homme, est un modèle induit par une immunisation avec des peptides de myéline (tel que MOG) conduisant à une démyélinisation médiée par les T CD4⁺ spécifiques d'un auto-antigène (Pettinelli et al. 1981, Williams et al. 1994).

Les propriétés régulatrices des LB durant l'induction de cette maladie sont largement décrites grâce aux souris génétiquement déficientes en LB qui développent une forme d'EAE plus sévère et non rémittente (Wolf et al. 1996). Cet effet régulateur a récemment été décrit comme étant IL-10 indépendant (Ray et al. 2012). Pourtant, d'autres études ont mis en évidence l'importance des LB IL-10⁺ dans l'EAE. La sévérité de l'EAE augmente durant la phase tardive de la maladie dans les souris μ MT déficientes en LB. La guérison spontanée chez ces souris est incomplète et le transfert adoptif de LB sauvages mais pas de LB issus de souris KO en IL-10, normalise la sévérité de l'EAE. (Lampropoulou et al. 2008). La rémission ou la guérison de la maladie est dépendante de la présence de LB réactifs à un auto-antigène et les LB isolés de souris malades produisent de l'IL-10 en réponse à une stimulation par l'auto-antigène. En absence de

LB producteurs d'IL-10 spécifiques de l'auto-antigène, les réponses pro-inflammatoires médiées par les cellules Th1 persistent et les souris ne guérissent pas de la maladie. Le modèle d'EAE démontre la complexité des mécanismes régulateurs médiés par différentes sous populations cellulaires au cours des différentes étapes de la maladie. Lorsque la déplétion des LB des souris sauvages est réalisée, par un traitement anti-CD20, 7 jours avant induction de l'EAE, il y a une augmentation de l'infiltrat et une expansion des LT encephalitogène au sein du SNC avec une exacerbation des symptômes de la maladie (Bouaziz et al. 2008). Cet effet est lié à la déplétion des B10 puisque des résultats similaires sont observés suite à la déplétion sélective des B10 par un AC anti-CD22 (Matsushita et al. 2010).

Par contre, une fois que la maladie est bien établie, le transfert adoptif des B10 ne supprime pas l'évolution de la maladie. Les B10 semblent donc réguler les réponses auto-immunes aiguës dans l'EAE. En revanche, contrairement aux B10 qui ont un rôle que durant la phase précoce de la maladie, la déplétion des Tregs augmente la phase tardive de la maladie (Matsushita et al. 2010). En résumé, dans l'EAE en fonction des stades de la maladie différents mécanismes régulateurs sont impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire avec la participation des B10 durant la phase initiale du processus pathologique, puis des Tregs principalement dans la phase tardive de la maladie.

2.1.2 Chez l'Homme

Chez l'Homme, Duddy et collaborateurs ont démontré que les cellules B dérivées de patients atteints de SEP, produisent des quantités plus faibles d'IL-10 en comparaison avec des individus sains, ce qui tend à penser que cette déficience en IL-10 des LB pourrait contribuer à la pathogenèse de la SEP (Duddy et al. 2004, Duddy et al. 2007). A l'inverse, une autre étude a constaté que la fréquence des cellules LB périphériques productrice d'IL-10 de phénotype

CD27⁺CD24^{fort}, décrites comme cellules régulatrices est augmentée chez les patients SEP par rapport à des volontaires sains. Toutefois, plusieurs patients recevaient un traitement immuno-modulateur au moment de la prise de sang (Iwata et al. 2011). Pourtant, Knippenberg et collaborateurs observent une baisse du pourcentage des Bregs IL-10⁺ dans le sang périphérique des patients SEP par rapport aux contrôles sains. Durant la phase de rechute, cette réduction en Breg concerne en particulier les Bregs naïfs (Knippenberg et al. 2011). Récemment une équipe a identifié une population Breg exprimant la perforine chez les patients SEP. Cette population est enrichie dans le liquide céphalo-rachidien des patients en comparaison au sang périphérique. Le phénotype Breg identifié est CD19⁺CD25⁺, CD19⁺CD25⁺FoxP3⁺ et CD19⁺FoxP3⁺ (de Andres et al. 2014). Élément intéressant, cette sous population Breg est plus importante chez les patients RRMS en rechute clinique que chez les patients en rémission.

2.2 Les maladies inflammatoires de l'intestin

2.2.1 Chez la souris

Mizoguchi a mis en évidence que des LB producteurs d'IL-10 régulent l'inflammation dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Mizoguchi et al. 2006). Les premières études montrent que les LB et les auto-AC produits, suppriment la colite dans les souris déficientes en TCR α qui normalement développent spontanément une colite chronique (Mizoguchi et al. 1997). Alors que les LB ne sont pas nécessaires à l'initiation de la maladie, ceux qui expriment fortement le marqueur CD1d dans les tissus lymphoïdes intestinaux correspondent à une population régulatrice (Mizoguchi et al. 2002). Cette population de LB productrice d'IL-10 apparaît durant l'inflammation chronique dans les souris déficientes en chaîne α du TCR et est capable de supprimer la progression de l'inflammation intestinale en diminuant la cascade

inflammatoire associée à la production de l'IL-1 et à l'activation des signaux transducteurs et activateurs de STAT-3. Le transfert adoptif des LB issus des ganglions mésentériques supprime également la maladie inflammatoire intestinale par des mécanismes impliquant une augmentation d'une sous-population de Treg (Wei et al. 2005). Ces résultats indiquent que c'est effectivement les LB des ganglions lymphatiques mésentériques qui apportent cette protection et participent donc à l'homéostasie immune mucoale.

L'administration orale d'une solution à base de Dextran sulfate sodium à des souris est utilisée comme un modèle expérimental pour induire une colite ulcéraive. Dans ce modèle, les lésions intestinales induites chez les souris KO en CD19 (absence de B10) sont plus sévères que chez les souris sauvages et ces réponses inflammatoires sont régulées négativement par les LB CD1d^{fort} CD5⁺ producteurs d'IL-10 (Yanaba et al. 2007). De plus, les B10 émergent durant l'inflammation chronique, suppriment la progression des réponses inflammatoires et améliorent les manifestations de la maladie. En 2008, l'équipe de Goetz montre que la déplétion des LB avec l'anti-CD20 Rituximab, exacerbe la colite ulcéraive chez l'Homme suggérant que les Bregs prédominent par apport aux LB effecteurs dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Goetz et al. 2007, El Fassi et al. 2008).

En 2011, en utilisant un modèle expérimental animal de colite ulcéraive, Yanaba remarque que la réponse inflammatoire est négativement régulée par une population particulière de B10 CD1d^{fort} CD5⁺ qui est absente chez les souris KO en CD19 et qui représente seulement 1 à 2 % de cellules B220⁺ spléniques dans les souris sauvages. Les souris KO en CD19 développent des lésions intestinales plus sévères durant l'induction de cette colite, avec une diminution des B10 et une réduction de la production d'IL-10, comme cela a été décrit pour la phase d'initiation dans l'EAE par Matsushita (Matsushita et al. 2008).

Enfin, contrairement aux résultats de Matsushita, le transfert adoptif de B10 spléniques producteurs d'IL-10 issus de souris sauvages améliore la colite ulcéreuse. Il s'agit donc de LB non spécifiques de l'antigène dans ce modèle. Les auteurs pensent qu'il est possible que plusieurs sous-populations de LB soient impliquées dans la suppression de la colite et des lésions intestinales (Yanaba et al. 2011).

Un récent travail de Rosser et Mauri indique que le microbiote intestinal favorise la différenciation de Breg dans la rate et dans les ganglions lymphatiques mésentériques et montre qu'un traitement antibiotique qui perturbe cette flore bactérienne réduit le nombre et la fonction des Bregs. Ces résultats suggèrent que le microbiote commensal est important pour établir à la fois une réponse pro-inflammatoire et une réponse régulatrice et ainsi maintenir l'équilibre, de sorte que le système immunitaire puisse rapidement éliminer l'infection mais soit capable également de réduire au minimum les dommages collatéraux inflammatoires (Rosser et al. 2014).

2.2.2 Chez l'Homme :

Chez l'Homme également de nombreuses études dans la littérature ont rapporté l'induction de Breg chez les patients hébergeant des parasites intestinaux ou encore une induction de Breg lors d'infections bactériennes (Correale et al. 2008), (Jeong et al. 2012).

D'autre part, l'équipe de Goetz confirme les observations faite chez la souris et montre que suite à un traitement anti-CD20 la déplétion des LB les patients présentent une colite ulcéreuse exacerbée (Goetz et al. 2007, El Fassi et al. 2008).

2.3 Le Diabète de Type I

2.3.1 Chez la souris

Les études portant sur les B10 et les modèles murins de diabète sont limitées à la souris NOD diabétique non obèse, qui est un modèle spontané de diabète de type 1 dans lequel la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques productrices d'insuline est médiée principalement par les LT (Anderson et al. 2005). Bien qu'il fut clairement démontré un rôle pathogénique des LB dans l'initiation de la maladie (Xiu et al. 2008), les LB activés *in vitro* peuvent maintenir la tolérance et transfèrent une protection contre le diabète de type 1 dans les souris NOD (Tian et al. 2001, Hussain et al. 2007).

Le transfert adoptif de LB stimulés par le BCR dans des souris NOD à 5 à 6 semaines d'âge retarde le début de la maladie et réduit l'incidence du diabète de type I, alors qu'un traitement à 9 semaines d'âge retarde seulement le début de la maladie. La protection contre le diabète de type 1 requiert la production d'IL-10 par les LB puisque le transfert adoptif de LB IL-10 KO ne protège pas contre le diabète de type 1 ou de l'insulinite sévère des souris NOD receveuses. L'effet thérapeutique du transfert adoptif est corrélé avec une polarisation Th2. Bien que limitées, les données dans la littérature suggèrent que les B10 pourraient être protecteurs et avoir un rôle dans la prévention de l'établissement du diabète de type 1 dans les souris NOD.

2.3.2 Chez l'Homme

En 2013, l'équipe de Di Caro montre que les cellules dendritiques tolérogènes induisent la prolifération et la différenciation de LB immunosuppresseurs *in vitro*. De plus, ces cellules suppressives semblent appartenir à une population Breg de phénotype $CD19^+CD24^+CD38^+$ qui exprime le récepteur à l'acide rétinoïque. Les auteurs montrent que cette conversion des LB en

Breg est partiellement dépendante de la production d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques. De ce fait, les auteurs suggèrent que l'efficacité clinique d'une thérapie cellulaire à base de cellules dendritiques tolérogènes chez des personnes atteintes de diabète sucré passe en partie par la conversion des LB en Breg CD19⁺ CD24⁺ CD38⁺ par un mécanisme dépendant de l'acide rétinoïque (Di Caro et al. 2013).

2.4 L'arthrite induite par le Collagène

2.4.1 Chez la souris

Comme nous l'avons évoqué précédemment le travail de Rosser met en évidence une interdépendance entre le microbiote intestinal, la différenciation des Bregs et la guérison de l'arthrite. Selon l'auteur, 70% des T2-MZPs résidants dans la rate des souris arthritiques expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, une molécule qui permet aux lymphocytes de migrer au GALT. En outre, près de 80% des T2-MZPs producteurs d'IL-10 expriment cette intégrine $\alpha 4\beta 7$.

En co-culture *in vitro*, ces dernières sont plus efficaces que les T2-MZPs négatives en $\alpha 4\beta 7$ à l'induction de Treg Foxp3⁺ ainsi qu'à l'inhibition de LT CD4⁺ TNF- α . Bien que les T2-MZPs soient rapportées pour être des cellules exclusivement résidentes de la rate, les auteurs montrent que la majorité de ces cellules migrent vers l'intestin et plus précisément dans les ganglions mésentériques des souris arthritiques, où elles acquièrent leur pleine capacité régulatrice (Rosser et al. 2014).

D'autre part, dans des travaux antérieurs, il a été montré que les LB producteurs d'IL-10 sont importants pour restreindre la sévérité de l'inflammation. Toutefois ces cellules sont incapables de prévenir l'établissement de la maladie (Mauri et al. 2012, Kalampokis et al. 2013).

2.4.2 Chez l'Homme

Les Bregs chez l'Homme pourraient jouer un rôle similaire. En effet, Daien CI et collaborateurs ont mis en évidence une déficience dans la fonction Breg chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde. D'un côté ils relèvent une augmentation du pourcentage de LB CD24^{fort} CD27⁺ circulants qui est corrélée avec une forme active de la maladie. L'augmentation de cette population LB n'est pas corrélée avec une augmentation de la fonction Breg puisqu'ils montrent qu'elle est incapable d'induire la différenciation de Treg CD4⁺ CD127^{faible} CD25⁺ contrairement aux Breg d'individus sains. De l'autre, ils montrent une baisse du nombre de B10 qui est inversement corrélée avec les marqueurs d'activité de la maladie. (Daien et al. 2014). Suggérant que la perte du nombre de B10 et donc de la fonction Breg pourrait favoriser l'arthrite rhumatoïde.

2.5 Le Lupus Erythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est un modèle de maladie auto-immune systémique. 90% des personnes touchées par cette maladie sont des femmes âgées de 20 à 40 ans. Le LED se caractérise par de la fièvre, une asthénie, une inflammation des articulations, des éruptions cutanées, une pleurésie et un dysfonctionnement rénal. Le diagnostic biologique se concentre sur la détection d'anticorps anti-nucléaires dirigés contre l'ADN double et simple brin, les nucléo protéines, les histones, et les ARN nucléolaires. L'étiologie du LED n'est pas connue, toutefois plusieurs facteurs semblent intervenir comme les facteurs génétiques, environnementaux, endocriniens et immunologiques (Rodriguez-Caruncho et al. 2015).

2.5.1 Rôle pathogène et protecteur des LB dans le LED

2.5.1.1 Modèles murins

Le LED est une maladie auto-immune multi-organe. Il est maintenant largement admis que les LB sont capables de promouvoir la progression de la maladie. Les modèles murins MRL lpr et NZB W F1 sont les deux modèles de choix pour l'étude du LED en raison du développement spontané d'une maladie rappelant le lupus de l'Homme. Dans ces deux modèles, les LB produisent un large éventail d'auto-AC dirigés contre l'ADN et les antigènes associés à l'ARN, qui contribuent aux atteintes rénales causée par le dépôt d'IgG (Dang et al. 1984, Cohen et al. 1991).

En plus de la production d'auto-AC par les plasmocytes auto-réactifs, les LB ont un rôle pathogénique indépendant des auto-AC sécrétés. En effet, les souris transgéniques mIgM MRL lpr qui expriment uniquement une immunoglobuline (Ig) de membrane mais pas sa forme sécrétée, développent toujours une néphrite et une vascularite (Chan et al. 1999). De surcroît, les souris MRL lpr déficientes en LB affichent une réduction de l'activation du compartiment T en comparaison avec les souris contrôles (Shlomchik et al. 1994, Chan et al. 1998).

La déplétion des LB dans les souris lupiques MRL lpr améliore la protéinurie et la dermatite et réduit le titre d'auto-AC anti- nucléaire RF et anti-SM (Ahuja et al. 2007). Dans le modèle de souris NZB W F1 sensibilisées au pristane, la déplétion des LB avec un AC anti-CD20 concède également à une amélioration des taux de survie.

Par ailleurs, il fut récemment établi également un rôle protecteur des LB dans la physiopathologie du lupus, mis en évidence grâce aux thérapies de déplétion des LB dans les modèles murins (Haas et al. 2010). En effet, une déplétion des LB répétée toutes les 4 semaines

avec un AC anti-CD20 est efficace pour retarder le début de l'apparition de la maladie seulement lorsque ce dernier est administré chez des souris âgées de > 12 semaines. En revanche, lorsque cette déplétion est réalisée chez de jeunes souris âgées de 4 semaines, le début de la maladie est cette fois plus précoce et les souris présentent une baisse de survie. Cet effet serait imputé à la perte des Bregs B10 (Haas et al. 2010). Ces observations démontrent clairement le rôle complexe porté par les LB dans la pathogenèse du lupus avec une implication à la fois de sous-populations régulatrices et effectrices à des temps précis d'évolution de la pathologie. Il est intéressant de constater que les souris lupiques NZB/W F1 auto-immunes ont environ 4 fois plus de B10 à 10 semaines d'âge que des souris de type CD57BL/6 du même âge. Ces dernières n'étant, bien évidemment, non sujettes au développement d'une maladie auto-immune. Watanabe et collaborateurs en 2010 font la démonstration du rôle protecteur des B10 dans un modèle murin NZB/W F1 CD19 KO. Ces souris développent une maladie plus sévère que leurs homologues sauvages. La sévérité de la maladie est associée à une augmentation de la protéinurie, de la glomérulonéphrite et à une baisse globale de la survie des souris (Watanabe et al. 2010). De la même manière que dans les souris C57BL/6 CD19KO, les souris lupiques CD19 KO présentent un défaut en B10 avec un compartiment CD1d^{fort} CD5⁺ à peine détectable associé à une réduction de la transcription de l'IL-10 dans la population de LB splénique globale en comparaison aux souris lupiques contrôles. L'augmentation de la sévérité de la maladie dans les souris lupiques CD19 KO est particulièrement importante sachant que la déficience en CD19 diminue la production d'auto-AC considérée comme inductrice de la maladie lupique. Ainsi, bien qu'il y ait une baisse des auto-AC, le manque en B10 conduit néanmoins au développement d'une maladie plus agressive. Le transfert adoptif de LB spléniques CD1d^{fort} CD5⁺ de souris lupiques sauvages confère une protection de la maladie dans les souris lupiques KO en CD19 receveuses et

augmente la fréquence des Tregs (Watanabe et al. 2010). Ainsi, comme dans d'autres modèles auto-immuns, les LB joueraient un rôle pathogène et un rôle protecteur durant le lupus. Un schéma illustrant la dualité de fonction des LB avec d'un côté un rôle protecteur et de l'autre, pathogénique des LB dans la physiopathologie du LED est proposé en **Figure 2**.

2.5.1.2 Chez l'Homme

Plusieurs études cliniques ouvertes sur l'effet du rituximab dans le LED ont rapporté des résultats prometteurs quant à l'efficacité clinique de la déplétion des LB (Cambridge et al. 2006, Smith et al. 2006). Ces études réalisées sur de petites cohortes indiquent que l'amélioration clinique est associée à une déplétion des LB circulants tandis que la repopulation des LB prédit une rechute de la maladie. Les patients présentent une réduction des titres d'AC anti-ADN mais pas d'AC anti-microbiens ou anti-protéines de fixation de l'ARN (RBP), ce qui suggère que les AC anti-ADN sont préférentiellement générés par les plasmablastes à courte durée de vie (Tew et al. 2010).

Cependant, les résultats d'un essai clinique de plus grande envergure de phase II et III randomisée en double aveugle du rituximab, n'ont pas montré de différence significative dans la réponse clinique à la maladie par rapport au groupe placebo (Merrill et al. 2010). Les résultats insatisfaisants de cette thérapie pourraient tenir du fait que l'effet bénéfique attendu d'une déplétion des LB effecteurs est contrasté par la déplétion simultanée des Bregs (Jamin et al. 2008), dont nous savons qu'ils sont déjà moins nombreux et fonctionnellement défectueux à l'état basal dans le lupus (Blair et al. 2010, Gao et al. 2014), (Lemoine et al. 2011).

En effet, l'étude de l'équipe de Mauri en 2010 a mis en évidence une nouvelle anomalie impliquée dans la physiopathologie du LED, caractérisée par une baisse fonctionnelle des Bregs de phénotype CD24^{fort} CD38^{fort} chez les patients. Les auteurs montrent que la régulation par les

LB de la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT est déficiente chez les patients (Blair et al. 2010). Ils ont mis en culture des cellules mononuclées du sang périphérique stimulées durant 72h avec un AC anti-CD3, afin de mesurer les réponses IFN- γ et TNF- α des LT CD4⁺. Lorsqu'ils déplètent les LB CD24^{fort} CD38^{fort} de la culture, une fréquence élevée de TCD4⁺ IFN- γ et TNF- α ⁺ est observée chez les témoins sains, mais pas chez les patients et démontre que cet effet est partiellement IL-10 dépendant. En outre, les LB CD24^{fort} CD38^{fort} isolés des patients LED sont réfractaires à la stimulation CD40 et produisent moins d'IL-10 par rapport aux contrôles. Notre équipe montrera que cette déficience concerne également l'inhibition de la prolifération T (Lemoine et al. 2011).

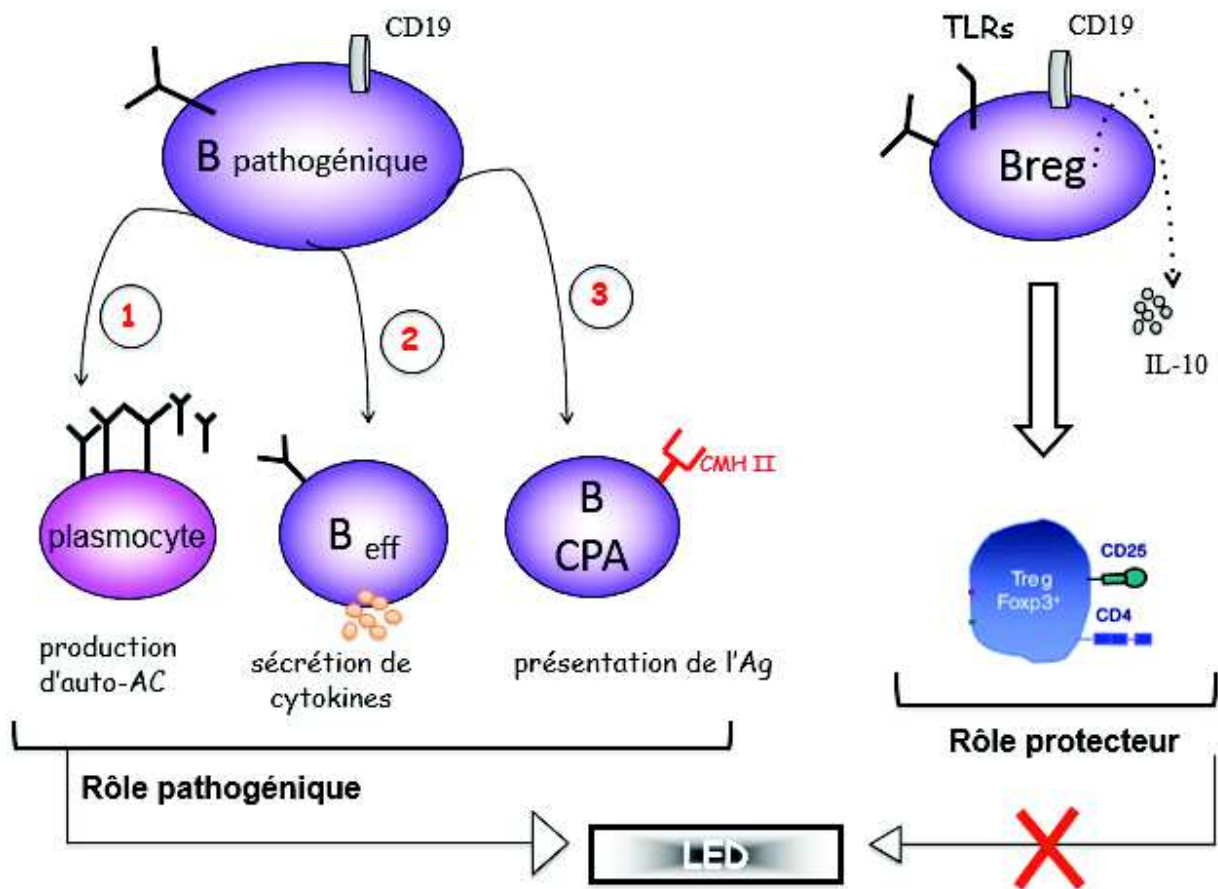


Figure 2 : Rôle protecteur et pathogénique des LB dans le lupus.

Des LB ont un rôle pathogénique dans le lupus via la production d'auto-AC par les plasmocytes auto-réactifs (**en 1**), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (**2**) et par la présentation d'auto-antigène (**3**). Des LB ont un effet protecteur, comme les Bregs producteurs d'IL-10, qui favorisent notamment l'activité des Tregs.

2.5.2 Origine du dysfonctionnement des Bregs dans le LED

Les LB des patients LED possèdent des caractéristiques bien décrites qui les distinguent des LB de témoins que ce soit l'homéostasie, le phénotype ou la fonction de ces cellules. Toutes ces caractéristiques finalement, peuvent être impliquées dans le défaut de la régulation B.

Du point de vu phénotypique, ce défaut Breg pourrait être dû à une baisse d'expression de certaines molécules sur les LB de LED comme CD72 et CD45 par rapport aux témoins sains. Il a été montré que CD72 est plus faiblement exprimée à la surface des LB de LED actif (Sun et al. 2005) et que les LB de souris développant spontanément un LED expriment faiblement la molécule CD72 (Nakano et al. 2007). Bien sûr, la contribution de ces molécules dans l'activité régulatrice B reste à déterminer. On peut toutefois rappeler que l'absence de ces corécepteurs inhibiteurs du BCR conduit à une absence de régulation et à une susceptibilité accrue à l'activation par leur BCR. A cela s'ajoute l'observation selon laquelle les LT des patients atteints de LED surexpriment le CD40L comparés aux témoins sains (Koshy et al. 1996). L'hypothèse serait donc que l'augmentation du signal du BCR couplé à la forte stimulation du CD40 pourrait conduire les LB lupiques vers un état d'hyper-activation incapables de revenir à un état régulateur. De plus, il a été montré que les LB des souris lupiques n'expriment que faiblement la molécule IL21R récemment décrite comme impliquée dans l'expansion des Bregs (Yoshizaki et al. 2012).

D'un point de vu fonctionnel, la démonstration du défaut des Bregs à inhiber la prolifération des LT pourrait s'expliquer par la déficience en Tregs. Notre équipe a précédemment montré que le mécanisme de régulation de la prolifération par les LB passe par l'induction de Tregs (Lemoine et al. 2011). Un argument en faveur de cette hypothèse vient d'une autre étude qui montre que les patients atteints de LED présentent moins de Tregs que les sujets

sains. Connaissant aujourd'hui l'importance des Bregs dans l'induction, l'expansion et le maintien des Tregs, leur réduction chez ces patients pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement des Bregs (Bonelli et al. 2008).

Enfin, autre possibilité, qui puisse expliquer ces observations, serait que le LT de LED soit résistant à l'inhibition exercée par les Tregs, comme suggéré par Venigalla en 2008 (Venigalla et al. 2008). Néanmoins, dans un modèle récent d'étude *in vitro* de la régulation B, cette même équipe exclut cette éventualité. En réalisant des cultures hétérologues, ils montrent que les LT de LED sont régulés efficacement par des Bregs provenant de témoins sains. Toutefois ce modèle d'étude *in vitro* est particulier, puisque les auteurs montrent que l'effet des Bregs ne passerait pas par l'induction de Tregs (Gao et al. 2014).

La comparaison entre les LB des patients LED et ceux de témoins sains indique que le défaut de production de l'IL-10 en réponse à une stimulation anti-CD40 serait dû à une altération de l'activation de STAT-3 (Blair et al. 2010). Ce défaut d'IL-10 pourrait expliquer l'absence de contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires (Lemoine et al. 2011).

Différents mécanismes d'actions ont été évoqués pour expliquer le bénéfice du rituximab dans le LED et dans d'autres maladies. On peut citer l'élimination des auto-AC, la restauration de la balance Th1/Th2, l'expansion des Tregs, la perturbation des tissus lymphoïdes ectopiques et une élimination des LB effecteurs des organes cibles (Eisenberg et al. 2005, Sfrikakis et al. 2005, Ng et al. 2007, Sanz et al. 2007, Stasi et al. 2008). Le travail de l'équipe d'Anolik suggère en outre que le bénéfice, au début tout au moins, ne peut être expliqué seulement par la réduction des auto-AC (Anolik et al. 2004, Looney et al. 2004) mais aussi par l'apparition de Breg.

De multiples altérations de l'homéostasie des LB sont rapportées dans le LED chez l'Homme. Les anomalies majeures observées dans la forme active de la maladie incluent : une

lymphopénie des LB naïfs, une relative augmentation des LB mémoires $CD27^+$ « switcher », une augmentation des « early Bm5 » avec une expansion des plasmablastes $CD27^{++}$ et une expansion des transitionnels T1. L'équipe d'Anolik a également mis en évidence l'expansion d'autres sous-populations LB notamment les B mémoires « switchés » $CD27^-$, des LB transitionnels T2 et T3. Ces importantes altérations des LB dans le sang périphérique des patients LED sont plus importantes lorsqu'on les compare avec d'autres maladies auto-immunes. Ceci reflète la nature du processus auto-immun avec des cycles fréquents d'activation, différenciation et un trafic entre les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et le tissu cible et influence probablement l'efficacité de la fonction régulatrice des LB.

De ce fait, cette disparité dans la distribution des sous populations LB peut également être un facteur important dans le LED. De manière intéressante, les patients qui ont reçu un traitement au rituximab présentent une augmentation du ratio $CD19^+CD24^{fort}CD38^{fort}$ / LB mémoires. Ce constat soutient la notion selon laquelle la déplétion des LB peut conduire à une augmentation des LB tolérogènes lors de la reconstitution du répertoire B (Anolik et al. 2007, Palanichamy et al. 2009). La repopulation avec des LB transitionnels est en effet associée à une rémission clinique soutenue et stable alors qu'une repopulation du compartiment B mémoires est associée à une faible réponse clinique. Ces observations sont confirmées par d'autres équipes et semblent pouvoir s'appliquer aussi à d'autres maladies auto-immunes dont la polyarthrite rhumatoïde (Anolik et al. 2009). De plus, on sait que c'est le compartiment LB mémoire activé $CD95^+ IgD^-CD27^-$ qui est corrélée avec l'activité de la maladie dans la SLE (Jacobi et al. 2008). Cette population LB mémoire activé pourrait représenter le produit d'un processus de différenciation extracellulaire aberrante des LB mémoires.

En conclusion, comme nous venons de le voir, les LB des patients LED possèdent des caractéristiques qui les distinguent des LB de témoins sains que ce soit l'homéostasie, le phénotype ou la fonction des LB. Toutes ces caractéristiques peuvent expliquer le défaut de régulation des LB des malades. Une question centrale nous interpelle particulièrement est de savoir quelle est la contribution de chacun de ces paramètres dans la physiopathologie de la maladie ? En d'autres termes, on peut envisager que c'est le dysfonctionnement de l'un de ces paramètres qui est véritablement à l'origine de tous les autres. De ce fait, restaurer la fonction régulatrice des LB des malades pourrait rétablir ou avoir des conséquences positives sur l'ensemble des caractéristiques du LB. Le prochain chapitre, sera consacré à l'étude d'un médicament immuno-modulateur, le Glatiramer acetate. Ce dernier a montré une capacité à activer la fonction Breg dans l'EAE et qui plus est à restaurer la production d'IL-10 dans les LB de patients atteints de sclérose en plaques.

LE GLATIRAMER ACETATE

3. Le Glatiramer acetate

L'acétate de glatiramère (COP-I, GA; Copaxone, marque déposée de Teva Pharmaceutical Industries Ltd) est un ensemble de polypeptides synthétiques résultant de la mise en présence et de l'association au hasard de quatre acides aminés constitutifs retrouvés dans la composition de la protéine basique de la myéline (MBP) à savoir : l'acide glutamique, la lysine, l'alanine et la tyrosine. La chimie du GA est étroitement liée à l'observation que les polymères polypeptidiques ont des activités biologiques diverses, notamment celle d'être antigéniques, c'est à dire, capables de stimuler une réponse immunitaire (Teitelbaum et al. 1974). Le développement du GA comme médicament de première ligne pour le traitement de la sclérose en plaque sous sa forme rémittente récurrente vient d'une étonnante et fortuite découverte (Arnon et al. 1996).

3.1 Sérendipité du Glatiramer acetate

La découverte du GA est le fruit d'un heureux hasard. Dans les années 1960, les Drs Sela, Arnon, et leurs collègues à l'institut Weizmann, Israël étaient impliqués dans l'étude des propriétés immunologiques d'une série de polymères et copolymères développés pour ressembler à la MBP (myelin basic protein), qui comme son nom l'indique est l'une des principales protéines constituant la myéline. L'injection de cette dernière avec un adjuvant complet de Freund à des souris, induit l'EAE, le modèle animal de référence pour l'étude de la sclérose en plaque chez l'Homme. A l'époque, leur objectif est d'évaluer si des polypeptides de synthèse peuvent mimer la capacité de la MBP et des fragments et régions de la molécule MBP à induire l'EAE (Teitelbaum et al. 1971, Teitelbaum et al. 1973, Teitelbaum et al. 1974)

Pour cela, ils composent 3 polymères ou copolymères contenant 4, 7 ou 12 acides aminés. Tous contiennent une quantité importante de lysine pour donner leur nature basique similaire à la MBP. Alors qu'ils effectuaient la synthèse des copolymères, le groupe a développé également en parallèle un processus simplifié de purification de la MBP bovine et ont montré que lorsqu'elle est combinée avec l'adjuvant complet de Freund, elle est un puissant inducteur d'EAE dans le cochon d'inde notamment. Les expérimentations sont réalisées sur des cochons d'Indes, auxquels ils administrent les copolymères séparément. Aucune des séries de polypeptides testés n'a permis d'induire l'EAE. Par contre, ils font une découverte fortuite pour le moins surprenante puisqu'à l'inverse de leurs suppositions de départ, plusieurs polypeptides ont été capables de supprimer l'EAE dans des cochons d'Indes accidentellement immunisés par la MBP d'origine bovine. Ainsi, le copolymère -1 connu plus tard comme l'acétate de glatiramère (GA), est celui qui a montré le plus d'efficacité dans la prévention ou la réduction de la sévérité de l'EAE. Il s'en est suivi une série d'expérimentations avec des résultats très encourageants et prometteurs. La suppression n'est pas restreinte à une espèce particulière, au type de maladie, ou encore à l'encephalitogène utilisé pour l'induction de l'EAE. Il faut préciser que cette découverte fortuite fut une vraie évolution car à cette époque aucun traitement de la sclérose en plaques (SEP) n'existait chez l'Homme (Bornstein et al. 1987), (Bornstein et al. 1982, Bornstein et al. 1984).

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire démyélinisante chronique, dont l'étiologie est toujours inconnue, affectant le système nerveux central (SNC) des jeunes adultes. La SEP affecte 2,5 millions de personnes dans le monde entier avec une prédominance chez les femmes (Wright et al. 1965, Staugaitis et al. 1998, van de Beek et al. 2003, De Santi et al. 2005). La SEP a des présentations cliniques hétérogènes: environ 85-90% des patients présentent une forme récurrente rémittente, une maladie à poussée et rémission (SEP-RR) tandis que 10-15%

ont une SEP progressive primaire (PPMS). Après 10-15 ans, la SEP-RR évolue souvent en une forme secondaire progressive, caractérisée par une perte des fonctions neurologiques qui ressemble à la PPMS, avec ou sans rechutes superposées. Le taux de rechute chez les patients atteints de SEP rémittente non traités est d'environ 0,5 par an (Toledano et al. 2015). Abramsky et collaborateurs (1977) sont les premiers à traiter un groupe de patients SEP-RR sévères avec le GA en intramusculaire avec 2 à 3 mg tous les 2-3 jours durant 3 semaines, puis chaque semaine durant 2-5 mois (Abramsky et al. 1977). Aucune conclusion ne fut dessinée concernant l'efficacité du médicament mais il ne présentait pas d'effets secondaires indésirables significatifs. Il s'en suivit 3 essais cliniques dans les années 80, qui apportent des preuves de son efficacité. Il sera approuvé par la FDA quelques années plus tard (Bornstein et al. 1987). Une étude clinique réalisée en 1987, en aveugle, avec deux groupes de patients présentant la forme SEP-RR ont reçu soit le COP-1, soit un placebo durant deux ans. La fréquence des poussées chez les patients traités fut réduite de 77 % et celle de la progression du handicap, diminuée de 58 % par rapport au groupe placebo. Ces résultats étaient donc très encourageants mais les difficultés techniques rencontrées dans la fabrication du COP-1 ont retardé de plusieurs années la réalisation d'une étude clinique de plus grande ampleur. Les résultats obtenus à cette époque doivent être interprétés avec prudence puisque avant 1991 la production du Glatiramer acetate n'était pas standardisée. Différents lots ont eu des effets suppresseurs variables sur l'EAE qui pouvaient aussi impliquer des effets variables chez les patients SEP. En 1991, un essai multicentrique de phase III avec une injection quotidienne de 20mg en sous cutanée d'une préparation de GA standardisée a débuté aux USA. Cette étude contrôle placebo en double aveugle a démontré que le GA réduit significativement le taux de rechute sans provoquer d'effets secondaires indésirables significatifs (Johnson et al. 1995). Bien que positifs, les résultats sont moins spectaculaires que

dans les premières études. Le bénéfice sur le plan des poussées a été de 30 % pour les patients traités par rapport au groupe placebo et de 28 % concernant la progression de la maladie. En 1996, le GA est approuvé par la FDA aux USA comme traitement destiné aux patients ambulatoires avec une forme active rémittente récurrente. Depuis le GA a été autorisé et approuvé dans de nombreux autres pays (Ziemssen et al. 2002).

Bien que la SEP soit considérée comme une maladie incurable durant plus d'un siècle, des avancées significatives ont été faites dans les options de traitement au cours de la dernière décennie. De nouveaux traitements ont montré une meilleure efficacité par rapport à la première génération de médicaments (Curtin et al. 2014, Inglese et al. 2015). Cependant, ils peuvent être accompagnés d'effets secondaires graves et mêmes mortels. En raison de son bon profil d'innocuité et de tolérance à long terme, le copaxone reste actuellement un médicament de référence administré en première ligne aux malades (Zvartau-Hind et al. 2002, Karussis et al. 2010, Boster et al. 2011, Boster et al. 2015, La Mantia et al. 2015).

3.2 Chimie et biodisponibilité du Glatiramer acetate

Le GA consiste en des sels d'acétate de polypeptides de synthèse. Avec une longueur moyenne de 45 à 100 acides aminés. Son poids moléculaire est en moyenne de 5000 à 9000 Da. Sa structure est représentée dans la **Figure 3** (Messina et al. 2013). La longueur du peptide et les séquences et succession d'acides aminés sont inconnus, générant un grand nombre d'épitopes actifs potentiel. Pour ces raisons le GA n'a pas un profil pharmacocinétique défini (Varkony et al. 2009), (Johnson 2010).

La Pharmacocinétique du GA n'a pas été totalement exploré chez les patients. On retrouve néanmoins des données limitées réalisées chez des contrôles sains et chez l'animal. Il a été montré qu'une fraction substantielle de la dose thérapeutique est hydrolysée localement. Les

fragments GA peuvent être reconnus par des AC réactifs au GA. Une certaine fraction du matériel injecté, soit intact ou partiellement hydrolysé, est supposée entrer dans la circulation lymphatique pour atteindre les ganglions lymphatiques régionaux tandis que d'autres peuvent entrer intact dans la circulation systémique (Messina et al. 2013). Des études réalisées chez des chiens recevant une injection en sous cutanée de 3mg /kg de GA ont montré que ce dernier est détecté dans le sang 5 à 10 min après son injection. Dans deux cas sur trois, les niveaux sériques reviennent au niveau de base après 6h. Une étude pilote réalisée dans le but de quantifier le GA dans le sérum chez l'Homme par une injection unique d'une dose supra thérapeutique de 60 mg à des volontaires sains (Messina et al. 2013) montre un niveau quantifiable de la molécule dans le plasma de 9 sujets sur les 17 volontaires testés. Chez les 9 sujets, le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale (Tmax) était entre 15 et 30 min excepté chez un sujet qui a présenté un second pic à 240 min. La concentration plasmatique maximale (Cmax) est de 69-605 ng/ml. La zone sous la courbe retrouvée chez les neuf sujets présente une large variabilité allant de 1,64 à 67,532 ng/ml. Chez tous les sujets, les niveaux du GA retournent au niveau initial 30-60 min post-injections. Chez quatre sujets, une quantité quantifiable de GA est détectée également à 240 min ou 360 min post-injection. A l'issue de 24h post-injection, les niveaux des fragments de GA immuno-reconnaissables dans le sérum de 15 sujets sur les 17 reviennent sous le seuil limite de détection de 25 -50 ng/ml (Messina et al. 2013). L'exposition après administration d'une seule dose ou de doses multiples de GA semble suivre le même résultat (Messina et al. 2013). Le GA est détecté principalement dans l'estomac, la thyroïde et plus faiblement dans le cerveau, possiblement en raison de sa nature hydrophile. Le GA est incapable de traverser la barrière encéphalique exerçant son effet sans doute exclusivement en périphérie (Carter et al. 2010).

Glatiramer acetate

4.7-11.0 kDa

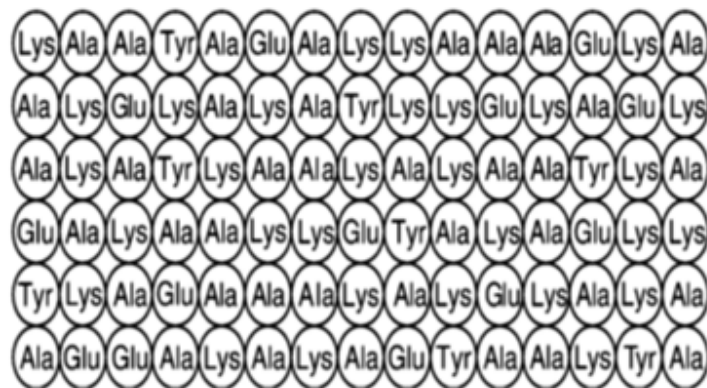


Figure 3 : Structure du Glatiramer acetate.

L'acétate de glatiramère est l'acétate d'un polypeptide synthétique composé de 4 acides aminés naturels : acide L-glutamique, L-alanine, L-tyrosine et L-lysine avec une fraction molaire moyenne de respectivement 0,129 - 0,153, 0,392 - 0,462, 0,086 - 0,100 et 0,300 - 0,374. Il se caractérise par une longueur moyenne de 45 à 100 acides aminés et un poids moléculaire moyen compris entre 5000 et 9000 daltons. Les séquences en acides aminés sont non définies et aléatoires, dont un exemple possible est présenté ici.

3.3 Mécanismes d'action du GA dans la SEP et l'EAE

Depuis sa découverte il y a quatre décennies et plus particulièrement depuis l'observation de son efficacité clinique à la fin des années 1980 et le début des années 1990, des progrès significatifs ont été réalisés permettant de comprendre les mécanismes d'actions du GA.

On pourrait scinder ces mécanismes d'actions en d'une part, des effets immuno-modulateurs par l'induction de cellules régulatrices et d'autre part, des effets neuro-protecteurs par l'induction de facteurs neuro-trophiques dans le SNC permettant la réparation-régénération neuronale. Les résultats des investigations sur les mécanismes d'actions du GA ont été extrêmement productifs au cours de la dernière décennie. Plusieurs études ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* chez la souris et chez l'Homme (Messina et al. 2013).

Dans cette partie, nous décrirons uniquement le volet immuno-modulateur du médicament. Le GA est capable de moduler de manière pléiotropique le système immunitaire inné et adaptatif. Nous verrons dans ce chapitre qu'aucune cellule du système immunitaire aussi bien inné qu'adaptatif n'est épargnée. Beaucoup peuvent être la cible directe du médicament ou être affectée de façon indirecte. Nous aborderons ici les principales études sur le GA et le LT avec toutes les sous populations qui le compose T CD4⁺, T CD8⁺, Th17, Th1 et Treg mais aussi les cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages ainsi que les cellules NK et bien évidemment les LB.

3.3.1 Modulation des LT CD4⁺

Le LT est une cellule clé de l'immunité adaptative dont le GA en module de nombreux aspects. Ainsi, une des toutes premières propriétés décrites du GA est sa capacité à interférer avec l'activation des TCR spécifiques de la myéline. Les LT réactifs à la myéline qui sont exposés à des doses croissantes de GA, présentent une inhibition de la prolifération et de la production d'IFN- γ dose dépendante. Une réponse proliférative est présente au départ mais diminue avec le temps en présence de GA. La baisse observée pourrait être la conséquence d'une induction de LT anergiques et d'une élimination clonale tels que certains auteurs le suggèrent (Schmied et al. 2003). Ce mécanisme d'induction d'anergie peut se produire en périphérie au niveau du site d'injection ou bien dans les ganglions lymphatiques drainants où les cellules spécifiques de la MBP peuvent être confrontées au GA. Une injection répétée quotidienne en sous cutanée de GA favorise l'induction de l'anergie (Comi et al. 2002). De plus, en se basant sur les observations suggérant qu'il agit comme un antagoniste au complexe MBP/CMH au niveau de l'interaction avec des TCR spécifiques de MBP, le GA opère comme une peptide ligand altéré à l'épitope 82-100 de la MBP *in vitro*, qui entraîne un déplacement de la MBP de son site de fixation sur la molécule de CMH (**Figure 4**) (Racke et al. 2010).

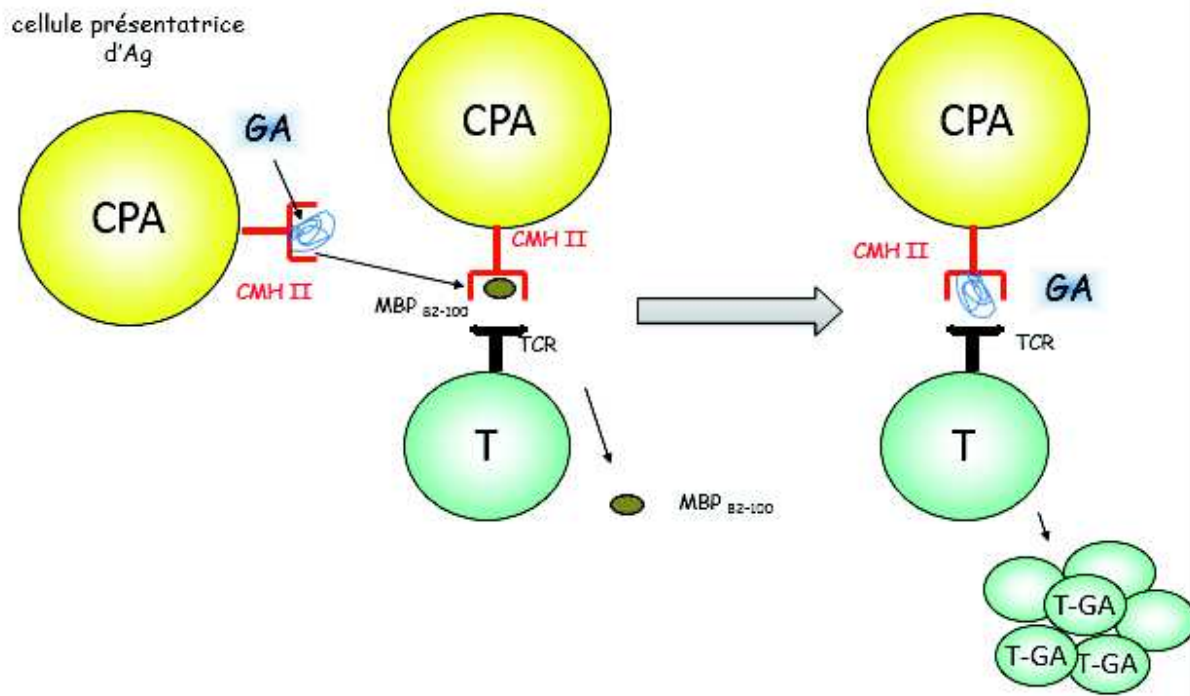


Figure 4 : Antagonisme entre le GA et la protéine MBP 82-100 pour le TCR.

Le GA entre en compétition avec les Ag dérivés de la MBP spécifiques pour le TCR en particulier l'épitope 82-100. Le GA entraîne ainsi un déplacement de la MBP de son site de fixation ou d'ancrage sur la molécule de CMH présente sur la CPA. Par ailleurs, étant donné les séquences aléatoires du GA et la présence d'acide aminés couramment utilisés comme sites d'ancrages au CMH et de contact au TCR, le GA serait un antigène universel capable d'interagir avec une grande diversité de LT et d'induire une forte prolifération T primaire mais transitoire.

Néanmoins, cet antagonisme vis à vis du TCR est sujet à controverse d'après certains auteurs qui indiquent qu'il est sans doute peu relevant *in vivo* dans la mesure où le GA n'atteint probablement pas les sites où il pourrait entrer en compétition avec la MBP. Pourtant, alors même que les LT réactifs au GA ne sont pas exposés à l'antigène de myéline MBP, ils possèdent des réactions croisées avec la MBP et le transfert adoptif des T-GA *in vivo* supprime l'EAE induite par une préparation de moelle épinière de souris (Aharoni et al. 1997).

De plus, les travaux de l'équipe de Farina montrent que les LT réactifs au GA peuvent traverser la barrière-hémato-encéphalique (BHE) et peuvent être activés non seulement par la MBP mais aussi par d'autres antigènes cross-réactifs (Neuhaus et al. 2000).

Cette réaction croisée avec d'autres neuro-antigènes a incité l'équipe de Duda à examiner l'hypothèse selon laquelle le GA serait un antigène reconnu par une importante fréquence de T naïfs. Elle en arrive à des observations pour le moins surprenante puisqu'elle montre que le GA a la capacité d'induire une réponse proliférative *in vitro* de cellules spléniques issues d'une variété de souche de souris, ainsi que de cellules mononuclées isolées du sang de cordon humain et du sang périphérique suggérant que le GA est un antigène pour une diversité de LT. (Duda et al. 2000, Duda et al. 2000, Carrieri et al. 2015).

Etant donné les séquences aléatoires du GA et la présence d'acide aminés couramment utilisés comme sites d'ancrages au CMH et de contact au TCR, Hafler et collaborateurs ont assigné au GA le terme d'antigène universel capable d'interagir avec une grande diversité de LT, induisant prolifération et réactions croisées avec d'autres antigènes peptidiques (Hafler 2002).

Ainsi, de la même manière qu'un antigène peptidique conventionnel, le GA se fixe sur les molécules du CMH et est reconnu par les LT via des TCR spécifiques de l'antigène. Puisque le GA est un mélange d'antigène peptidiques, une forte prolifération T primaire est induite même

chez des personnes non traitées saines (Duda et al. 2000), (Farina et al. 2001). L'équipe de Karandikar, pionnière dans le domaine des effets du GA sur les T CD8⁺, montre que cette prolifération peut concerner aussi bien les T CD4⁺ que les T CD8⁺ (Karandikar et al. 2002).

A la notion d'antigène universel du GA est associé le terme de peptide ligand altéré et de dégénérescence du répertoire TCR. En effet, chez les patients non traités, les LT réactifs au GA ont des propriétés phénotypiques d'un LT naïf (Wiesemann et al. 2001). Le traitement GA induit plusieurs changements *in vivo*. Il modifie le répertoire T réactif au GA en le diversifiant (Duda et al. 2000). Il réduit graduellement la réactivité proliférative des T CD4⁺ spécifique du GA probablement en induisant l'apoptose de certains LT (Ruggieri et al. 2006); (Duda et al. 2000); (Karandikar et al. 2002); (Farina et al. 2001, Wiesemann et al. 2003). Théoriquement, la baisse des LT réactifs au GA pourrait être due à l'induction d'anergie ou à la mort cellulaire induite par l'activation des LT spécifiques du GA (Farina et al. 2001). Globalement, toutes ces réponses sont uniques au GA, étant donné qu'en réponse à d'autres antigènes comme la toxine tétanique ou la tuberculine ces phénomènes ne sont pas relevés (Tennakoon et al. 2006); (Karandikar et al. 2002). Il est largement reconnu que le passage d'une réponse Th1 vers une réponse Th2 est protecteur dans des conditions inflammatoires (Romagnani 1999). L'une des principales caractéristiques fonctionnelles attribuée au GA est sa capacité à orienter les réponses LT d'un phénotype Th1 vers un phénotype Th2 (Miller et al. 1998, Duda et al. 2000, Neuhaus et al. 2000, Qin et al. 2000, Chen et al. 2001, Franciotta et al. 2003, Weder et al. 2005, Sanna et al. 2006). Une étude réalisée par l'équipe de Aharoni en 1997 a montré que les clones ou lignées LT induites par le GA se polarisent progressivement vers un phénotype Th2 jusqu'à ce que la lignée perde totalement sa capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Cette étude a écarté l'éventualité que les conditions de culture *in vitro* soient la cause de cette polarisation Th2

(Aharoni et al. 1997). Les modèles murins *in vivo* ont également montré cette déviation Th2 médiée par les monocytes et les cellules dendritiques, excepté dans deux études qui indiquent que malgré l'absence de deux cytokines clés Th2 IL-4 et IL-10, le GA a toujours un bénéfice dans la suppression de l'EAE (Aharoni et al. 1997) (Jee et al. 2006). Nous discuterons un peu plus loin et plus en détails de ce rôle indépendant des LT dans l'efficacité clinique du GA soutenus par les travaux Jee et Liu en 2006. La cellule Th2 spécifique du GA est capable de migrer dans le SNC et de supprimer localement l'inflammation (Arnon et al. 2004). Des études menées chez des patients atteints de SEP ont confirmé que l'injection quotidienne de GA favorise le développement de cellules Th2 caractérisées par une augmentation de la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 (Sanna et al. 2006) et (Chen et al. 2001). Chen en 2002 rapporte que cette polarisation Th2 est maintenue tout au long de la période de traitement (Chen et al. 2001). Pris dans leur ensemble, la plupart de ces études suggèrent que l'activité principale du GA est l'induction d'un changement de réponse Th1 pro-inflammatoire vers une réponse Th2. On ne sait toujours pas si les LT réactifs au GA migrent dans le SNC des patients SEP après un traitement au GA. Des données expérimentales préliminaires indiquent que des cellules Th2-GA peuvent survivre et être cultivées dans le liquide cérébro-spinal des patients SEP traités au GA (Ziemssen 2004). Dans l'EAE, les cellules Th2 réactives au GA sont retrouvées dans le SNC des souris (Aharoni et al. 2000, Aharoni et al. 2003). De plus, il a été montré que les LT Th1 et Th2 réactifs au GA sont capables de traverser une barrière sang cerveau artificielle *in vitro* (Kim et al. 2004, Kim et al. 2004). Comme nous l'avons brièvement évoqué plus haut, excepté sur les T CD4, le GA a également un effet non négligeable sur les T CD8 selon les travaux de l'équipe de Karandikar (Karandikar et al. 2002).

3.3.2 Modulation des LT CD8⁺

Le rôle des cellules T CD8⁺ dans la physiopathologie auto-immune a été à la fois peu étudié et controversé. Les cellules T CD8⁺ sont des cellules T prédominantes dans les lésions de SEP humaines et se caractérisent par leur expansion oligoclonale au site de la pathologie. Il est encore difficile de savoir si ces cellules sont à l'origine des réponses immunitaires pathogéniques ou au contraire des éléments de régulation de la maladie. Depuis plus de trois décennies, il fut supposé que la réponse au GA était limitée aux seules cellules T CD4⁺ et par conséquent les études mécanistiques de l'immunothérapie du GA se sont focalisées essentiellement sur les T CD4⁺. Néanmoins, une analyse de la prolifération par cytométrie en flux a permis d'apporter la première preuve directe qu'une réponse proliférative au GA est présente à la fois dans les LT CD4⁺ mais aussi dans le compartiment des LT CD8⁺ chez les donneurs sains comme chez les patients atteints de SEP (Karandikar et al. 2002). De plus, alors que les réponses des cellules T CD4⁺ sont comparables dans tous les groupes de patients, l'équipe de Karandikar démontre que les réponses T CD8⁺ sont significativement plus faibles chez les patients SEP non traités. Les auteurs montrent ainsi une augmentation des réponses T CD8⁺ au GA chez les patients SEP suite au traitement GA (Karandikar et al. 2002). Ils ont également découvert que les LT CD8⁺ induits possèdent des fonctions suppressives à la fois dans la SEP (Tennakoon et al. 2006) et dans l'EAE (Tyler et al. 2013). Fait intéressant, cette capacité suppressive est déficiente chez les patients SEP non traités et elle se trouve fortement augmentée chez les patients traités par le GA. Cette observation inédite suggère non seulement que l'effet immuno-modulateur du GA peut être médié par les cellules T CD8⁺ mais souligne également le rôle régulateur des cellules LT CD8⁺ spécifiques au GA dans le contrôle de la SEP. L'incapacité du GA à supprimer l'EAE dans des souris T CD8 déficientes (Tyler et al. 2013) est une preuve supplémentaire que les cellules T

CD8⁺ spécifiques du GA sont absolument indispensables à son effet thérapeutique. Les épitopes reconnus par ces cellules suppressives T CD8⁺ spécifiques du GA est l'une des données manquantes de l'équipe de Karandikar. Cette même équipe en 2013 montre également que cette fonction CD8⁺ suppressive spécifique peut être observée dès la 12^{ème} heure post-traitement chez les patients SEP (Ayers et al. 2013), suggérant que l'amélioration rapide passe par la prolifération et l'expansion de cellules préexistantes mais que par contre l'augmentation de la fonction suppressive qui se maintient jusqu'à 7 mois post-traitement pourrait être due à une seconde population de T CD8⁺ spécifique du GA induite par des cellules présentatrices d'antigènes devenues tolérogènes grâce au le GA.

Cette hypothèse s'appuie par les résultats d'une étude réalisée dans un modèle murin d'EAE dans lequel les T CD8⁺ supresseurs spécifiques du GA ne peuvent pas être générés lorsque les souris sont déficientes en IDO (Tyler et al. 2013). L'absence de LT CD8⁺ spécifiques suggère que l'expression d'IDO dans les cellules présentatrices d'antigènes tolérogéniques est clairement nécessaire à l'induction d'un effet régulateur T CD8⁺ spécifique au GA. De surcroît, le traitement au GA induit une augmentation significative des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang 3 mois après le début du traitement (Sinha et al. 2014).

Une piste intéressante à explorer serait de voir si la molécule IDO est augmentée dans ces cellules, ce qui pourrait expliquer la stimulation ensuite de la fonction suppressive dans les cellules T CD8⁺ spécifiques au GA. Karandikar et collaborateurs indiquent également que la fonction des cellules T CD8⁺ spécifiques du GA dépend de la présentation sur le CMH de classe I non classique (probablement Qa-1 chez la souris et restreintes au HLA-E chez l'Homme). À cet égard, les LT CD8⁺ supresseurs induits sont très similaires aux LT supresseurs / cytotoxiques CD8⁺ restreints au Qa-1 décrits dans les modèles murins. Ainsi, grâce aux études sur la SEP chez

l'Homme et à l'EAE, l'équipe de Karandikar a découvert deux nouvelles populations de cellules T CD8⁺ qui jouent un rôle immuno-régulateur indispensable dans la maladie. Avec d'une part des LT CD8⁺ «autorégulateurs» spécifiques du neuro-antigène restreints au CMH de classe Ia, et d'autre part, des LT CD8⁺ spécifiques au GA induits par le traitement GA restreints aux molécules HLA-E/ Qa1 (Sinha et al. 2014). Ces Treg CD8⁺ suppriment la prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁺ pathogènes lorsqu'ils sont stimulés par leur antigène spécifique. De même, ces Tregs TCD8⁺ suppriment de manière significative l'EAE lorsqu'ils sont transférés soit au moment de l'induction de la maladie ou bien au cours de la maladie. Ce mécanisme d'inhibition de la maladie provient au moins en partie d'un contact cellulaire et il est spécifique de l'antigène. Son action régulatrice passe par la modulation de la réponse des LT CD4⁺ mais également des cellules présentatrices de l'antigène par le biais d'une combinaison de fonctions cytotoxiques et d'une modulation médiée par des cytokines. L'équipe de Karandikar a considérablement contribué à la compréhension du mode d'action du GA. Une des interrogations actuelles de cette équipe est d'établir la raison pour laquelle de telles cellules TCD8⁺ spécifiques du SNC ne ciblent pas les oligodendrocytes qui sont théoriquement capables de présenter des antigènes de myéline dans le contexte des CMH de classe I.

3.3.3 Modulation des Tregs

Nous savons que la fonction des Tregs naturels est diminuée chez les patient SEP-RR en raison d'un déséquilibre entre les Tregs naïfs nouvellement générés co-exprimant le CD31 et les Tregs à longue durée de vie en périphérie (Haas et al. 2009). Des études ont examiné l'action immuno-modulatrice du GA sur la fonction Treg et leur fréquence. Elles montrent de manière intéressante que les thérapies à long terme avec le GA permettent une reconstitution des Tregs naïfs et une augmentation des Tregs totaux (Hong et al. 2005, Haas et al. 2009). L'expression

intracellulaire de PD-1 permet d'identifier des sous-populations de Tregs naïves dotées de capacités suppressives (Saresella et al. 2008). Brièvement, le PD-1 est retenu dans le compartiment intracellulaire dans les T naïfs jusqu'à la stimulation par un antigène qui favorise son expression en surface. Les Tregs PD1⁻ sont dotés d'une forte propriété suppressive et représentent la majorité des Tregs circulants en périphérie chez les individus sains. Les Tregs naïfs PD1⁻ et PD1⁺ ont été identifiés dans le liquide cébrospinal (CSF) et dans le sang périphérique des patients SEP-RR et chez les sujets contrôles sains. L'étude de Saresella a montré une augmentation des Tregs PD-1⁻ dans le liquide cébrospinal et le sang périphérique des patients SEP stables ainsi que chez les patients répondeurs à la thérapie par le GA en comparaison avec les patients non répondeurs.

Tandis que le niveau de Treg PD1⁺ est similaire dans tous les groupes analysés. De la même manière, le transfert adoptif de Treg purifiés issus de souris EAE traitées par le GA est plus efficace dans la prévention du développement de l'EAE que les Tregs issus des contrôles non traités (Saresella et al. 2008).

Un autre groupe a mis en culture des Tregs spécifiques au GA provenant de souris SJL traitées au GA (Stern et al. 2008). Ces lignées de Tregs sécrètent des niveaux importants d'IL-10 et d'IL-13 mais de faibles quantités d'IL-4, de TGF- β , d'IL-17, d'IL-6, d'FN- γ et de TNF- α . Leur phénotype est caractérisé particulièrement par l'absence du facteur de transcription Foxp3 et la présence de deux membres de la famille des TNFR, le CD30 et le GITR. Les lignées T prolifèrent spécifiquement en réponse à l'antigène GA immunisant mais ne sont pas spécifiques de l'auto-antigène MBP. D'autres études ont également montré que le GA induit la conversion des T CD4⁺ CD25⁻ en Treg CD4⁺CD25⁺ par l'activation du facteur de transcription Foxp3 (Hong et al. 2005). Ces études montrent une augmentation significative de Foxp3 après traitement au

GA chez les patients SEP qui présentent une réduction de l'expression de Foxp3 à l'inclusion avant traitement. L'expression de Foxp3 étant un marqueur important de l'activité régulatrice et suppressive des Tregs, l'étude de Hong révèle que les lignées T CD4⁺ CD25⁺ générées par la GA expriment des niveaux élevés de Foxp3, qui sont corrélés avec une augmentation du potentiel régulateur. L'étude de Pillai a par ailleurs mis en évidence que toutes les cellules CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ et CD8⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ peuvent atteindre un état CD25⁺Foxp3⁺ transitoire durant l'activation (Pillai et al. 2007). Cette étude suggère ainsi que l'expression de Foxp3 n'est pas caractéristique d'une lignée unique et stable de LT, mais reflète un état d'activation transitoire qui peut être atteint par tous les LT. Ce qui pourrait d'ailleurs expliquer l'absence de détection de Foxp3 dans certaines études sur le GA (Stern et al. 2008). Néanmoins, de nombreux travaux indiquent que le GA augmente la capacité suppressive des Tregs dans l'EAE et la SEP (Saresella et al. 2008).

Récemment, l'équipe de Kawamoto a mis en évidence un rôle des cellules dendritiques dans la génération de LT CD4⁺ Foxp3 CD25^{fort} par le GA (Kawamoto et al. 2013). L'équipe a montré que non seulement les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ou bien les cellules dendritiques spléniques en co-culture avec des LT naïfs CD4⁺CD25⁻ induisaient des LT CD4⁺ CD25^{fort} dont environ 25% sont Foxp3⁺ mais qu'en plus le nombre de ces cellules régulatrices doublait lorsque les cellules dendritiques sont prétraitées au GA. Les auteurs suggèrent qu'une stimulation des cellules myéloïdes par le GA, possiblement via des récepteurs de l'immunité innée, favorise la génération de Treg sans pour autant avoir identifié ce ou ces récepteurs. Une étude réalisée en 2012 chez des patients SEP a révélé une baisse des Tregs naturels CD3⁺ CD4⁺ CD25^{fort} CD127^{faible} et une augmentation significative des LT helper CD3⁺ CD4⁺ et des LT mémoires centraux CD3⁺ CD4⁺ CD45RO⁺ CCR7⁺ en comparaison avec des

témoins sains. Cette étude indique qu'après traitement au GA il y a une baisse des LT mémoires centraux avec une augmentation des LT suppresseurs $CD3^+ CD8^+ CD28^-$ tandis que la population Treg naturels reste inchangée (Praksova et al. 2012). Chez la souris, que ce soit dans l'EAE rémittente récurrente ou l'EAE chronique, le traitement GA conduit à une réduction drastique des cellules Th17 pro-inflammatoires associée à une augmentation des Tregs dans le système nerveux central (Begum-Haque et al. 2008). L'effet du GA n'est donc pas restreint aux populations Th2/Th3 versus Th1. Ainsi, plusieurs études ont démontré une influence également sur les cellules Th17.

3.3.4 Modulation des Th17

Dans l'article de Aharoni et collaborateurs en 2010, il a été montré que les LT ainsi que la microglie présentaient une expression extensive d'IL-17 au niveau du système nerveux central des souris EAE, tout particulièrement dans les régions de démyélinisation (Aharoni et al. 2010). Une étude antérieure réalisée en 2008 dans un modèle d'EAE induit par le peptide MOG, a montré qu'un traitement au GA à 1 jour après induction de l'EAE favorisait une augmentation de l'expression de l'ARNm Foxp3 et une réduction des Th17 (Begum-Haque et al. 2008). Les souris qui guérissaient après traitement GA, présentaient une réduction drastique de l'inflammation du système nerveux central associée à une diminution des cellules Th17 avec une augmentation concomitante de Tregs générés en périphérie qui s'accumulaient spécifiquement dans le SNC endommagé lorsque la maladie était exacerbée (Begum-Haque et al. 2008).

Il pourrait y avoir une origine commune des précurseurs des cellules Th17 et des Tregs (Bettelli et al. 2006). En effet, les T $CD4^+$ naïfs se différencient en Tregs s'ils sont activés seulement par du TGF- β , alors qu'ils se différencient préférentiellement en cellules Th17 en présence de TGF- β et de cytokines inflammatoires. La conséquence d'un traitement au GA

pourrait donc être expliquée par sa capacité à augmenter le taux de TGF- β et à abaisser le niveau de cytokines inflammatoires en périphérie ainsi qu'au niveau du système nerveux central (Aharoni et al. 2000, Aharoni et al. 2003). Le GA favoriserait ainsi la différenciation des LT vers une voie régulatrice. Ce qui est particulièrement important dans la mesure où de récentes études montrent que les Tregs peuvent se convertir en cellules Th17 pathogéniques dans un contexte de stimuli inflammatoires (Afzali et al. 2010) et (Zhou et al. 2009). Par exemple, Chen et collaborateurs en 2009, montraient de manière très intéressante que le GA réduisait la production d'IL-6 dans les monocytes CD14⁺ avec pour conséquence l'altération de la signalisation IL-6 dans les LT CD4⁺, empêchant ces derniers à se différencier en Th17. Ils montrent également une baisse de l'ARNm de ROR α , ROR γ dans les T CD4⁺ (Chen et al. 2009). De plus, ils démontrent que le GA via son action sur les monocytes est capable de réguler la différenciation et la survie des cellules Th17 dans le modèle murin d'EAE et dans un système *in vitro* chez l'Homme (Chen et al. 2009).

3.3.5 Modulation des cellules NK

Les cellules NK appartiennent au système immunitaire inné et représentent la première ligne de défense contre l'infection. Elles sont identifiées sur la base de l'expression de marqueurs de surface NK1.1 chez la souris et CD16 et CD56 chez l'Homme (Dalbeth et al. 2004). Les deux fonctions clés des cellules NK sont la cytotoxicité et la production de cytokines. Chacune médiée par deux principales sous populations qui peuvent se différencier l'une de l'autre par le niveau d'expression du CD16 et du CD56 (Jezewska et al. 1985). Les cellules NK CD56^{faible} CD16⁺ représentent environ 90% de la population NK totale. Elles lysent efficacement les cellules cibles et sécrètent des niveaux faibles d'IFN- γ . Par contre, les cellules NK CD56^{fort} CD16⁻ représentant environ 10% des NK totaux du sang sont enrichies dans les organes lymphoïdes secondaires et

des sites d'inflammation auto-immune (Jezewska et al. 1985). Les cytokines délivrées par ces NK influencent l'initiation et le développement des réponses immunitaires adaptatives (LT CD4⁺ et LB). Les fonctions des cellules NK doivent être régulées de manière fine afin de prévenir les dommages des tissus sains parce que les cytokines produites à tort pourraient favoriser une activation inappropriée du système immunitaire adaptatif. Des études rapportent une réduction de l'activité des cellules NK chez les patients SEP (Benczur et al. 1980); (Grunebaum et al. 1989, Flodstrom et al. 2002) ainsi que dans le modèle murin d'EAE (Zhang et al. 1997) (Matsumoto et al. 1998, Winkler-Pickett et al. 2008). La déplétion des cellules NK avant une immunisation des souris avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ conduit au développement d'une EAE rémittente cliniquement plus sévère (Zhang et al. 1997). Après activation, les cellules NK peuvent aussi réguler les fonctions effectrices des LT spécifiques de l'antigène en produisant des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β ou l'IL-10 (Laouar et al. 2005, Deniz et al. 2008).

Les cellules NK isolées des souris traitées au GA ont une capacité cytolytique augmentée contre les cellules dendritiques immatures et matures bien que le GA n'ait pas d'effet sur le nombre des cellules NK ou sur l'expression du marqueur d'activation CD69 (Al-Falahi et al. 2009). Ces observations sont également approuvées et soutenues par Sand et collaborateurs qui montrent que le GA augmente l'activité cytolytique des cellules NK vis à vis des cellules dendritiques immatures et matures dérivées de monocytes allogéniques et autologues. Le GA réduit le nombre de cellules dendritiques matures exprimant CD80, CD83, HLA-DR, ou HLA-I mais pas le pourcentage des cellules NK exprimant NKG2D, NK_{P30}, ou NK_{P44}. De plus, le GA inhibe *in vitro* la production d'IFN- γ mais augmente celle du TNF- α dans les NK (Sand et al. 2009). Là encore, le ou les récepteurs du GA à la surface des cellules NK restent méconnus.

3.3.6 Modulation des monocytes

Le GA favorise le développement de monocytes de type II qui sécrètent plus d'IL-10 et de TGF- β et moins d'IL-12 et de TNF- α . Ces monocytes de type II orientent la réponse T vers une différenciation Th2 et Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ indépendamment de la spécificité antigénique (Weber et al. 2007). Le transfert adoptif des monocytes de type II freine l'EAE, supprime le développement des cellules Th17, favorise la différenciation Th2 et l'expansion de Treg dans les souris receveuses. L'immunothérapie adoptive avec des monocytes de type II suggère un rôle pour ces cellules dans la modulation des LT dans l'auto-immunité (Weber et al. 2007). Ces monocytes de type II ont aussi un rôle équivalent chez l'Homme (Kim et al. 2004); (Weber et al. 2007). Ces études ne mettent pas seulement l'accent sur la balance Th2 induite par le GA mais démontrent également la contribution des monocytes de type II à l'effet protecteur du GA dans la SEP.

3.3.7 Modulation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques se distinguent en sous populations myéloïdes, lymphoïdes et plasmacytoides. Une étude réalisée dans un modèle d'EAE murin a montré que la population de cellules dendritiques myéloïdes CD11b⁺CD11c⁺CD45^{fort} purifiée à partir du système nerveux central de souris EAE malades, est la plus efficace dans la présentation d'antigène de myéline endogène pour activer les LT naïfs ou réactiver les LT effecteurs spécifiques de la myéline (Miller et al. 2007). Cependant, d'autres travaux montrent que les cellules dendritiques plasmacytoides permettent l'initiation des réponses Th17 induites par MOG dans l'EAE (Isaksson et al. 2009). Chez l'Homme, la sous-population myéloïde est également identifiée dans les lésions des patients SEP. Des cellules exprimant des marqueurs de cellules dendritiques matures sont toujours détectées dans l'inflammation des méninges et dans les contours péri-

vasculaires de la majorité des lésions actives de SEP (Serafini et al. 2006). Ces études suggèrent que les cellules dendritiques sont recrutées et subissent une maturation au niveau des lésions de la SEP où les antigènes du soi sont rendus disponibles par la destruction continue de la myéline. Cela pourrait contribuer à l'activation locale et à l'expansion de LT pathogéniques hypothétiques, indiquant l'importance des cellules dendritiques dans la pathogenèse de la SEP.

Le profil cytokinique des LT helper est souvent régulé par les cellules dendritiques. De nombreuses études rapportent également des effets modulateurs du GA sur la régulation des fonctions des LT par les cellules dendritiques. Dans une étude réalisée sur un modèle de rat Lewis, le GA augmente la production d'IL-10 et réduit la production de TNF- α dans les cellules dendritiques ainsi que dans les macrophages péritonéaux (Jung et al. 2004). Chez l'Homme, le GA module la production de médiateurs inflammatoires sans affecter la maturation des cellules dendritiques ou leur potentiel immuno-stimulateur. Les cellules dendritiques exposées au GA secrètent de faible niveau du facteur de polarisation Th1 IL-12p70 et de TNF- α , en réponse à une stimulation LPS et CD40L (Vieira et al. 2003). Cette baisse de cytokines est directement dépendante de la dose de GA utilisée. L'exposition des cellules dendritiques au GA durant la maturation ne diminue pas leur potentiel immunostimulant et permet à celles-ci d'induire la prolifération *in vitro* des LT naïfs. Ces résultats sont en adéquation avec l'acquisition d'un phénotype mature même en présence de GA. Cependant, contrairement aux cellules dendritiques non stimulées par le GA durant leur maturation qui induisent la prolifération des cellules Th1 productrices d'IFN- γ , celles qui sont exposées au GA induisent la prolifération de cellules Th2 productrices d'IL-4 et inhibent la génération de cellules Th1 IFN- γ . Cette balance Th1 vers Th2 sous l'effet du GA est dépendante des cellules dendritiques puisque le GA seul sur les LT n'induit pas cette polarisation Th2. Les auteurs ont suggéré que les cellules dendritiques sont des

cibles importantes des effets immuno-modulateurs du GA. L'une de leurs interrogations est de savoir comment cet effet sur des cellules dendritiques périphériques influence l'inflammation au niveau du système nerveux central (Vieira et al. 2003).

L'équipe de Liu s'est intéressée à cet aspect quelques années plus tard et apporte pour la première fois une mécanistique séduisante de ce médicament. Ils montrent qu'après injection sous cutanée, le GA est dégradé en périphérie et ne semble pas atteindre le cerveau dans sa composition complexe. Ils rapportent que le GA est apprêté par les cellules dendritiques au niveau périphérique et de cette façon peut être transporté vers le système nerveux central où il est libéré. L'interaction entre GA et cellules dendritiques augmente leur migration à travers la barrière hémato-encéphalique. Des fragments de GA sont ainsi progressivement libérés avec un pic à 24h, le GA pouvant rester dans la cellule jusqu'à 72h. Ils montrent également que les peptides GA libérés sont biologiquement actifs et bien que la concentration de GA atteignant le système nerveux central soit faible elle reste suffisante pour exercer un effet neuro-protecteur (Liu et al. 2007). Plus récemment, Begum-Haque et collaborateurs ont montré que le GA diminue l'expression de ROR- γ_t et d'IL-17. Parallèlement il y a une augmentation de la production d'IL-10 dans les cellules dendritiques de souris EAE. Le GA réduit également l'expression des TLR-4 et TLR-9 ainsi que de MyD88 dans le système nerveux central des souris EAE. L'expression des chémokines pro-inflammatoires y est également diminuée après traitement GA (Begum-Haque et al. 2013). Tous ces effets entraînent une moindre migration des cellules dendritiques vers le système nerveux central, expliquant le rôle protecteur du GA contre l'EAE.

3.3.8 Modulation au sein du Système nerveux central

L'activité immunologique du GA commence en périphérie bien que le médicament soit capable d'induire une modulation efficace dans le système nerveux central (Aharoni 2013). Son activité est médiée par l'activation des LT spécifiques du GA qui sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et de pénétrer dans le système nerveux central. L'équipe de Aharoni y a isolé de telles cellules chez des souris traitées au GA et les a localisées dans le cerveau, après les avoir transférées passivement en périphérie (Aharoni et al. 2000). Cette équipe montre également que le traitement GA par voie orale induit une accumulation de cellules sécrétrices d'IL-10 dans le système nerveux central des souris EAE, capable d'avoir des réactions croisées avec la protéine MBP (Aharoni et al. 2002). La réaction croisée des LT spécifiques du GA avec la protéine MBP peut expliquer la réactivation *in situ* et l'effet thérapeutique du GA dans les organes atteints de la SEP, bien que la molécule soit hydrolysée en périphérie. De plus, l'induction d'un milieu anti-inflammatoire dans le système nerveux central est assurée non seulement par les cellules LT spécifiques du GA mais aussi par les cellules résidentes comme les astrocytes et la microglie qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β (Aharoni et al. 2003). Enfin, l'activité thérapeutique du GA dans le système nerveux central est également soutenue par l'isolation de LT spécifique du GA dans le liquide céphalo-rachidien des patients SEP traités qui produisent de grande quantité des facteurs neurotrophiques comme les facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF pour Brain Derived Neurotrophic Factor) (Hestvik et al. 2008).

En conclusion, toutes les cellules immunitaires peuvent être potentiellement une cible directe du GA. Ce dernier a incontestablement plusieurs cordes à son arc et comme les cellules du système immunitaire sont intimement interconnectées, le GA peut initier un effet supprimeur sur une cellule et conduire à un effet « domino ». Un grand nombre de mécanismes d'actions sont désormais répertoriés et de nouveaux ne cessent de s'y ajouter (**Tableau2 et Figure 5**). Nous allons nous intéresser plus particulièrement dans le chapitre qui va suivre aux effets du GA sur les LB. Le LB fut durant longtemps négligé, peu documenté en comparaison avec les autres cellules du système immunitaire. Mais de nouvelles données vont renverser la donne et mettre le LB au cœur de la physiopathologie de la SEP et de l'EAE ce qui va permettre l'émergence de nouvelles investigations notamment les effets du GA sur les LB chez la souris et chez l'Homme.

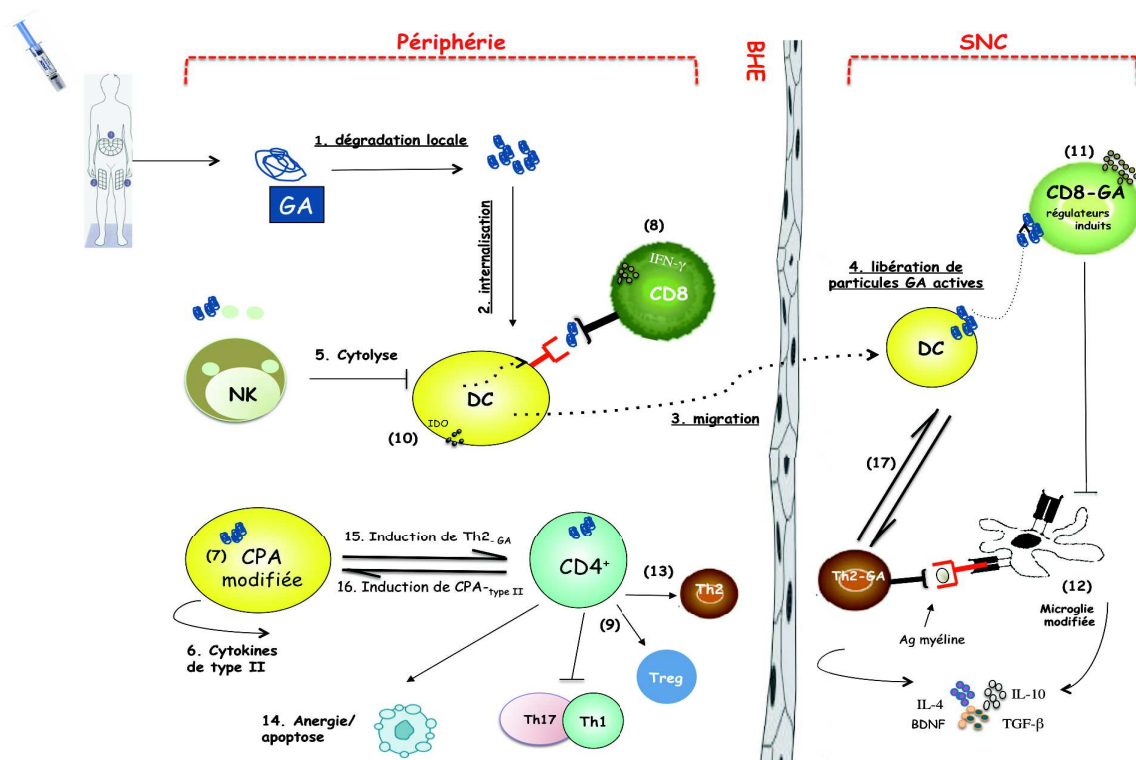


Figure 5 : Mécanisme d'action du GA

Après injection sous cutanée, le GA est dégradé en périphérie et ne semble pas atteindre le cerveau dans sa composition complexe. Le GA est apprêté par les DCs (2) au niveau périphérique. L'interaction entre GA et DC augmente la migration de ces dernières à travers la BHE (3), et vers SNC où le GA peut être libéré (4). Les peptides GA libérés sont biologiquement actifs et bien que la concentration de GA atteignant le SNC soit faible elle reste suffisante pour exercer un effet neuro-protecteur. Le GA augmente l'activité cytolytique des cellules NK (5) vis à vis des DCi et DCm. Le GA favorise le développement de monocytes de type II (6) qui sécrètent plus d'IL-10 et de TGF-β et moins d'IL-12 et de TNF-α. Ces monocytes orientent vers une différenciation cellulaire Th2 et Treg indépendamment de la spécificité antigénique (7). La thérapie GA restaure l'expression d'IFN-γ par les T CD8⁺ (8). Le GA augmente le taux de TGF-β et abaisse le niveau de cytokines inflammatoires en périphérie (9) favorisant ainsi la différenciation des cellules Th1 et Th17 vers une voie régulatrice Tr1 et Treg. Le GA augmente la production d'IL-10 et réduit la production de TNF-α dans les DC. Le GA induit la production d'IDO (10) dans CPA tolérigènes permettant d'induire une fonction régulatrice des T CD8⁺ spécifiques du GA (11). L'induction d'un milieu anti-inflammatoire dans le SNC est assurée non seulement par les cellules LT spécifiques du GA mais aussi par des cellules résidentes comme les astrocytes et la microglie (12) qui sécrètent sous l'effet du GA plus d'IL-10 et de TGF-β. Le GA a la capacité d'orienter les réponses LT d'un phénotype Th1 vers un phénotype Th2 (13). La baisse des LT réactifs au GA pourrait être due à l'induction d'anergie ou à la mort cellulaire induite suite à l'activation des LT spécifiques du GA (14). Une boucle de contrôle positive peut s'établir en périphérie avec d'un côté les monocytes type 2 qui induisent des cellules Th2 et de l'autre, les cytokines anti-inflammatoires dérivées des cellules Th2 spécifiques du Ga qui induisent les monocytes type 2 (15). Théoriquement une boucle similaire peut se développer dans le SNC (16), puisque des cellules Th2 peuvent produire des facteurs anti-inflammatoires qui potentiellement sont capables d'orienter la microglie like-APC en phénotype de type 2. (BHE : Barrière Hémato-Encéphalique)

CIBLES	EFFETS	REFERENCES
COMPLEXE CMH II	Liaison de forte affinité à de nombreux allèles HLA-DR	<i>Fridkis-Hareli et col. 1994</i>
	Déplace l'antigène MBP de son site de fixation sur le CMH-II.	<i>Aharoni R, et col., 1999</i>
LYMPHOCYTES T	Antagonisme du TCR à l'épitope MBP ₈₂₋₁₀₀ .	<i>Aharoni R, et col., 1999</i>
	Suppression de la prolifération des lignées T-MBP et réduction de la prolifération des T CD4 ⁺ spécifiques du GA.	<i>Gran B. et col., 2000; Ragheb S. et col., 2001</i>
	Déviation de la réponse Th1 vers une réponse Th2	<i>Gran B. et col., 2000; Aharoni R et col., 2003; Duda PW et col., 2000; Neuhaus O et col., 2000</i>
	Phénomène de «Bystander suppression».	<i>Aharoni R, et col., 1998</i>
	Induction de T régulateurs/ suppresseurs CD4 ⁺ et CD8 ⁺ .	<i>karandikar et col., 2002; Tennakoon et col., 2006; Hong J. et col., 2005</i>
	Augmentation de la production d'IL-5 et d'IL-13.	<i>Wiesemann E et col., 2001</i>
	Anergie, délétion et apoptose des T CD4 ⁺ <i>in vitro</i> .	<i>Raheb et col., 2001, Reiks M., et col. 2003</i>
	Inhibition de la prolifération Th17 dans l'EAE.	<i>Begum-Haque et col. 2008</i>
CELLULES NK	Augmentation de l'activité cytolytique vis à vis des DC autologues et allogéniques.	<i>Sand KL et al. 2009</i>
CELLULES DENDRITIQUES	Réduction ou inhibition de la maturation cellulaire.	<i>Stasiolek M. et col., 2006</i>
	Réduction du potentiel stimulateur des LT	<i>Sanna A. et col., 2006; Vieira PL. et col., 2003</i>
	Augmentation de la production d'IL-10.	<i>Jung S. et col., 2004; Vieira PL. et col., 2003</i>
	Résultats controversés sur l'induction d'une production de TNF- α	<i>Li Q et col. 1998, Jung S. et col. 2004</i>
	Baisse de la production d'IL-12.	<i>Vieira PL. et col., 2003</i>
MACROPHAGE, ASTROCYTES, MICROGLIES	Baisse de la production de l'IL-12 et de TNF- α .	<i>Sanna A. et col., 2006</i>
	Augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β .	<i>Aharoni R. et col., 2003</i>
	Inhibition de l'activation des cellules de la microglie.	<i>Chabot S. et col. 2002</i>
MONOCYTES	Réduction du potentiel d'activation.	<i>Weber MS. et col. 2004</i>
	Augmentation de la production d'IL-10 et d'IL-4.	<i>Jung S. et col., 2004</i>
	Inhibition de la sécrétion de TNF- α <i>in vitro</i> .	<i>Li Q et col. 1998/ Carpintero R. et col., 2011</i>
LYMPHOCYTES B	Augmentation de la synthèse d'IL-10 et réduction de CD80 et CD86 et augmentation de CD5.	<i>kala et begum hacque 2010, Begum-hacque et col. 2011</i>
	Induction d'AC potentiellement bénéfiques IgG ₄ non neutralisants.	<i>Teitelbaum D. et col., 2003</i>
	Baisse des récepteurs aux chémokines.	<i>Begum-Haque S. et col., 2011</i>
NEURO-PROTECTION	Augmentation de la sécrétion de facteurs neuro-trophiques (BDNF, NT-3/4) et réduction des lésions neuronales.	<i>Ziemssen T. et col., 2002, Aharoni R. et col., 2005</i>

Tableau 2 : Mécanismes d'action du Glatiramer Acetate.

**G LATIRAMER ACETATE ET LB:
DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE
A L'HOMME**

4. Glatiramer Acetate et Lymphocytes B: de l'approche expérimentale à l'Homme

Initialement, la grande majorité des données publiées concernant le mode d'action du GA, étaient orientées essentiellement sur la capacité du médicament à moduler directement ou par l'intermédiaire des cellules immunitaires innées la réponse des LT. A l'inverse, le rôle joué par les LB dans l'efficacité clinique du GA restera longtemps négligé. Les quelques études réalisées chez l'Homme se limitent essentiellement à la fonction humorale du LB. Les autres dimensions du LB resteront longtemps peu documentées. Toutefois, face à l'importance de plus en plus grandissante du LB dans l'immuno-pathogenèse de la SEP et tout particulièrement dans le contrôle et la guérison de la maladie, des publications portant sur d'autres aspects du LB connaissent un plein essor depuis ces 5 dernières années.

Dans cette partie, nous allons donc aborder en premier lieu les travaux faisant état de l'implication incontestable du LB dans l'EAE et la SEP. Avec la découverte majeure du rôle des Bregs dans l'EAE chez la souris et notamment de leur déficience dans la SEP.

Puis, successivement nous traiterons de l'influence du GA sur la réponse humorale et sur la réponse cellulaire B, cette dernière étant étroitement liée à la fonction Breg (Begum-Haque et al. 2011), (Begum-Haque et al. 2010, Kala et al. 2010).

4.1 Place du LB dans la physiopathologie de la SEP

Il est largement admis aujourd'hui la dimension essentielle du LB dans la pathogenèse de la SEP et de l'EAE, d'abord par sa fonction humorale mais également par son activité effectrice cellulaire (Duddy et al. 2006) (Lanzavecchia 1987) (Molnarfi et al. 2013). La fonction humorale est portée par les plasmocytes. Ces derniers sont responsables de la production des auto-AC

dirigés contre les neuro-antigènes. Par exemple, des auto-AC dirigés contre la protéine MBP sont détectés dans le sérum des patients SEP (Hedegaard et al. 2009). Ces Auto-AC auraient un rôle dans le phénomène de démyélinisation dans plus de 50% des cas (Breij et al. 2008) (Lassmann 2010). La SEP est également caractérisée par la production d'Igs intrathécales et par le dépôt de ces dernières dans les lésions inflammatoires (Pachner et al. 2007). Par ailleurs, dans un modèle murin, il est démontré par l'injection d'ACs anti-MOG que ces auto-AC aggravent drastiquement la sévérité de la maladie, l'inflammation et la démyélinisation (Urich et al. 2006).

Par ailleurs, un rôle fonctionnel des LB indépendant de la production d'AC dans l'EAE est désormais bien établi grâce à de multiples travaux. En effet, les LB sont reconnues comme des cellules présentatrices d'antigènes qui sont présentes en grand nombre dans la circulation périphérique par rapport aux cellules dendritiques. D'après Yan et collaborateurs, les LB sont les premiers à capturer et à présenter des auto-protéines à des cellules T auto-réactives avant la présentation antigénique par les DC (Yan et al. 2006).

D'ailleurs selon Lanzavecchia, les LB seraient plus efficaces comme cellules présentatrices d'antigènes que les cellules dendritiques (Lanzavecchia 1987).

D'après l'étude réalisée par Betteli et collaborateurs, plus de 50% des souris transgéniques avec un TCR et un BCR spécifiques de MOG présentent une démyélinisation contre seulement 5% dans les souris transgéniques ayant uniquement le TCR spécifique de MOG. L'antigène potentiellement présenté par les LB est associé aux molécules du CMHII. En absence de molécules de co-stimulations telles que CD80 et CD86, il est constaté une insensibilité spécifique des LT à une activation efficace (Schwartz 2003, Fife et al. 2006), (Seamons et al. 2006). D'ailleurs, certaines études indiquent qu'un défaut d'expression de CD80 et CD86 entraîne une atténuation de l'EAE chez la souris (Chang et al. 1999, Chang et al. 2003).

Hormis ces aspects humoraux et cellulaires du LB effecteur, une fonction inédite dite régulatrice du LB a émergé ces 20 dernières années. Cette fonction fut mise en évidence pour la première fois grâce à des modèles murins d'EAE. Les souris déficientes en LB ou en CD19 développent une EAE non rémittente sévère (Dittel et al. 2000), (Wolf et al. 1996, Hjelmstrom et al. 1998). Aujourd'hui on sait, grâce à de nombreuses études, que ce sont des LB dotés de propriétés régulatrices qui contrôlent et favorisent la guérison de l'EAE et de la SEP (Wolf et al. 1996, Hjelmstrom et al. 1998, Fillatreau et al. 2002, Duddy et al. 2007, Matsushita et al. 2008, Yanaba et al. 2008), (Matsushita et al. 2008, Yanaba et al. 2008).

La preuve ultime de l'existence d'une dualité entre un rôle pathogène et un rôle protecteur du LB dans la physiopathologie de la SEP fut incontestablement apportée par les expérimentations de déplétion par le Rituximab dans l'EAE. Le Rituximab est un AC monoclonal qui provoque une déplétion sélective des LB CD20⁺. En fonction du moment de la perfusion du Rituximab, la déplétion des cellules B périphériques réduit ou au contraire augmente la sévérité de l'EAE d'après les travaux de l'équipe de Tedder. De plus, l'issue d'une telle déplétion LB serait conditionnée par l'état d'activation dans lequel le LB se trouve selon les travaux de Weber. Ces deux études apportent un éclairage fort intéressant de la subtilité et de la complexité de ce phénomène. Dans un modèle d'EAE induit par le peptide MOG_{p35-55}, Tedder et collaborateurs montrent que la déplétion des LB avant induction de la maladie aggrave significativement celle-ci tandis qu'une déplétion après immunisation par le peptide MOG en réduit au contraire la sévérité. De façon très élégante, ces auteurs imputent l'exacerbation à l'absence de production d'IL-10 par les Bregs. Ces observations conduisent à conclure que, bien que protecteurs en phase précoce de la maladie, à un stade plus avancé, les LB ou tout au moins une sous population de LB exercent un rôle effecteur responsable de la progression clinique de la maladie (Bouaziz et al. 2008,

Matsushita et al. 2008). De nouvelles données indiquent que les Bregs producteurs d'IL-10 *in vivo* présentent une période transitoire de production d'IL-10. Plus étonnant encore, ces cellules se différencient dans un second temps en plasmablastes régulateurs qui redeviennent dès lors les principaux acteurs protecteurs de la maladie en devenant la source principale d'IL-10. A la lumière de ces nouvelles données, on peut aisément expliquer l'effet protecteur d'une déplétion tardive des LB. En effet, cette déplétion thérapeutique va neutraliser les LB effecteurs pathogènes CD20⁺ présents, tout en préservant la fonction protectrice puisqu'elle est dès lors assurée par les plasmablastes CD20^{faible} (Maseda et al. 2012).

Selon Weber et collaborateurs, l'issue clinique d'une déplétion en LB ne serait pas conditionnée par le moment de perfusion mais plutôt par l'état d'activation des LB et leur spécificité antigénique. En effet, dans leur étude les auteurs distinguent deux modèles d'EAE. Le premier est un modèle induit par la protéine recombinante MOG et le second est un modèle induit par le peptide MOG_{P35-55}. L'établissement de l'EAE dans le premier modèle serait dépendant des LB effecteurs, tandis que dans le second modèle serait indépendant des LB effecteurs. Cette distinction est majeure et se base sur la capacité des LB à être activés uniquement par la protéine MOG grâce à une étape d'internalisation avant sa présentation sur le CMHII. En revanche, le peptide MOG_{P35-55} pouvant être chargé directement sur le CMHII sans internalisation n'occasionne pas d'activation des LB. Ainsi, dans le modèle d'EAE induit par le peptide MOG_{P35-55}, les LB n'étant pas activés, l'issue de la déplétion est irrémédiablement une exacerbation de la maladie puisque c'est le reflet d'une déplétion des LB naïfs à potentiel régulateur. Dans le modèle induit par la protéine recombinante MOG, l'issue de la déplétion au stade tardif est une amélioration du score clinique de la maladie qui est le reflet d'une déplétion des LB effecteurs activés suite à l'immunisation. La déplétion B reflète l'inhibition de leur fonction cellulaire pro-

inflammatoire. Bien que les deux auteurs n'emploient pas des protocoles expérimentaux identiques, ces deux études sont complémentaires et non contradictoires et permettent réellement de comprendre la place du LB dans l'EAE. Après induction de la maladie par la protéine MOG, les LB sont activés et leur élimination conduit donc à une amélioration de la maladie. A ce stade, la proportion de LB effecteurs activés prédomine et représente la cible du Rituximab tandis que les Bregs existants se différencient en plasmocytes régulateurs de profil CD20^{faible} seraient donc potentiellement réfractaires à la déplétion anti-CD20.

Chez l'Homme, une déplétion des LB par le Rituximab chez les patients atteints de SEP est à ce jour le traitement le plus efficace selon Hauser (Hauser et al. 2008). Les auteurs montrent une réduction des lésions de démyélinisations, évaluées sur un scan d'IRM du cerveau (Hauser et al. 2008, Hawker et al. 2009). Bien que prometteuses, des études de reconstitution révèlent que les anomalies qualitatives et quantitatives des LB réapparaissent avec le temps après la fin du traitement. Ainsi, en comparaison avec les LB de témoins sains, les LB naïfs des patients SEP présentent une réduction de leur capacité de production d'IL-10 (Duddy et al. 2007). De plus, ce traitement thérapeutique anti-CD20 reste non approuvé et la sécurité à long terme n'est pas encore clairement établie.

4.2 Glatiramer acetate et réponse humorale

Etant une thérapie basée sur l'utilisation d'un antigène, le GA induit des AC anti-GA. Le GA, un mélange de peptides de synthèse aléatoire, est doté d'une grande diversité de séquences possibles. Il a donc tout le potentiel pour susciter des AC cross-réactifs. Dans ce contexte, plusieurs auteurs ont analysé les réponses Ig chez les patients SEP traités au GA (Brenner et al. 2001), (Farina et al. 2002), (Salama et al. 2003, Teitelbaum et al. 2003, Karussis et al. 2010, Bomprezzi et al. 2011).

L'équipe de Brenner montre que les patients qui ne présentent pas de rechute à 18-24 mois de traitement ont statistiquement un titre AC anti-GA plus élevé que ceux qui développent des rechutes, suggérant que ces AC anti-GA pourraient être protecteurs. Ces patients développent des IgG₁ et secondairement des IgG₂ mais pas d'IgM ni d'IgE (Brenner et al. 2001).

Les données apportées par Ure et collaborateurs en 2002 confortent ces observations. Ils suggèrent que les AC spécifiques au GA pourraient influencer favorablement la re-myélinisation dans un modèle d'EAE (Ure et al. 2002) et proposent même que les AC anti-GA puissent mimer les effets des IVIg bien qu'à une plus petite échelle.

Farina et son équipe à la même année, examineront un panel plus large de sous-classes d'IgG, notamment les IgG₄ et les IgG₃. L'étude révélera que 18 patients sur 20 traités au GA développent un titre faible mais significatif d'AC anti-GA de sous-classe IgG₄. A noter que la durée du traitement dans l'étude de 0,5 à 48 mois est très variable entre les 20 patients SEP. Cette forte variabilité ne permet pas de faire une interprétation claire des résultats. En effet, l'étude de l'équipe de Brenner en 2010 met en évidence une distinction de la réponse AC anti-GA chez les patients traités depuis moins de 2 ans et les patients sous traitement depuis plus de 2 ans. Il montre une évolution de la réponse isotypique dans le temps, avec un shift IgG₁ et IgG₂ vers une réponse principalement IgG₄. Les IgG₂ sont très faibles après 2 ans de traitement alors qu'ils sont très élevés chez les patients sous thérapie depuis moins de 2 ans. Il est bien admis que les cellules Th2 sont associées à une réponse IgG₄ prédominante alors que les cellules Th1 sont davantage reliées aux IgG₁ (Conti-Fine et al. 2006). Ces résultats peuvent être mis en relation avec le phénomène de balance Th1 vers Th2 apporté par le GA.

Une augmentation significative et soutenue des titres AC IgG₄ spécifiques du GA est observée chez les patients SEP à 9 mois de traitement (Basile et al. 2006, Bar-Or et al. 2009).

Les résultats de l'équipe de Brenner indiquent que l'efficacité clinique d'une thérapie par le GA pourrait être associée à une baisse des IgG₂ anti-GA chez les patients traités depuis plus de deux ans. Les AC d'isotype IgG₄, n'activant pas la voie du complément et ayant une faible affinité des récepteurs membranaires à la phagocytose, représentent probablement les IgG les moins pro-inflammatoires (Lucisano Valim et al. 1991). Il est donc tout à fait envisageable que ces IgG₄ anti-GA aient un impact sur l'effet thérapeutique du GA (Karussis et al. 2010). L'équipe de Kala retrouve une hétérogénéité importante dans la réponse AC chez les patients SEP traités au GA mais sans association entre réponse AC et réponse clinique. Sachant que la cytokine IL-10 est connue pour être associée à la commutation isotypique des IgG vers IgG₄ dans les plasmocytes (Jeannin et al. 1998), l'équipe de Kala suggère que le GA pourrait jouer un rôle important dans cette commutation isotypique en induisant la production d'IL-10 par diverses cellules immunitaires (Bomprezzi et al. 2011). Il est substantiel de noter que les AC réactifs au GA n'interfèrent pas avec l'activité biologique du GA *in vivo* et *in vitro* (Teitelbaum et al. 2003). De plus, les AC spécifique du GA obtenus à partir de sérum de patients SEP n'inhibent ni la prolifération ni la sécrétion de cytokines Th2 des clones T spécifique du GA. Des études qui incluent plusieurs essais cliniques ont rapporté que tous les patients traités au GA développent des AC réactifs qui déclinent après 6 mois de traitement. Ce taux reste faible mais toujours au dessus de la valeur de base (Brenner et al. 2001).

4.3 Effet du Glatiramer acetate sur les lymphocytes B

La première étude faisant état d'un rôle joué par les LB remonte à 1995. Une équipe a montré en culture *in vitro* que le GA inhibe la prolifération de lignées T spécifiques en réponse à l'antigène de MBP. Cet effet passe par une lignée particulière de LB transfectés par le virus EBV jouant le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Cette lignée est prétraitée durant 3 jours avec 25 µg/ml de GA avant les 3 jours de co-culture avec les LT (Milo et al. 1995). Les auteurs enregistrent également une inhibition de la production d'IFN- γ dans la co-culture en présence de GA et de MBP (Milo et al. 1995). Bien que non interprétées ainsi, ces observations représentaient déjà une ébauche possible de la fonction Breg sous l'influence du GA.

4.3.1 Chez la souris

C'est bien plus tard que l'équipe de Kala en 2010 testera l'hypothèse selon laquelle les LB contribuent à l'effet protecteur du GA dans l'EAE, indépendamment de la capacité de ces cellules à produire des AC. Cette équipe a traité des souris avec le médicament durant 7 jours consécutifs. Les LB isolés de ces souris produisent davantage d'IL-10 mais des concentrations similaires d'IL-4 et de TGF- β par rapport aux souris contrôles. Ces LB ont une capacité plus faible à stimuler l'expansion des LT réactifs au peptide MOG *ex vivo* (Kala et al. 2010). L'étude du phénotype des ces LB isolés montre une réduction de l'expression des molécules de co-stimulations CD80 et CD86. L'antigène présenté par les LB est associé aux molécules CMHII mais l'absence des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 induit une insensibilité spécifique des LT plutôt qu'une activation (Schwartz 2003, Fife et al. 2006), (Seamons et al. 2006). Il est possible que le GA agisse sur les LB en altérant l'expression des molécules CD80, CD86 et également CMHII. Ce qui pourrait inhiber l'expansion des LT auto-réactifs dans la mesure où les

LT recevant seulement une stimulation TCR associée à des signaux de co-stimulation insuffisant pourraient devenir anergiques (Schwartz 2003).

D'autre part, les auteurs montrent que le transfert adoptif de LB issus de souris EAE traitées au GA supprime l'EAE dans les souris receveuses. Les auteurs enregistrent une inhibition de la prolifération des LT auto-réactifs et des réponses Th1 et Th17, tout en favorisant la production d'IL-10 dans les souris receveuses et mettent ainsi en évidence le rôle prépondérant des LB dans la régulation de l'EAE en présence de GA (Kala et al. 2010).

Une étude indépendante réalisée par l'équipe de Begum-Haque et collaborateurs (2010) a montré que les souris traitées au GA présentent une augmentation de la prévalence des LB CD19⁺ exprimant le CD5, un marqueur des cellules Bregs (B10). Ils ont également montré que les LB issus de souris immunisées par le peptide MOG et traitées au GA expriment des niveaux élevés d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 associés à une réduction des niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12 ou encore le TNF- α (Begum-Haque et al. 2011). Le GA favoriserait probablement l'induction de Breg tout en supprimant les LB pathogènes. L'ensemble de ces résultats atteste que le LB est un acteur important dans l'efficacité du GA dans l'EAE. Le mécanisme exact par lequel le LB des souris traitées au GA délivre cet effet protecteur au niveau du système nerveux central n'est pas clair. Parmi les mécanismes possibles, on peut constater une réduction du nombre de macrophages périphériques dans les souris receveuses de LB issus de souris EAE traitées au GA. Cette observation pourrait témoigner d'une hypothétique fonction du LB vis à vis des macrophages circulants pouvant ainsi se répercuter au niveau du système nerveux central (Kala et al. 2010). Une autre hypothèse proposée par Kala dans sa revue générale est qu'une interaction des LB sensibilisés au GA avec les cellules NK en périphérie conduirait ces derniers à migrer au niveau du système nerveux central, délivrant ainsi une réponse thérapeutique. D'autres

hypothèses sont encore avancées. Les LB eux-mêmes seraient susceptibles de migrer au sein du système nerveux central agissant *in situ* au niveau du site de démyélinisation. Autre mécanisme envisagé, le GA module les cytokines secrétées par les LB qui peuvent alors influencer la différenciation et la polarisation des LT, orientant davantage les réponses immunitaires (Kala et al. 2011). Selon Kala, l'avènement de l'imagerie *in vivo* des petits animaux est un espoir qui va sans doute aider à répondre à certaines de ces hypothèses dans un futur proche. Les conclusions de ces deux équipes à ce sujet sont résumées dans la **Figure 6**.

Pour conclure, bien que pertinentes et nécessaires, les avancées apportées grâce aux modèles murins d'EAE ne peuvent pas expliquer les mécanismes chez l'Homme. Plus d'études sont nécessaires pour évaluer si des mécanismes similaires vont prévaloir chez les patients SEP traités au GA. Un début de réponse vient d'être apporté très récemment.

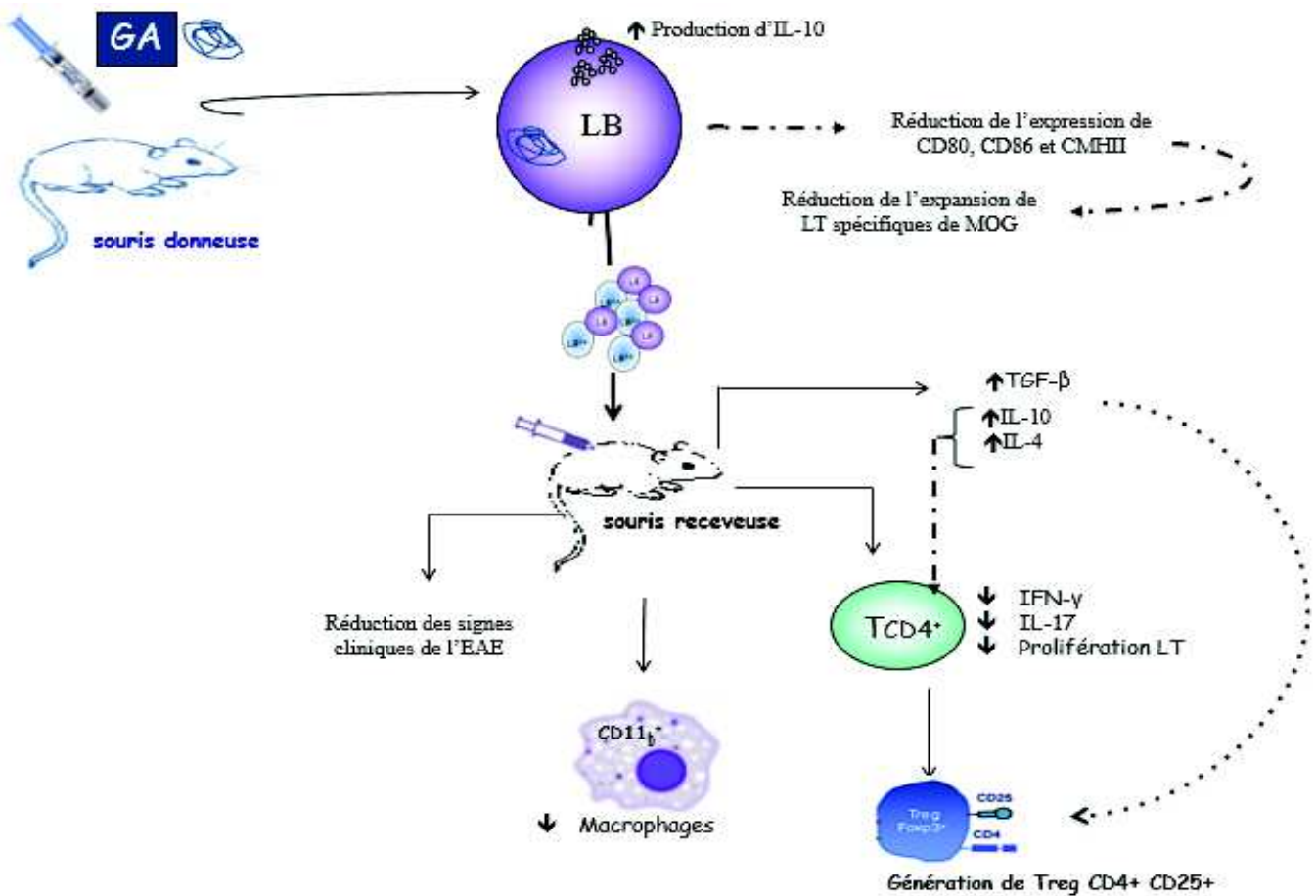


Figure 6 : Influence des LB issus de souris traitées au GA sur le développement de la réponse immunitaire.

Des LB issus de souris traitées au GA influencent la différenciation et la polarisation Th1. Ces LB présentent une augmentation de la production d'IL-10 et une modification de leur phénotype qui se traduit par la réduction de l'expression des molécules CD80, CD86, et CMHII qui influencera l'expansion des LT auto-réactifs notamment des LT spécifiques de MOG₃₅₋₅₅. En l'absence du signal de co-stimulation CD80/CD86, les LT peuvent devenir anergiques. Le transfert de ces LB permet de supprimer l'EAE dans les souris receveuses. La réduction des signes cliniques de la maladie peut être expliquée par un certains nombre de conséquences directes ou indirectes telles qu'une augmentation de cytokine régulatrices TGF-β, d'IL-10 et d'IL-4. Une inhibition de la prolifération des LT auto réactifs et du développement des cellules Th1 et Th17, une baisse du nombre de macrophages périphériques CD11b et l'accroissement de la génération de Tregs dans ces souris, par la production de TGF-β.

4.3.2 Chez l'Homme

L'équipe de Monson et collaborateurs est l'une des rares équipes à fournir de nouvelles données sur les effets potentiels du GA sur les LB chez l'Homme. Cette équipe a montré en 2008 que les LB périphériques activés peuvent agir comme cellules présentatrices de l'antigène de myéline *in vitro*. Ils constatent que les LB pré-stimulés par le GA n'induisent pas la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ contrairement aux neuro-antigènes habituels que ce soit le peptide MOG ou la MBP (Harp et al. 2008). La conséquence d'un tel potentiel est que les LB périphériques pourraient affecter l'évolution et le devenir de la maladie en canalisant et en contrôlant la réponse des LT Th1 auto-réactifs reconnus par les LB en périphérie. De notre point de vue, ces observations représentent également une fonction Breg possible sur le contrôle de la polarisation Th1 engendrée par le GA. En 2010, ces auteurs comparent la fonction de cellules présentatrices d'antigènes des sous-populations de LB mémoires CD27⁺ et LB naïfs CD27⁻ et leur capacité à induire une réponse proliférative T en présence de GA. Ils montrent que contrairement aux LB naïfs qui sont incapables d'induire une réponse proliférative des LT, les LB mémoires provenant de témoins sains et de patients RRMS sont capables d'induire la prolifération LT en réponse au GA. Dans cette étude, ils utilisent une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de GA et ils font l'analyse à 5 jours de culture. Ils montrent que le GA se fixe fortement sur la population LB mémoires (Harp et al. 2010). En 2001, l'équipe de Amit-Bar parvenait aux mêmes conclusions en réalisant une cinétique de prolifération des LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par le GA, la fonction de cellule présentatrice d'antigène étant remplie par des LB autologues provenant d'individus sains. Ils démontraient qu'en réponse au GA, les LB naïfs CD27⁻ sont incapables d'induire une réponse proliférative LT significative contrairement aux LB mémoires CD27⁺. Ils ont également montré que les LB mémoires activés CD27⁺ CD80⁺ favorisent une réponse

proliférative LT plus robuste que les LB mémoires CD27⁺ CD80⁻ (Bar-Or et al. 2001). Ici, les LB sont stimulés avec 4 µg/ml de GA en co-culture allogénique à un ratio de 1B pour 2T durant 4 à 5 jours.

Dans les travaux de Jackson et collaborateurs, chez la souris mais également chez l'Homme, il est mis en évidence que l'efficacité du GA passe nécessairement par une action sur la fonction de cellule présentatrice d'antigène des LB. Les auteurs montrent que le GA est engagé du moins en partie au niveau du BCR sur les LB des patients atteints de SEP et que le GA est capable de modifier le profil de cytokines produites (Jackson et al. 2014). L'hypothèse formulée est que le GA se fixe sur une population LB via le BCR, est internalisé puis présenté par les molécules CMHII aux LT CD4 auto-réactifs. Selon ces auteurs, l'effet protecteur du GA dans l'EAE est induit par une interaction avec le BCR et implique plusieurs mécanismes dont la présentation d'antigène et la production de cytokines.

4.1 Fixation du Glatiramer acetate sur les lymphocytes B

Dans leurs analyses, l'équipe de Jackson distingue deux populations de LB capables de fixer le GA, les GA^{fort} et les GA^{faible} et une population qui ne fixe pas le médicament, les GA^{Neg}. 70 à 90% des LB GA^{fort} disparaissent lorsque l'analyse est effectuée sur des LB obtenus à partir de souris transgéniques dont les LB expriment un BCR unique spécifique anti-Hel, suggérant que la population LB GA^{fort} provient d'une interaction spécifique entre le GA et le BCR. Pour déterminer si la reconnaissance du GA par le BCR est nécessaire à l'efficacité du médicament, les auteurs ont transféré des LB GA⁺ issus des souris transgéniques anti-Hel dans les souris EAE. Ils ont constaté une réduction du score clinique de la maladie mais qui n'est pas significative par rapport au transfert de LB GA⁺ issus de souris sauvages. C'est ainsi qu'ils incriminent la population LB fixant fortement le GA dans l'efficacité clinique du médicament contre l'EAE.

Selon eux, le mécanisme majeur de son efficacité clinique concerne des interactions spécifiques entre le GA et le BCR. La population GA^{faible} n'est pas altérée dans les LB issus de souris BCR anti-Hel ou de souris KO en CMHI ou CMHII, ce qui laisse supposer qu'une large proportion de LB peut fixer de façon non spécifique le GA (Jackson et al. 2014).

Effectivement si on se rapporte aux récents travaux de Koenig, il n'y aurait pas de récepteur spécifique au GA sur les cellules présentatrices d'antigènes. Le GA peut se fixer sur des héparanes sulfates, ou encore des glycoprotéines comme GP96 exprimées en surface. Les héparanes sulfates sont des polysaccharides complexes appartenant à la famille des Glycosaminoglycanes présents en abondance à la surface cellulaire. L'hypothèse des auteurs est que l'interaction du GA avec sa cellule cible serait médiée par des interactions électrostatiques et polaires. De fait, plus la concentration en chlorure de calcium augmente, plus la fixation du GA à sa cellule cible se réduit (Koenig et al. 2013). S'agissant des LB, il reste à démontrer si ce type d'interaction peut s'observer en complément de l'interaction spécifique avec le BCR.

4.2 Effet thérapeutique du GA sur les LB dans la sclérose en plaques

Ce n'est que récemment que le rôle du GA sur la production de cytokines par les LB a été étudié. L'équipe de Monson n'observe pas d'effet significatif sur la production d'IL-10 et d'IL-6 dans les LB isolés de patients SEP-RR traités. Il est important de préciser que les auteurs ont stimulé les LB *in vitro* avant l'analyse de leur capacité de production de cytokines mais n'ont pas exploré l'effet du GA sur des LB non stimulés. Finalement, l'hypothèse formulée est que le GA agirait sur les LB de manière indirecte et qu'il n'y aurait pas d'effet direct sur le profil cytokinique des LB (Harp et al. 2010). Ces observations seront remises en question par la même équipe en 2014. Ils démontrent finalement que le traitement au GA restaure la capacité des LB à produire de l'IL-10 et réduit leur capacité à sécréter de la lymphotoxine. Ils observent également

que le traitement GA réduit de manière transitoire la production d'IL-6 dans les LB. En effet, l'analyse par cytométrie n'a pas indiqué d'augmentation de la fréquence des LB IL-10⁺ mais une fréquence plus faible de LB IL-6⁺ chez les patients traités au GA par rapport aux patients non traités (Ireland et al. 2014). En conclusion, leur étude suggère que la thérapie GA affecte la capacité proliférative, le profil cytokinique et la production d'Ig par les LB chez l'Homme. En effet, en analysant la distribution des sous-populations de LB, les auteurs montrent que le traitement GA permet de réduire la fréquence totale des LB, des plasmablastes et des LB mémoires. La thérapie par contre augmente le nombre de LB naïfs. Malgré la réduction de la sous-population LB mémoire, la production *in vitro* d'IgG et d'IgM par les LB provenant de patients traités au GA est significativement augmentée (Ireland et al. 2014).

Mis à part son effet thérapeutique dans la SEP et l'EAE, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'effet neuro-protecteur du GA dans des maladies neuro-dégénératives, ou encore à son effet immuno-modulateur dans d'autres maladies auto-immunes (Gur et al. 2006, Horani et al. 2007), (Aharoni et al. 2005), (Frenkel et al. 2005). Le dernier chapitre sera consacré à l'aspect immuno-modulateur du GA dans certains modèles murins d'auto-immunité dans lesquels le Breg tient une place incontestable dans la physiopathologie de ces maladies.

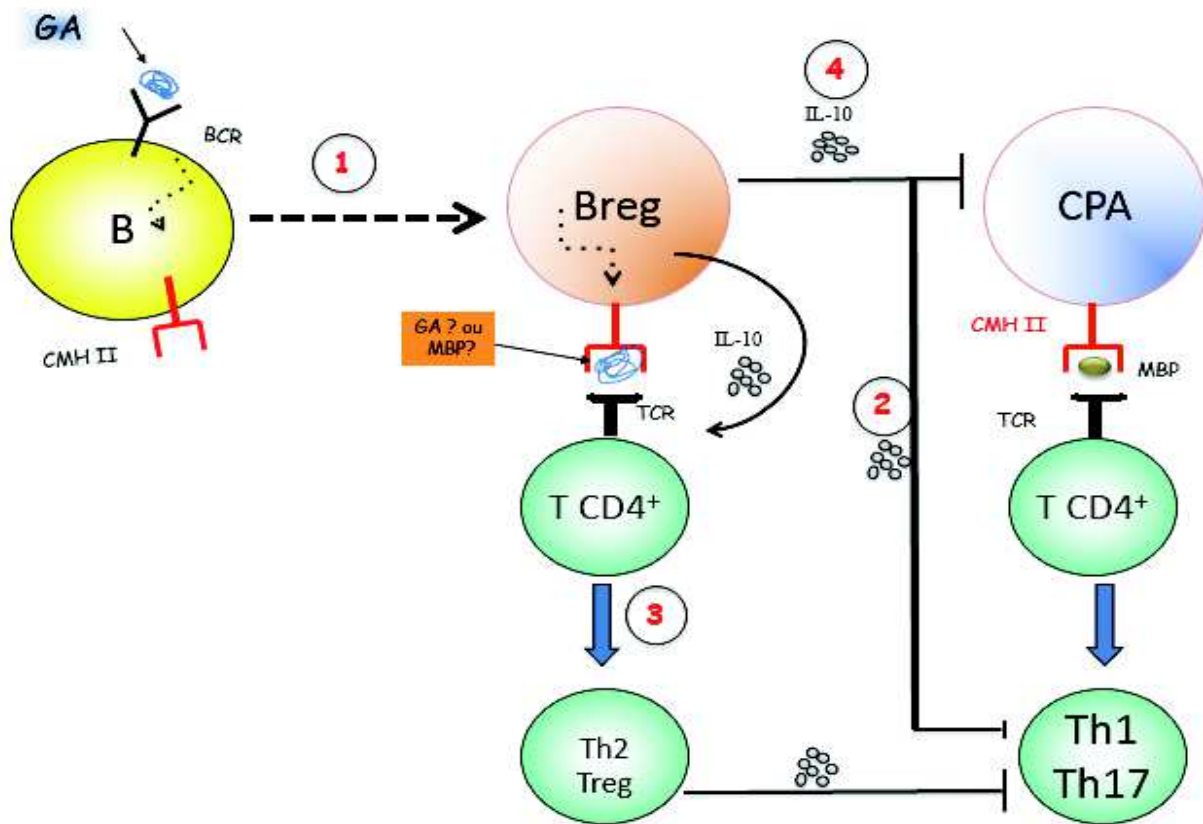


Figure 7 : Rôle possible du LB dans l'effet protecteur du GA dans l'auto-immunité.

Le rôle des Bregs producteurs d'IL-10 dans le mécanisme d'action du GA dans l'EAE et la SEP pourrait se résumer de la manière suivante : le GA induit un phénotype régulateur dans les LB, qui serait probablement indépendant de leur spécificité au GA. Ces Bregs producteurs d'IL-10 ont la capacité de supprimer l'auto-immunité par divers voies; (2) inhibition de l'activité pathogéniques de cellules Th1 et Th17, (3) favorise la génération de cellules Th2 et possiblement de Tregs, qui à leur tour peuvent agir sur les cellules Th1, Th17 par le phénomène de « Bystander suppression » et (4) inhibition de la capacité des cellules présentatrices d'Ag à induire des LT pathogéniques. Les mécanismes exposés ici au niveau périphérique peuvent également s'envisager au niveau du système nerveux central où l'ensemble des cellules sont présentes.

EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE DU GA DANS D'AUTRES MALADIES AUTO-IMMUNES

5. Efficacité thérapeutique du GA dans d'autres maladies auto-immunes

Certaines études réalisées dans des modèles murins ont mis en évidence un effet bénéfique du GA alors que, dans d'autres maladies, il ne semble pas les affecter. En voici quelques exemples (**Tableau 3**).

5.1 Uvéorétinite auto-immune expérimentale (EAU)

L'uvéorétinite auto-immune expérimentale (Experimental Autoimmune Uveoretinitis, EAU) chez la souris est un prototype de maladie autoimmune médiée par les LT qui cible la rétine neurale et les tissus qui y sont associés. Zhang et collaborateurs en 2000 avaient déjà décrit un effet inhibiteur du GA dans l'EAU induite dans des souris immunisées par la protéine interphotoreceptor retinoid-Binding protein (IRBP) (Zhang et al. 2000). De plus, le traitement au GA des souris atteintes d'une EAU bien établie a permis de réduire la sévérité de la maladie de 53%, d'abaisser la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que les réponses AC anti-IRBP.

5.2 Les maladies inflammatoires de l'intestin (IBDs)

Les maladies inflammatoires de l'intestin (Inflammatory Bowel Diseases, IBDs) consistent en un désordre immunologique multifactoriel caractérisé par une perturbation des réactions immunitaires dans l'intestin et un déséquilibre entre les réponses anti-inflammatoires et pro-inflammatoires (Aharoni et al. 2007). L'effet thérapeutique du GA a été étudié dans plusieurs modèles d'IBDs notamment la colite induite par l'acide sulfonique trinitrobenzene (TNBS) et la colite induite par le sulfate sodium Dextran ainsi que dans le modèle de colite spontanée (Aharoni

et al. 2006, Aharoni et al. 2007); (Aharoni et al. 2005). Par exemple, il a été montré que le GA inhibe la prolifération des lymphocytes mésentériques locaux, supprime les réponses pro-inflammatoires T ainsi que l'activité des cellules NK (Arnon et al. 2004, Gur et al. 2006). De manière intéressante, comme observé dans l'EAE, l'effet thérapeutique du GA peut être suppléé par le transfert adoptif de cellules Th2/Th3 spécifiques du GA à des souris atteintes de colite induite par le Dextran. Les cellules transférées se trouvent recrutées au site lésionnel, en l'occurrence au niveau de l'intestin et plus particulièrement dans la couche interne du colon où elles sécrètent *in situ* des cytokines régulatrices comme le TGF- β (Aharoni et al. 2007). Chez l'Homme, un rapport décrit que des patients atteints de la maladie de Crohn's et traités par le GA présentent une rémission de la maladie (Neesse et al. 2009) sans que le mécanisme sous-jacent soit étudié. Ainsi, une éventuelle action sur les LB n'a jamais été recherchée.

5.3 La maladie du greffon contre l'hôte

La maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease, GVHD) est une complication courante dans la transplantation de moelle osseuse allogénique. Le receveur est immunodéprimé, les cellules immunocompétentes contenues dans le greffon sont capables de reconnaître les allo-antigènes de l'hôte comme étranger aboutissant à une attaque immunologique et au rejet du greffon. Aharoni et collaborateurs démontrent un effet du GA dans la prévention de la GVHD qui peut intervenir à différents niveaux du rejet immunitaire (Aharoni et al. 2001). Le GA inhibe la prolifération des lignées T spécifiques du greffon ainsi que leurs sécrétions d'IL-2 et d'IFN- γ , lorsqu'ils sont incubés *in vitro* avec des cellules allogéniques. Les cellules des ganglions lymphatiques et de la rate issues des souris traitées au GA ainsi que les lignées générées à partir de ces souris montrent une inhibition prononcée de la prolifération et de la

sécrétion des cytokines pro-inflammatoires Th1 en réponse aux cellules du greffon. De plus, les cellules issues des souris traitées au GA secrètent une forte quantité de cytokines Th2 en réponse au GA avec une faible mais significative quantité d'IL-10 en réponse aux cellules de l'allogreffe. Le GA permet de prolonger la survie d'une greffe de peau et réduit les atteintes d'une greffe de thyroïde. Dans ces modèles de transplantations, le traitement au GA inhibe la sécrétion de cytokines inflammatoires préjudiciables et induit une réponse anti-inflammatoire associée avec un bénéfice clinique avérée (Arnon et al. 2004). Là non plus, un effet sur les LB n'est pas connu.

5.4 Arthrite induite par le collagène

L'arthrite induite par le collagène (collagen-Induced Arthritis, CIA) est un modèle auto-immun murin qui de plusieurs façons ressemble à la polyarthrite rhumatoïde chez l'Homme. L'immunisation de souches de rongeurs et primates génétiquement susceptibles avec le collagène de type II conduit au développement d'une arthrite sévère. Contrairement aux précédents modèles, le traitement au GA exacerbe la CIA dans les souris traitées. Ces dernières présentent un début plus précoce de la maladie associé à une augmentation de la production des cytokines inflammatoires par les LT auto-réactifs. E plus, une augmentation de la production des AC auto-réactifs et de la réponse des centres germinatifs dans les souris est également observée suite au traitement par le GA (Zheng et al. 2008). De toute évidence dans ce modèle, le GA active des LB auto-réactifs pathogènes.

5.5 Le diabète non obèse

Les souris Non Obese Diabetis (NOD) présentent une sensibilité au développement spontanée du diabète Mellitus, un diabète sucré de type 1 insulino-dépendant. Le traitement GA réduit significativement la maladie. Le GA augmente la réponse T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ dans les

souris NOD potentialisé par le cyclo-phosphamide (Cui et al. 2009). Le traitement GA augmente l'expression du facteur de transcription FOXP3 et augmente la production d'IL-4 aussi bien *in vivo* que *in vitro*. L'augmentation de la production d'IL-4 est partiellement responsable de l'augmentation de la fonction des Tregs. Ces résultats suggèrent que le GA est un traitement potentiel dans le diabète de type 1 par l'induction de Treg. Aucune information n'est apportée ou un éventuel effet au niveau des LB.

5.6 Le modèle spontané de lupus érythémateux systémique

Borel en 2008 a testé l'effet du GA dans un modèle murin de lupus. Il s'agit de souris mâles de la génération FI issues du croisement (NZB_x BXSB), un modèle de souris lupique portant une accélération autoimmune liée au chromosome Y et associée à une production d'auto-AC ainsi qu'à une monocytose accélérant la progression de la maladie. Ces souris sont traitées au GA avant le début de la maladie jusqu'à leur mort, puis le taux de mortalité et les paramètres immunologiques sont évalués (Borel et al. 2008).

Le GA n'exerce aucun effet significatif sur la moyenne de survie après plus de 7 mois de traitement. Quant aux paramètres cellulaires et humoraux évalués comme marqueurs de la progression du lupus, tous sont inchangés (AC anti-chromatine, AC anti-ADN double brin, AC anti-érythrocytes, hémocrite, monocytose). Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer cette absence d'efficacité du GA dans ces souris lupiques. Tout d'abord, le fait que le modèle animal étudié soit un modèle spontané de lupus. Les résultats auraient-ils été similaire dans les nombreux autres modèles spontanés de lupus toxiques ou dans les modèles transgéniques ? Les modèles de lupus toxiques auraient été plus appropriés pour déterminer par exemple si le GA est efficace en thérapie préventive plutôt que curative.

De plus, le GA est connu pour favoriser une réponse Th2 qui peut potentiellement stimuler les LB à produire des AC, ce qui pourrait à terme aboutir à la progression de la maladie. Enfin, le traitement GA fut administré à des concentrations identiques à celles utilisées dans le modèle d'EAE. On ne peut donc pas exclure que l'administration de GA à d'autres doses pourrait aboutir à des résultats cliniques différents (Borel et al. 2008).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent un bénéfice clinique dans de nombreux modèles inflammatoires autres que l'EAE. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle le GA exerce un effet immuno-modulateur de manière indépendante de l'antigène. Son action sur les LB demeure largement méconnue.

MODELES	EFFETS	MECANISMES	REFERENCES
Uvéorétinite expérimentale autoimmune	Protecteur	Réduction de l'IFN- γ et de l'IL-2.	<i>Zhang et col., 2000</i>
Maladies inflammatoires de l'intestin	Protecteur	Augmentation de la réponse Th2/Th3, inhibition des réponses pro-inflammatoires T et de la cytotoxicité des cellules NK	<i>Aharoni et col., 2007; 2006; Arnon and Aharoni 2004, Gur, Karussis et al. 2006</i>
Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)	Protecteur	Augmentation des cellules Th2	<i>Aharoni et col., 2001</i>
Arthrite autoimmune induite par le collagène	Exacerbation de la maladie	Augmentation des LT et AC auto-réactifs	<i>Zheng et col., 2008</i>
Modèle spontané de LED	Sans effet	Sans effets	<i>Borel et col. 2008</i>
Diabète	Protecteur	Augmentation des LT CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ , de l'expression de Foxp3 et de la production d'IL-4	<i>Cui et col. 2009</i>

Tableau 3 : Effets du Glatiramer acetate dans d'autres modèles murins d'auto-immunité

Selon la revue générale de Aharoni et al. en 2013 (Aharoni 2013).

OBJECTIFS

6. Objectif de la thèse

Le LB des patients lupiques est réfractaire à tous les procédés décrits à ce jour, pour activer une fonction régulatrice B (Lemoine et al. 2011), (Gao et al. 2014), (Blair et al. 2010). Il constitue de ce fait un modèle intéressant d'étude de la déficience Breg chez l'Homme et soulève de nombreuses questions: Est-il possible de restaurer un défaut d'activation de la régulation LB? Ou au contraire, est-ce un état irréversible de déficience du LB ?

Ce travail de thèse a pour objectif principal de répondre à cette problématique essentielle à notre compréhension du Breg. Il s'agira d'identifier et d'explorer un procédé de stimulation permettant de palier au déficit de la régulation des LB issus des patients lupiques.

En 2011, au moment de débiter ce travail de thèse, deux équipes indépendantes venaient de mettre en évidence dans un modèle murin, l'importance du LB à potentiel régulateur dans l'efficacité clinique d'un médicament immuno-modulateur le Glatiramer acetate.

Dans les souris EAE, un traitement à base de GA permet d'activer la fonction régulatrice des LB et d'augmenter la proportion de LB CD5⁺ producteurs d'IL-10 *in vivo* (Kala et al. 2010, Kala et al. 2011). Chez l'Homme, il fut montré que le GA possède la capacité de restaurer la production d'IL-10 dans les LB des patients atteints de sclérose en plaques (Ireland et al. 2014). A ce jour, l'expression et la production de la cytokine régulatrice IL-10 sont largement utilisées pour se substituer à un potentiel marqueur de Bregs. Ces études suggèrent vraisemblablement que dans l'EAE et la SEP, une réversibilité de la fonction Breg est possible grâce au GA. Cependant, de quelle manière une telle réversion s'établit ? Cette nouvelle propriété du GA peut-elle s'étendre à d'autres pathologies, tel que le LED ?

C'est dans ce contexte que fut envisagé ce projet de thèse qui a pour objectif de déterminer si la stimulation par le GA est un moyen efficace pour activer la fonction Breg des patients lupiques. Afin de le vérifier et tenant compte du fait de la grande difficulté à identifier des marqueurs de surface spécifiques des Bregs, nous avons mis en place un système de co-culture *in vitro* du couple LT/LB. Ce modèle permettra d'analyser la capacité suppressive de l'ensemble des LB sensibilisés au GA. Nous démontrerons que le GA permet d'accroître la fonction régulatrice intrinsèque d'un Breg chez les témoins sains et surtout de restaurer la fonction régulatrice déficiente des LB lupiques. Dès lors, nous avons entrepris des expériences complémentaires afin d'en décrypter le mode d'action. Il s'agira d'identifier la sous-population LB particulière qui est à l'origine des effets du GA. Une fois celle-ci identifiée, l'étape suivante visera à rechercher dans cette sous-population, les modifications phénotypiques permettant d'expliquer l'action du GA sur la fonction Breg. Pour terminer, nous confronterons et discuterons des conséquences qu'un tel effet peut avoir dans le contexte pathologique particulier du lupus.

MATERIEL ET METHODES

7. MATERIEL ET METHODES

7.1 Milieux de cultures

Les LB et LT sont cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgique) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Eurobio, Les Ulis, France), 2mM de L-glutamine (Bibco Invitrogen, New York, USA NY), 200 U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (Panpharma, Fougères, France). Quand nécessaire, les LB ou les co-cultures LT+LB sont cultivés en présence de GA (Teva pharmaceuticals Europe B.V. Pays Bas) à une concentration de 20µg/ml et/ou de CpG-ODN 2006 à 0,25µM (Cayla, Invitrogen, Toulouse, France).

7.2 Patients et contrôles

Le sang périphérique des donneurs sains est obtenu grâce aux dons volontaires de l'équipe du laboratoire et de poches de sang provenant de l'établissement français du sang. Le sang périphérique des patients atteints de LED est obtenu par le service de Rhumatologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de la Cavale Blanche à Brest après avoir obtenu leur consentement éclairé. L'ensemble des patients étaient nouvellement diagnostiqués et ne suivaient de ce fait aucune thérapie. Tous les résultats de co-cultures et de phénotype présentés ici correspondent à ceux obtenus avec les patients dont le diagnostic LED a été confirmé par le service de Rhumatologie du CHRU. Les amygdales sont recueillies après consentement auprès du service de pédiatrie du CHRU Morvan et de la clinique Pasteur de Brest, suite à une amygdaléctomie de routine, sur des enfants âgés de moins de 10 ans au service de pédiatrie du

CHU et majoritairement sur des individus adultes en ce qui concerne les amygdalectomies réalisées à la clinique Pasteur de Brest.

7.3 Purification des lymphocytes B et lymphocytes T

Les amygdales sont broyées stérilement dans du tampon PBS (Cryobio Systems, L'aigle, France). La suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un tamis d'un diamètre de 0,7µm afin d'éliminer les débris tissulaires. Les échantillons de sang sont dilués au demi dans du PBS. Les suspensions cellulaires de sang et d'amygdales sont déposées sur un gradient de Ficoll-Hypaque (PAA, Pashing, Autriche) pour centrifugation. La phase contenant les cellules mononucléées est récupérée puis lavée au PBS. La numération cellulaire est systématiquement réalisée sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan (Sigma Aldrich, Ayrshie, Royaume uni). Ce dernier révèle en bleu les cellules mortes permettant de distinguer les cellules vivantes translucides.

Les LB et les LT du sang et des amygdales sont purifiés par la technique dite des Rosettes. Cette technique consiste à incuber du sang de mouton défibriné (TCS Biosciences Ltd, Buckingham, UK) durant 5 min dans la solution d'Alsevers (*10,25g D-Glucose, 3,95gr Citrate Na, 2,1g NaCl, pH= 6,1*). Cette solution permet de prévenir une coagulation du sang. Le sang de mouton est ensuite lavé au HBSS (Lonza, Verviers, Belgique). Le culot d'hématies obtenu après centrifugation est ensuite homogénéisé dans de la neuraminidase (Sigma Aldrich, Ayrshire, Royaume uni). Cette dernière est une enzyme qui dé-sialyle les sucres membranaires des hématies de mouton ce qui leur permettra de fixer les LT. Un LT est reconnu par plusieurs hématies de mouton préparées.

La suspension cellulaire est incubée à 37°C durant 45 minutes. Les cellules sont ensuite lavées au HBSS et reprises dans du RPMI complet puis placées à 4°C jusqu'à utilisation.

Les cellules du sang et des amygdales sont mises une nouvelle fois en suspension à la concentration de 1.10^8 cellules dans 10ml de SVF décomplémenté. Un volume identique d'hématies de mouton préparées est ajouté à la suspension cellulaire et l'ensemble est centrifugé puis incubé durant 1h dans la glace. La suspension est ensuite déposée sur $\frac{1}{2}$ volume de Ficoll-Hypaque puis centrifugée. Les LT se retrouvent dans le culot au fond du tube car se liant aux hématies de mouton. Ainsi, l'anneau contenant les LB non fixés par la neuraminidase et le culot de LT liés aux hématies sont récupérés et lavés au PBS. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans un tampon de lyse ACK (8,2g NH_4Cl , 1g KHCO_3 , 0,37g EDTA, pH=7,4) et incubés sur glace durant 5 min afin de lyser les éventuelles hématies. Les suspensions cellulaires sont ensuite lavées au PBS puis culottées dans du SVF décomplémenté pour une conservation le temps nécessaire à 4°C. La pureté des cellules est systématiquement évaluée après chaque isolation cellulaire par cytométrie en flux à l'aide d'un double marquage CD19-FITC/CD5-PE.

Cette technique permet l'obtention de LB d'amygdales pures à plus de 95%. Cependant, les LB et LT issus de sang périphérique ainsi que les LT d'amygdales nécessitent une étape supplémentaire de purification. Leur pureté reste variable entre les échantillons mais peut globalement être de l'ordre de 35%, 70% et 40% respectivement.

L'étape de purification supplémentaire consiste à isoler les cellules d'intérêt par sélection négative grâce à des Kits d'enrichissement par billes magnétiques (StemCell technologie, Grenoble, France) en suivant fidèlement le protocole fourni par le fabricant. Brièvement, les suspensions cellulaires sont incubées 10 min avec un mix comprenant un mélange d'anticorps anti-CD2, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD56 et anti-glycophorine A, en ce qui concerne le Kit d'enrichissement en LB. Concernant le Kit d'enrichissement en LT on retrouve un mix d'anticorps anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD36, anti-CD56, anti-

CD123 et anti-glycophorine A. Chaque anticorps présent forme un complexe en tétramère avec des anticorps anti-Dextrane. Toutes les cellules possédant l'un des antigènes reconnus par les anticorps du mélange se retrouvent de ce fait liées aux billes de fer. Les suspensions cellulaires sont placées 5 min dans un aimant. Les cellules marquées se retrouvent fixées par magnétisme à l'aimant tandis que les cellules LT ou LB d'intérêt seront récupérées dans le surnageant. Ce procédé permet d'obtenir une pureté cellulaire entre 95 et 98%.

7.4 Anticorps

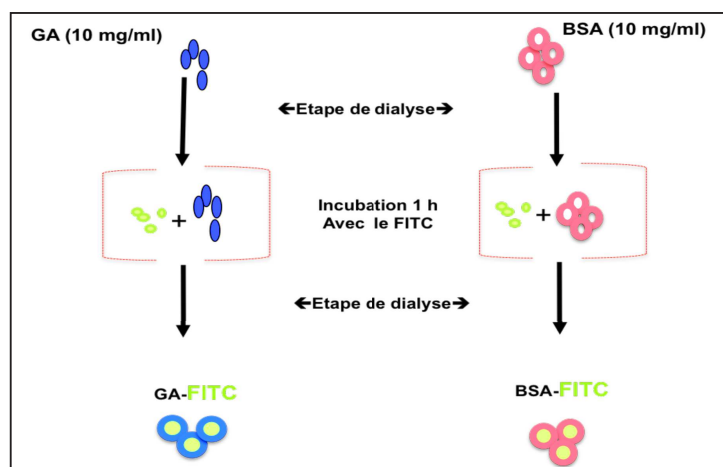
Le phénotype des LB est analysé grâce à un panel d'anticorps provenant majoritairement du même fournisseur, Beckman Coulter. Quand ce n'est pas le cas, le fournisseur sera précisé. CD5-ECD (PE-Texas Red) (clone BL1a), HLA-DR-PC7 (clone Imm-37), IgD APC (clone IA6-2), CD27-PC7 (clone 1A4CD27), CD38 PC5.5 (LS198-4-3), CD24-APC-AF750 (ALB9), CD19 -APC-AF700 (J3-119), CD38-PC5 (L5198-4-3), CD19-PC7 (J3-119).

La mesure de la production d'IFN- γ par les LT est réalisée par cytométrie en flux en combinant un anticorps anti-IFN- γ couplé au FITC (IgG2b, IC285F, R&D System) avec l'anticorps anti-CD4-PC7 (IgG1, 13 B8.2). Enfin, la présence de Tregs est évaluée par cytométrie en flux en combinant l'anticorps anti-CD4 (IgG1, 13B8.2) avec l'anticorps anti-Foxp3-PE (IgG1, 259 DC/7) (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA CA). Les contrôles isotypiques IgG1 (679.1MC) et IgG2a (7T4-1F5, U7-27) conjugués aux différents fluorochromes sont utilisés comme témoins de non spécificité. La viabilité cellulaire est évaluée par le marqueur de viabilité cellulaire DRAQ7 Far-Red Fluorescent Live-Cell Impermeant DNA Dye.

7.5 Préparation du Glatiramer acetate

Le GA (Teva pharmaceuticals Europe B.V) est conjugué au FITC (FITC-GA) en suivant la procédure standard de marquage des protéines. La BSA est utilisée comme contrôle négatif pour le suivi de la fixation sur les LB (**Figure 8**). Le GA et la BSA sont dissous dans du RPMI-1640 à une concentration de 10 mg/ml. Les molécules sont conjuguées après une première dialyse à la fluorescein-5-thiosemicarbazide (Molecular Probes, Invitrogen, Amine reactive Probes), reconstituée dans du DMSO, durant 1 heure à 37°C, dans un tampon carbonate-bicarbonate (17gr Na₂CO₃, 28gr NaHCO₃) à pH=9,5. L'excès de FITC est ensuite éliminé par une seconde dialyse extensive avec du PBS. Le GA couplé, comme la BSA couplée, est gardé dans un tampon permettant sa conservation (0,1% NaN₃). La concentration de la préparation obtenue est évaluée dans un spectromètre photonique UV2 (Unicam) par mesure des longueurs d'ondes 488nm et 518 nm.

Figure 8 : Protocole du marquage du GA ou de la BSA au FITC



7.6 Microscopie confocale

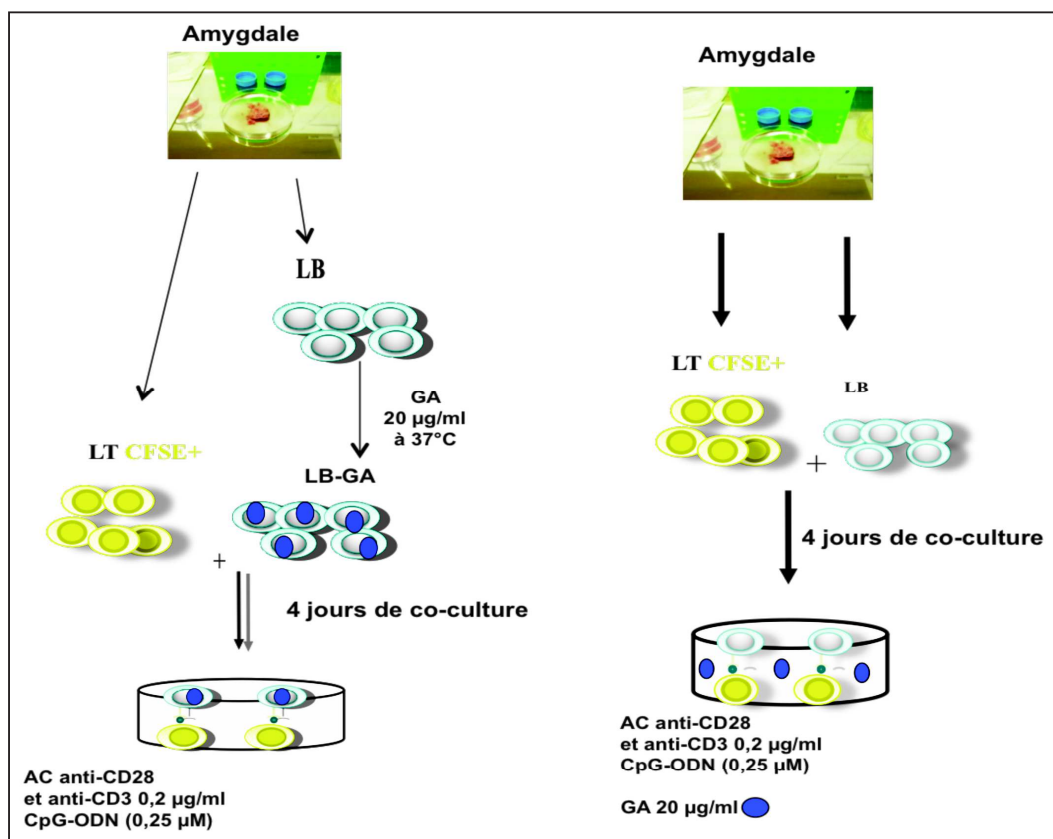
1.10^6 LB sont incubés 1h à 4°C avec des concentrations croissantes de GA préalablement conjugué au FITC. Selon les conditions, le GA est associé avec un AC primaire de souris anti-HLA-DR (BioLegend) ou de lapin anti-IgM (de chez DAKO) ou encore un AC primaire de souris anti-CD22 (BioLegend). Les cellules sont ensuite lavées puis incubées 1h à 4°C avec un AC secondaire anti-Ig de souris ou de lapin conjugué au TRITC (Tetra methyl Rhodamine isothiocyanate), (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Les LB sont alors fixés avec une solution filtrée de formaldéhyde 4% après un dernier lavage, puis un montage est réalisé entre lame et lamelle en utilisant de la glycérine. Les marquages sont analysés à l'aide d'un système d'imagerie confocale TCS-NT et visualisés à un grossissement de 100X (Leica TCS balayage), afin d'évaluer l'éventuelle co-localisation du GA avec les molécules HLA-DR, le BCR ou CD22. Une optimisation des concentrations nécessaires d'AC primaires et secondaires ainsi que les différents contrôles isotypiques négatifs ont été réalisés et validés.

7.7 Cultures cellulaires

La pré-stimulation par le GA des LB est réalisée dans du milieu de culture RPMI complet comprenant une concentration de 20µg/ml de GA à 37°C. Le contrôle négatif consiste à incuber dans les mêmes conditions les LB avec du milieu de culture dépourvus de GA. Les LB sont ainsi incubés durant 4 heures dans des plaques de 24 puits à une concentration de 1.10^6 cellules/ml. Suite à cela, afin d'éliminer l'excès de GA non fixé, deux lavages sont effectués avant leur mise en co-culture avec les LT. Dans certaines expériences, les LB ne sont pas pré-stimulés et le GA est ajouté directement au début de la co-culture pour avoir un contact prolongé et direct avec les LB mais également les LT autologues (**Figure 9**).

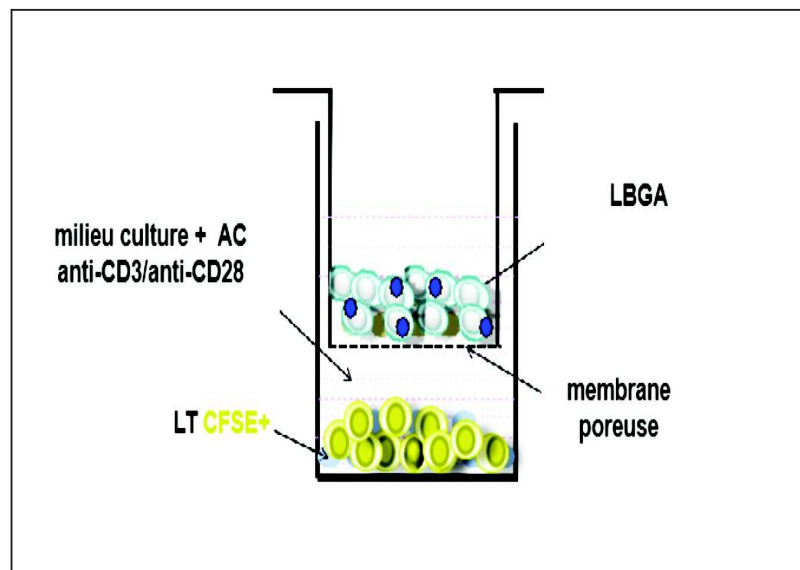
Les LT sont cultivés à une concentration de 10^5 cellules/ml pour les prélèvements issus d'amygdales et 5.10^4 cellules/ml lorsqu'il s'agit du sang périphérique en raison de la rareté des cellules dans ce dernier en milieu RPMI complet dans des plaques de 96 puits préalablement recouvertes avec une IgG anti-Fc de souris. Les LT sont stimulés avec $0,2\mu\text{g/ml}$ d'AC anti-CD3 (IgG2a, k, OKT3) (Biolegend, San Diego, USA CA) et $0,2\mu\text{g/ml}$ également d'AC anti-CD28 (IgG1, CD28.2) (Beckman Coulter, Marseille, France) durant 4 jours de culture. Pour les co-cultures, le ratio est de 1 LT pour 1 LB dans toutes les conditions.

Figure 9 : Protocole de la stimulation des LB d'amygdales par le GA avant ou pendant la co-culture avec les LT autologues



Des expériences de blocage du contact cellulaire sont réalisées à l'aide de l'anticorps bloquant anti-CD40L (1mg/ml) (R&D Systems) ou d'un système de transwell (**Figure 10**). Les LT sont déposés dans la chambre inférieure en présence du milieu de culture et les LB sont déposés dans la chambre supérieure.

Figure 10 : Protocole expérimental utilisé avec le système transwell

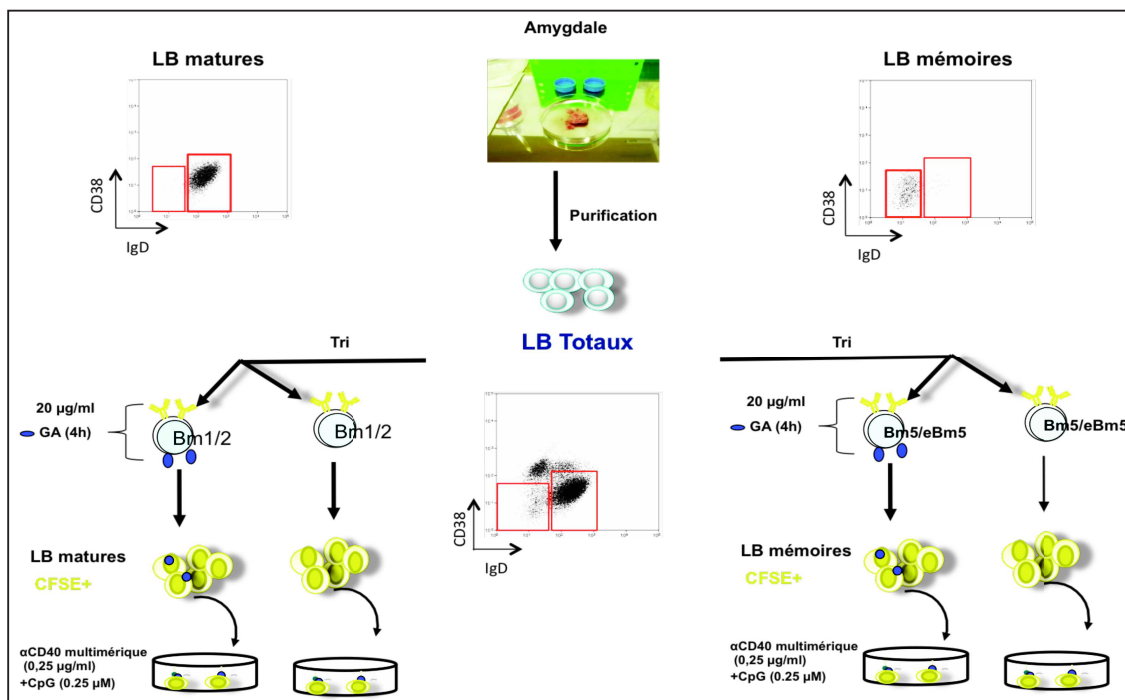


Des expériences de blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR sont réalisées à l'aide de L'Ultra-LEAF Purified anti-human HLA-DR (clone L243), (BioLegend, San Diego 0.5 ug/ 10⁶ cellules). C'est un AC monoclonal qui interagit avec la molécule HLA-DR, mais pas les HLA-DP ou HLA-DQ, bloquant les sites de fixation aux molécules HLA-DR. Ce dernier est ajouté soit à l'étape de pré-stimulation des LB de 4h, soit dans la co-culture. Un isotype contrôle IgG2a, kappa provenant du même fabricant est également testé. Selon les expérience les LB triés sont stimulés avec 0,25μM de CpG-ODN associé ou non à un AC CD40 multimérique (milteny Biotec) durant 4 jours.

7.8 Mesure de la prolifération et de la survie cellulaire des LB

Les sous populations LB sont triées puis sont pré-stimulées ou non par du GA. Suite à deux lavages, les cellules sont stimulées avec 0,25 μ M de CpG-ODN en présence d'un AC CD40 multimérique durant 4 jours. Au 4^{ème} jours de culture les cellules marquées au CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) sont marquées avec un AC anti-CD19 pour la mesure de la prolifération (**Figure 11**). La viabilité cellulaire est déterminée par un marquage des LB avec le DRAQ-7 à J4 et analyse par cytométrie en flux.

Figure 11 : Protocole expérimental mis en place pour l'étude de la prolifération des sous populations LB matures et LB mémoires triés

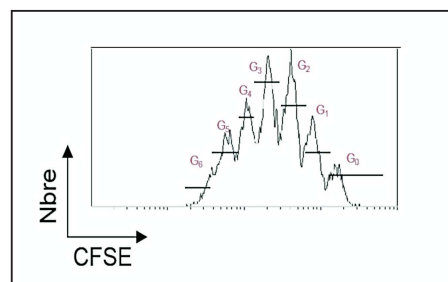


7.9 Mesure de la prolifération

L'utilisation du CFSE (Molecular probes Invitrogen, New York, USA NY) permet d'évaluer la prolifération des cellules. La fluorescence des cellules au repos est stable au cours du temps. Lorsque les cellules se divisent, le CFSE se répartit uniformément entre les deux cellules filles qui sont donc deux fois moins fluorescente que la cellule mère. Ainsi, chaque division successive se traduit par la réduction d'un facteur deux de l'intensité de la fluorescence cellulaire et permet de distinguer l'apparition au fil du temps des générations cellulaires en divisions (Figure 12).

Figure 12 : Analyse de la prolifération des lymphocytes

G_0 correspond aux cellules qui ne sont pas encore entrées en division et G_6 celles qui ont réalisé 6 divisions cellulaires au moment de l'analyse par cytométrie.



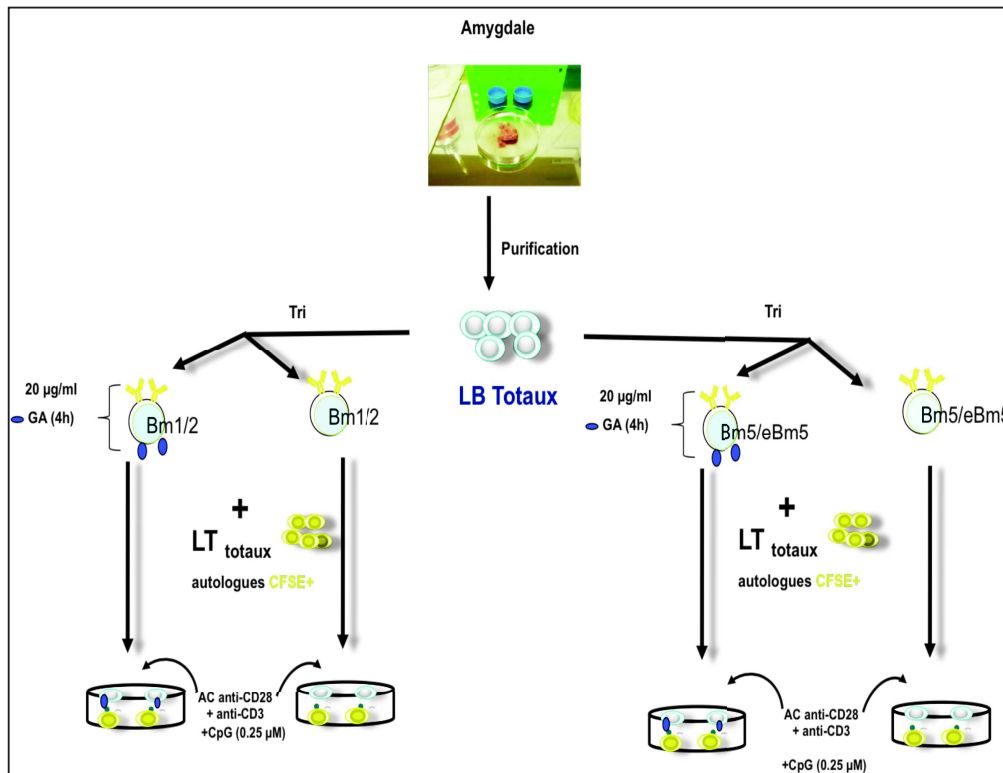
La mesure de la prolifération est réalisée soit sur des LT totaux soit des LB triés. Les cellules fraîchement isolées sont suspendues dans 1ml de PBS et marqués par 5 μ M de CFSE à température ambiante dans l'obscurité durant 5min. Après un lavage avec du SVF décomplémenté, le marquage des cellules est immédiatement vérifié par cytométrie avant co-culture. Le niveau de prolifération est ensuite mesuré par cytométrie en flux (FC500, Beckman Coulter, Marseille, France) en analysant le pourcentage de cellules en division à J4. En fonction des expériences de co-cultures, les suspensions cellulaires sont marquées par un anticorps anti-CD4 couplé au PC7 pour la prolifération des LT ou anti-CD19 couplé au PC7 pour la

prolifération des LB. Ainsi, dans les co-cultures, l'effet suppresseur des LB est apprécié en calculant le % d'inhibition de la prolifération LT selon la formule suivante: ((% de cellules en G₃ à G₆ dans les T seuls-% des cellules G₃ à G₆ des T+B)/% de cellules en G₃ à G₆ dans les T seuls).

7.10 Tri cellulaire

Les tris cellulaires des sous-populations de Bm1/Bm2 matures CD19⁺ CD38⁺ IgD⁺ et eBm5/Bm5 mémoires CD19⁺ IgD⁻ CD38^{+/-} sont réalisés à l'aide du cytomètre de flux MoFlo™ XDP (Beckman Coulter), à partir de LB de sang périphérique ou d'amygdales. La pureté des cellules triées est systématiquement vérifiée et est supérieure ou égale à 98%. Les cellules triées sont ensuite pré-stimulées 4h avec 20ug/ml de GA avant culture (**Figure 13**).

Figure 13 : Protocole expérimental mis en place pour l'étude des sous-populations LB mature et mémoires triées



7.11 Mesure de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T

Les cellules sont d'abord incubées avec l'anticorps de surface anti-CD4-PC7 durant 15 min puis lavées. Dans un second temps, les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA CA) selon les instructions du fabricant et incubées 30 minutes sur glace avec l'anticorps anti-IFN- γ -FITC. L'analyse de l'expression de l'IFN- γ est réalisée sur les cellules CD4 positives par cytométrie en flux.

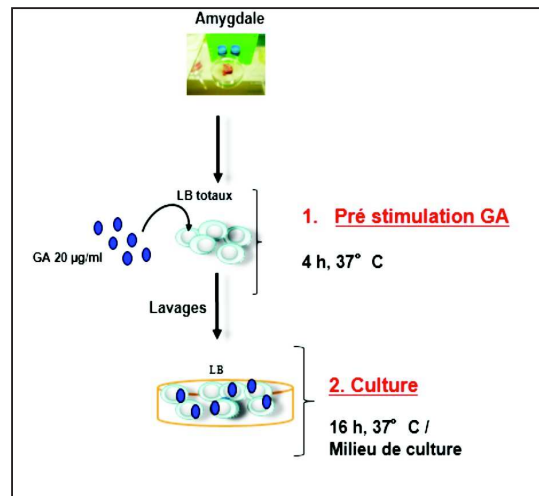
7.12 Evaluation de la présence de Lymphocytes T régulateurs

L'exploration de la présence de Tregs est réalisée en marquant d'abord les cellules avec un anticorps anti-CD4-PC7 30 min à 4°C. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées à l'aide du Kit Foxp3 Buffer Set (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA CA) selon les instructions du fabricant puis incubées avec un anticorps anti-Foxp3-PE. L'analyse de l'expression du FOXP3 est réalisée par cytométrie en flux sur les cellules CD4 positives.

7.13 ELISAs

Les surnageants de culture ou de co-culture sont collectés et les particules résiduelles éliminées par centrifugation, soit à 4 jours de co-culture soit à 4 +16h de culture (**Figure 14**). L'IL-10, les IgG, IgM, IgA et l'IFN- γ sont dosées à différentes dilutions en utilisant les Kits commerciaux IL-10 (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA, CA) et l'IFN- γ (Beckmann Coulter, Marseille, France), ou ELISA « maison » pour les immunoglobulines.

Figure 14 : Protocole expérimental mis en place pour la stimulation des LB d'amygdales par le GA



7.14 Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Les analyses statistiques sont effectuées avec le programme PRISM5 GRAPHPAD (Graph-pad, San Diego, USA CA) en utilisant le test de Wilcoxon pour les échantillons appariés et le test de Man-whitney pour les comparaisons entre échantillons non appariés. Lorsque $P < 0.05$, la différence est considérée comme significative.

RESULTATS

8. Résultats

8.1 Le GA potentialise ou restaure l'effet régulateur des LB *in vitro*

Afin d'étudier l'effet du GA sur la fonction Breg dans un contexte pathologique de LED, nous avons au préalable confirmé dans un modèle d'étude *in vitro* le défaut fonctionnel des Bregs chez des patients nouvellement diagnostiqués. Ce modèle *in vitro* permet d'étudier la fonction de contrôle des LB sur la prolifération de LT autologues (**Figure 15A**). Brièvement, les LT et les LB sont isolés du sang périphérique de patients ou de témoins sains. Les LT sont activés par deux AC anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, tandis que les LB sont stimulés ou non par du CpG-ODN dans la co-culture. Les LT et les LB sont ajoutés à un ratio (1 : 1). Enfin, les LB sont pré-stimulés ou non durant 4h avec le GA avant la mise en co-culture.

8.1.1 Le GA potentialise la fonction régulatrice de LB humains de témoins sains

Chez les témoins sains, nous montrons que les LB dépourvus d'une quelconque stimulation acquièrent une faible capacité de régulation de la prolifération T puisque le niveau d'inhibition est de $9,35 \pm 2,5\%$ (**Figure 15B, 15C**). L'effet est significativement amélioré lorsque les LB sont pré-stimulés 4h par du GA passant à $28,28 \pm 2,3\%$ d'inhibition (**P<0,01), (**Figure 15B, 15C**). Par ailleurs, la stimulation des LB par du CpG-ODN durant la co-culture permet d'enregistrer un effet suppresseur plus important de $41,11 \pm 4,6\%$ (**P<0,01) (**Figure 15B, 15C**). De plus, l'association du CpG-ODN dans la co-culture et de la pré-stimulation GA des LB avant la co-culture renforce l'effet, avec une inhibition de la prolifération allant jusqu'à $61,22 \pm 6\%$ (**P<0,01), (**Figure 15B, 15C**). Nous démontrons par ces expériences inédites que la pré-

stimulation par le GA peut exercer un effet direct sur les LB chez l'Homme permettant d'accroître significativement leur potentialité suppressive.

8.1.2 Le GA restaure la fonction régulatrice des LB humains dans un contexte pathologique

Chez les patients LED, nous confirmons d'une part que les LB sont incapables de réguler la prolifération des LT autologues avec un pourcentage d'inhibition de $2,4 \pm 0,4 \%$ (**Figure 15E, 15F**), et d'autre part que, contrairement aux témoins sains, la stimulation du TLR-9 par le CpG-ODN ne permet pas d'induire une quelconque fonction suppressive puisque le niveau d'inhibition demeure inchangé à $2,5 \pm 0,4\%$ (**Figure 15E, 15F**). Par contre, une courte pré-stimulation de 4h de ces LB avec le GA permet de restaurer une fonction Breg (**Figure 15E, 15F**) qui se situe au même niveau que celle des LB témoins avec $24,13 \pm 3,5\%$ d'inhibition (**Figure 15D**). En revanche, l'ajout d'une stimulation du TLR-9 par le CpG-ODN durant la co-culture associée à la pré-stimulation GA ne permet pas d'accroître significativement l'effet supprimeur qui reste à $30,5 \pm 5\%$ d'inhibition (**Figure 15F**), ce qui est significativement plus faible que l'inhibition observée avec les témoins sains ($61,22\% \pm 6\%$), (* $P < 0,05$), (**Figure 15G**).

Nous démontrons pour la première fois par ces expériences que la pré-stimulation par le GA peut rétablir la fonction régulatrice des LB des lupiques. D'autre part, ces résultats suggèrent également que le GA ne restaure pas la signalisation de la voie TLR-9, probablement défectueuse dans les LB lupiques et qu'il génère un effet par une voie autre et indépendante de celle-ci.

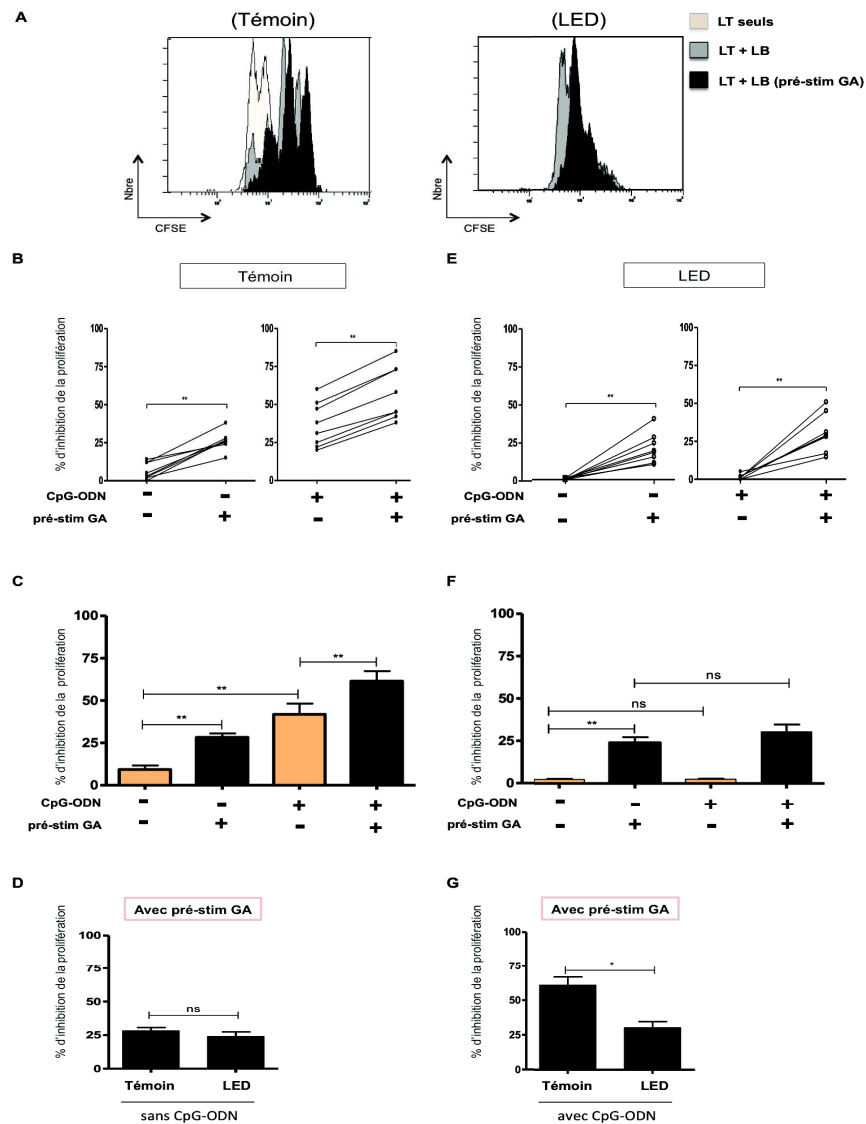


Figure 15 : La pré-stimulation des LB par le GA potentialise ou restaure leur fonction suppressive.

Les LT de patients LED (n=8) ou de témoins sains (n=8) sont marqués à J₀ avec du CFSE puis sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours, en présence ou non de LB. Les LB sont pré-stimulés ou non par du GA durant 4h, lavés, puis mis en co-culture à J₀ avec les LT autologues. En fonction des conditions, les LB sont stimulés ou non durant la co-culture par du CpG-ODN. Exemple de profil du CFSE des LT CD4⁺ selon les conditions de culture à J₄ permettant d'apprécier leur prolifération (A). Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT par les LB à J₄ chez les témoins sains (B, C), et chez les patients LED (E, F), selon les conditions de co-culture. Comparaison de la fonction suppressive des LB de témoins et de patients pré-stimulés par le GA, en co-culture sans (D) ou avec (G) du CpG ODN.*P<0,05; **P<0,01; ns: non significatif.

8.1.3 Fixation du GA sur les LB *in vitro*

Après avoir démontré que le GA est capable soit d'augmenter (chez les témoins) soit de restituer (chez les patients) la fonction régulatrice des LB, nous avons souhaité comprendre le mode d'action de ce médicament sur les LB. Nous avons tout d'abord recherché à identifier les LB cibles du GA. Pour cela, nous avons marqué le GA avec un fluorochrome, le FITC, afin d'analyser par cytométrie en flux sa fixation sur les LB totaux.

Cette analyse a permis de montrer que deux populations de LB sont capables de fixer, l'une faiblement l'autre fortement, le GA, que l'on désignera BGA^{faible} et BGA^{fort}, respectivement (**Figure 16A, 16B**). Quel que soit l'échantillon testé, une population de LB ne fixe pas le GA, déterminée par rapport au contrôle négatif BSA-FITC, qu'on qualifiera de BGA^{Neg}.

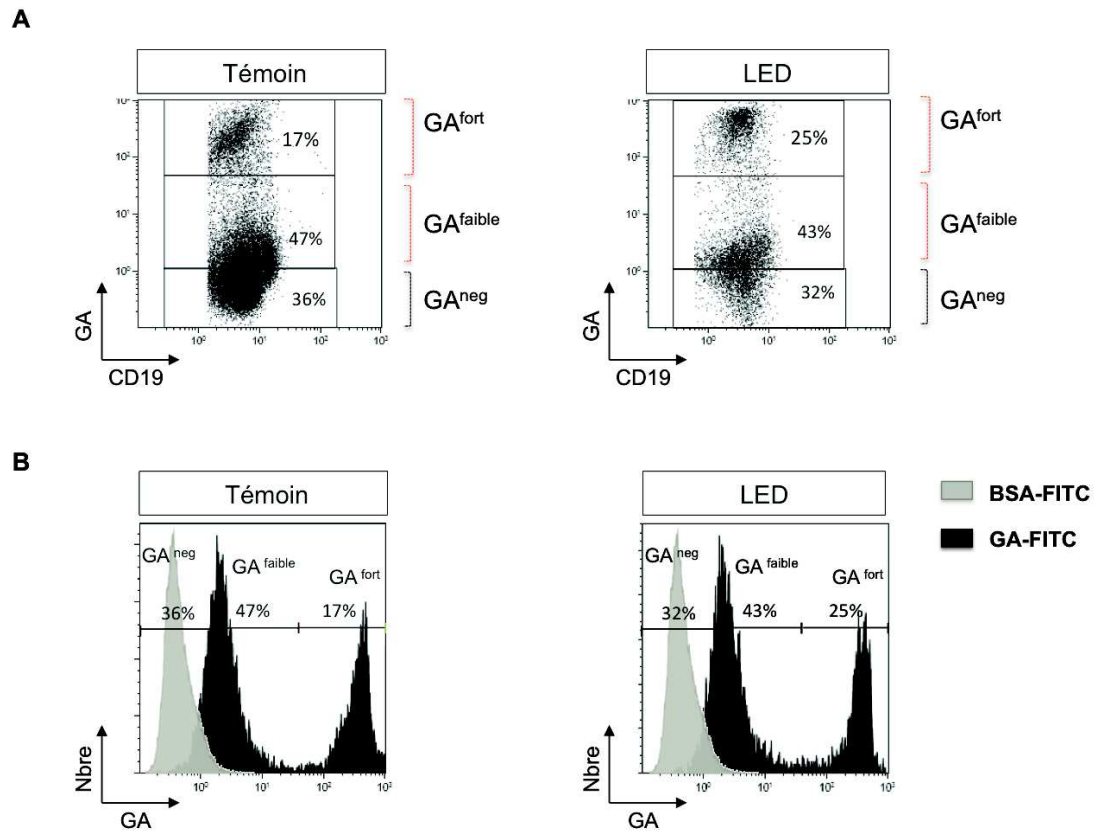


Figure 16 : Caractérisation de la fixation du Glatiramer acetate sur les LB.

Les LB purifiés de témoins sains (n=8) ou de patients LED (n=8) sont incubés durant 1h avec du GA-FITC ou de la BSA-FITC, puis sont marqués avec un AC anti-CD19. (A): Exemple de profil bi-paramétrique de la fixation du GA sur LB CD19⁺. (B): Exemple représentatif d'une analyse mono paramétrique de l'expression du GA-FITC (en noir) ou de la BSA-FITC (en gris) sur les LB CD19⁺. Les pourcentages indiquent les fréquences de cellules incubées avec le GA-FITC. (BSA: Bovine serum albumin, GA: Glatiramer acetate).

Une analyse plus poussée du profil d'expression du GA selon les différentes sous-populations LB a permis de constater que les BGA^{fort} appartiennent majoritairement au compartiment mémoire de phénotype CD19⁺CD27⁺IgD⁺CD38^{faible}CD24^{inter}. Tandis que les BGA^{faible} sont majoritairement retrouvés au sein des LB transitionnels, immatures et matures CD19⁺ IgD⁺CD27^{-/+} CD38^{+/fort} CD24^{inter/fort} (**Figure 17A, 17B**). Face à ces observations, une question se pose : ces variabilités de fixation du GA sur les sous-populations de LB témoignent-elles d'une variabilité d'effets du GA sur la fonction suppressive de celles-ci?

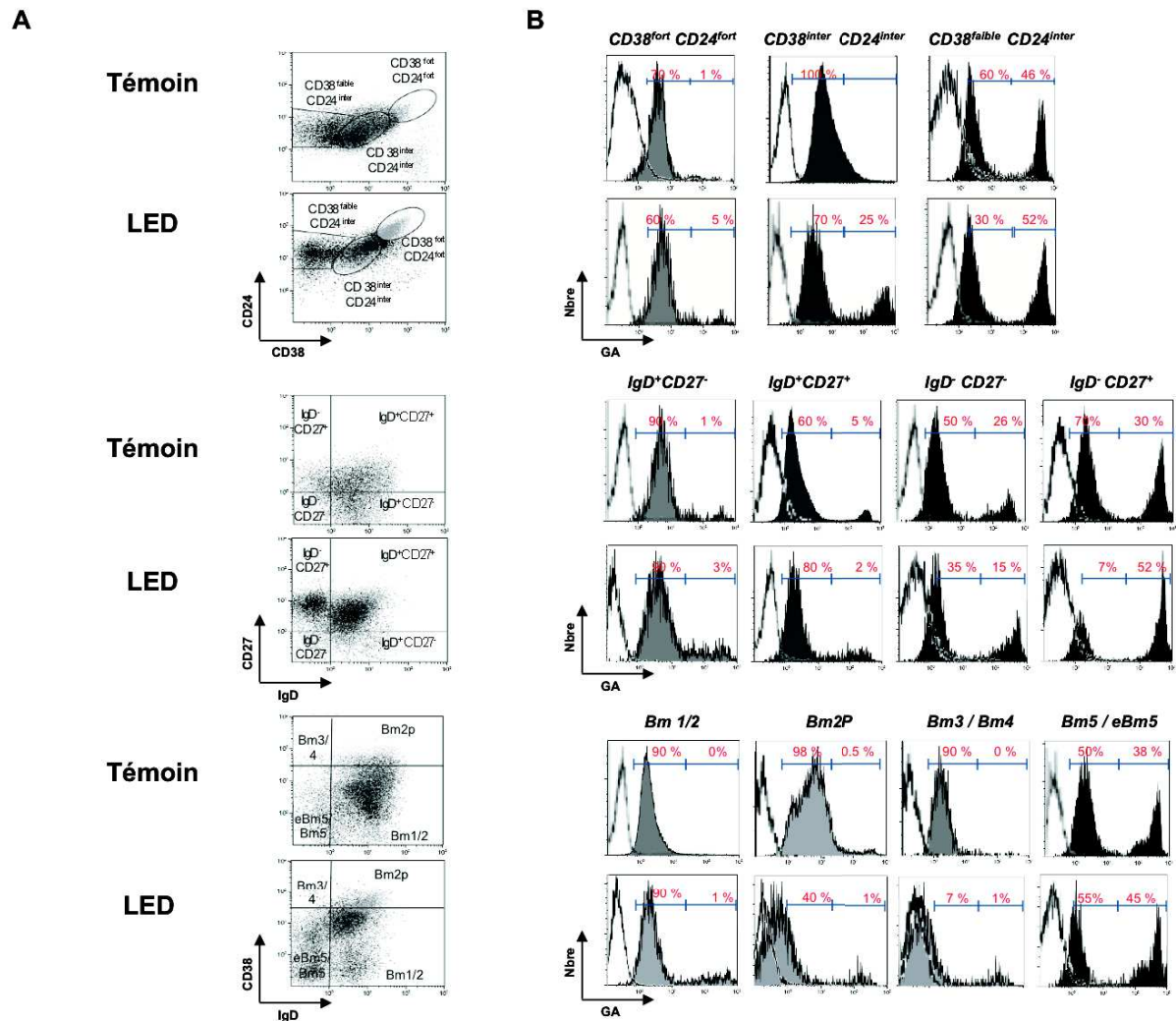


Figure 17 : Les LB fixant fortement le GA sont retrouvés au sein du compartiment mémoire.

Les LB purifiés de témoins sains (n=8) ou de patients LED (n=8) sont incubés durant 1h avec du GA-FITC puis sont marqués avec des combinaisons d'AC anti-CD19, anti-IgD, anti-CD27, anti-CD38 et anti-CD24. L'expression de surface de ces molécules est évaluée sur les cellules CD19⁺. (A): Histogrammes représentatifs de la distribution des sous-populations de LB. (B): Exemples représentatifs d'une analyse mono paramétrique de l'expression du GA en fonction des sous-populations LB considérées. (En Blanc : contrôle négatif avec la BSA-FITC ; en noir et gris: la fixation du GA-FITC, en rouge : pourcentages qui indiquent les fréquences des cellules incubées avec le GA-FITC).

8.1.4 Le GA exerce son effet suppresseur sur le B mémoire *in vitro*

De récentes expériences menées au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence des différences significatives de capacité suppressive parmi les sous-populations de LB chez l'Homme. Notamment, les LB mémoires s'avèrent être de moins bons régulateurs de la prolifération T que les LB transitionnels et matures (Nouel et al. 2014, Nouel et al. 2014). En tenant compte de ces données, nous avons réalisé une expérience préliminaire de déplétion sélective du compartiment LB mémoires à partir des LB issus du sang périphérique d'un témoin sain (**Figure 18A**). En suivant le même protocole expérimental et la même analyse que précédemment, nous montrons que la déplétion des LB mémoires abroge totalement l'effet amplificateur de la régulation induit par le GA (**Figure 18B, 18C**). Ces résultats suggèrent que les LB mémoires sont des acteurs essentiels dans les effets exercés par le GA sur la fonction suppressive.

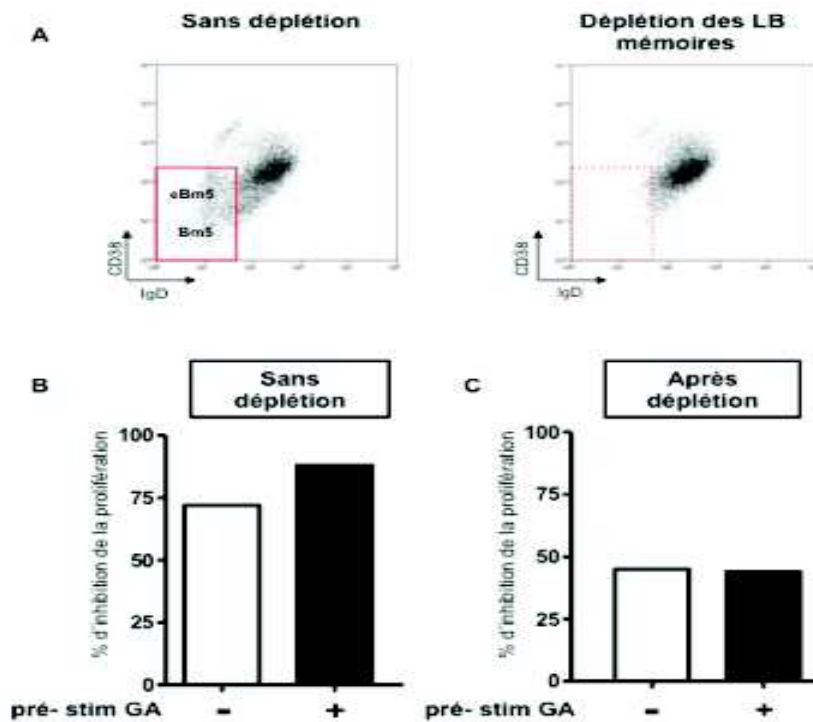


Figure 18 : Rôle du LB mémoire dans l'induction de la fonction Breg en présence de GA.

Les LT de témoins sains sont marqués au CFSE à J₀ puis sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours. Les LB mémoires sont déplétés ou non avant la pré-stimulation de 4h par du GA. Les LB sont ajoutés aux LT et stimulés par du CpG-ODN durant la co-culture de 4 jours. (A): Histogrammes représentatifs de l'expression de l'IgD et du CD38 sur la population CD19⁺ avant et après déplétion des LB mémoires. (B, C): Pourcentage à J₄ d'inhibition de la prolifération des LT par les LB déplétés ou non en LB mémoires selon les conditions de co-culture.

Afin de mieux cerner le mécanisme par lequel le GA influence la fonction Breg des LB mémoires, des quantités importantes de cellules sont nécessaires. En raison de la difficulté à obtenir suffisamment de matériels à partir d'échantillons sanguins, nous avons choisi de poursuivre l'étude à l'aide de LB provenant d'amygdales.

8.1.5 La pré-stimulation des LB d'amygdales par le GA accroît leur fonction Breg

Trois paramètres de la fonction suppressive des Bregs sont explorés sur les LB totaux d'amygdales pré-stimulés ou non par le GA:

- Premièrement, la capacité à contrôler la prolifération T, évaluée par cytométrie en flux.
- Deuxièmement, l'aptitude à inhiber la polarisation des cellules Th1 productrices d'IFN- γ par cytométrie en flux et dosage ELISA.
- Troisièmement, la compétence à sécréter de l'IL-10 par dosage ELISA.
- Nous avons également exploré la réponse humorale induite par le GA en réalisant un dosage des IgG, IgM et IgA sécrétées dans le surnageant après 16h de culture des LB préalablement sensibilisés 4h au GA.

Nos résultats indiquent que de manière similaire aux LB du sang périphérique, la pré-sensibilisation des LB d'amygdales par le GA permet d'augmenter significativement leur capacité de contrôle de la prolifération T puisqu'elle passe de $13,58 \pm 2,79\%$ à $31,47 \pm 2,76\%$ sans CpG (**P<0,01) et de $41,9 \pm 6,3\%$ à $61,47 \pm 5,9\%$ (**P<0,001), (**Figure 19A, 19B**).

Leur capacité d'inhibition de la polarisation Th1 à J₄ est également accentuée. La fréquence de LT CD4⁺ IFN- γ ⁺ passe de $39,62 \pm 5,3\%$ à $25,8 \pm 3,3\%$ (P<0,05) et la concentration d'IFN- γ dans les surnageants passe de 1350 ± 116 U/ml à 1000 ± 108 U/ml, sous l'influence du GA (**Figure 19D**). D'autre part, le GA augmente significativement la capacité de production d'IL-10 des LB (**Figure 19C**) et induit une réponse humorale de type IgG (**Figure 19D**). Ces

résultats démontrent que le GA affecte la fonction cellulaire, cytokinique et humorale des LB, contribuant à renforcer leur potentiel suppressif vis à vis des LT activés.

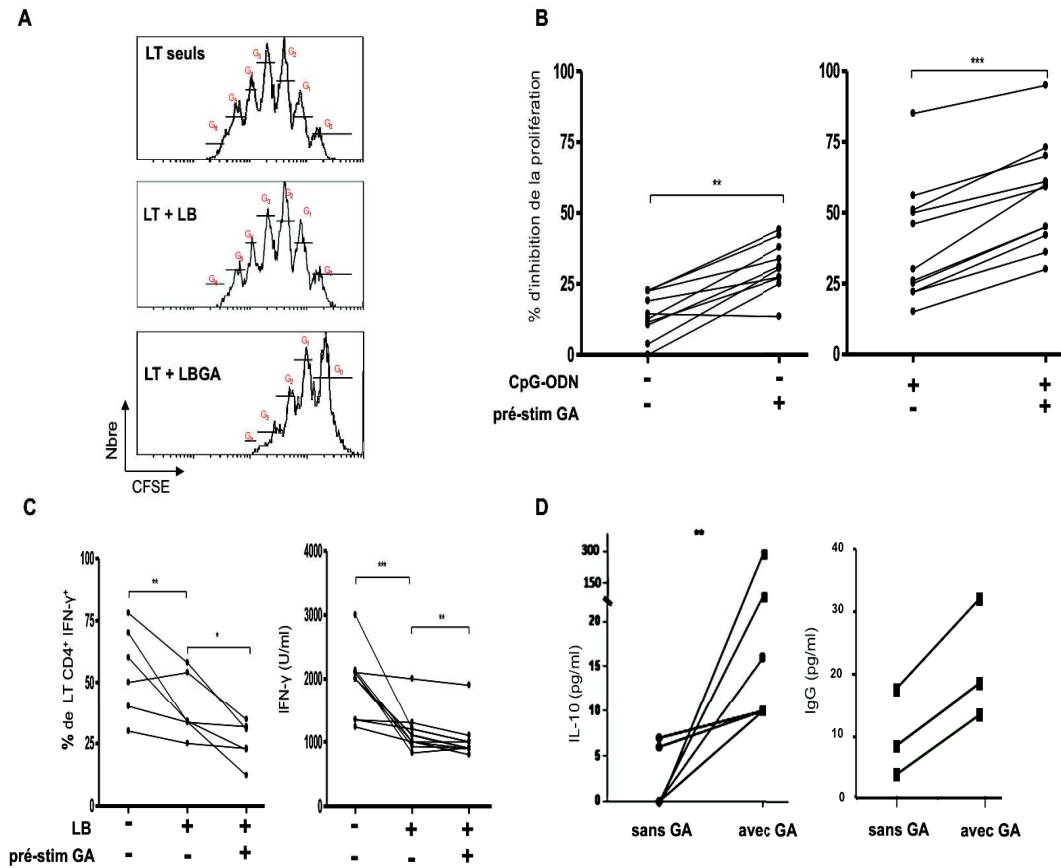


Figure 19 : La pré-stimulation des LB d'amygdales par le GA accroît leur fonction Breg.

Les LT isolés d'amygdales sont marqués ou non au CFSE à J₀, puis sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours en présence ou non de LB autologues et avec ou sans CpG-ODN. Les LB sont préalablement pré-stimulés (LB-GA) ou non (LB) durant 4h par du GA. (A): Exemples représentatifs de 10 expériences du profil de prolifération des LT, en co-culture sans CpG-ODN. (B): Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ par les LB à J4 selon les conditions de culture. (C): Pourcentage des LT CD4⁺ IFN- γ ⁺ et concentration d'IFN- γ dans les surnageants à J4 selon les conditions de culture. (D): Production d'IL-10 et des immunoglobulines IgG dans les surnageants de culture des LB pré-stimulés ou non 4h par du GA *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

8.2 Mode d'action du GA sur les LB

Notre équipe a précédemment démontré que l'inhibition de la prolifération T est assurée par des Tregs naturels ou induits (nTreg, iTreg) Foxp3⁺ dont l'expansion est favorisée par les LB. Le contact cellulaire avec notamment l'interaction CD40 du LB et CD40L du LT est indispensable à ce phénomène (Lemoine et al. 2011). Nous avons donc examiné par cytométrie en flux, l'évolution de la fréquence des LT CD4⁺ Foxp3⁺. L'importance du contact cellulaire a été évaluée par un système de transwell et par des expériences de blocage de la voie CD40/CD40L dans nos différentes conditions de co-culture. Nous montrons que la pré-stimulation des LB par le GA n'affecte pas le pourcentage de Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ présents dans la co-culture (**Figure 20A**). Les expériences de transwell (**Figure 20B**) et de blocage de la voie CD40/CD40L dans la co-culture (**Figure 20C**) confirment que prévenir un contact cellulaire entre les deux protagonistes réduit de moitié les potentialités régulatrices des LB dans les différentes conditions. Ces résultats démontrent que le mode d'action du GA est d'une part Treg Foxp3⁺ indépendant et d'autre part, contact cellulaire dépendant impliquant l'interaction CD40/CD40L, tout en faisant probablement intervenir d'autres mécanismes.

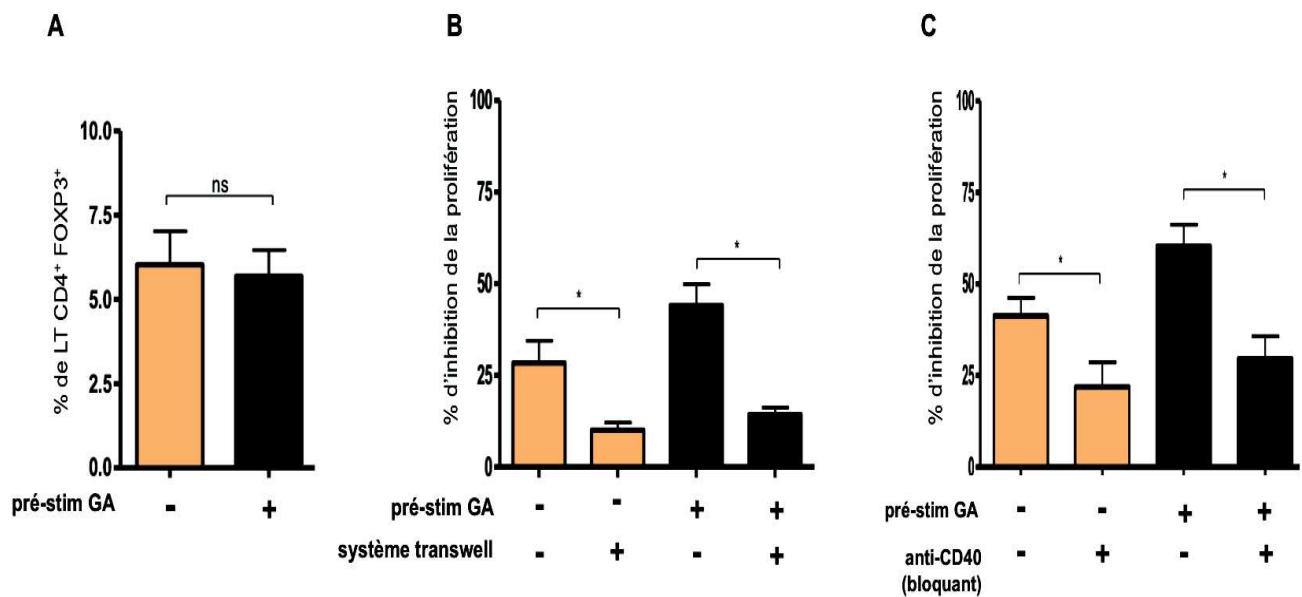


Figure 20 : Le mode d'action du GA est contact cellulaire dépendant mais Treg indépendant.

Les LT isolés d'amygdales sont marqués ou non au CFSE à J₀ puis sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours en présence ou non de LB autologues stimulés par du CpG-ODN et en présence ou non d'AC anti-CD40 bloquant. Les LB sont préalablement pré-stimulés (en noir) ou non (en orange) durant 4h par du GA avant la mise en co-culture. Selon les conditions, un dispositif de transwell est utilisé à J₀ avec les LT situés dans la chambre inférieure et les LB dans la chambre supérieure. (A): Pourcentage de TCD4⁺ Foxp3⁺ à J₄. Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ par les LB à J₄ dans un système de transwell (B), ou en présence d'AC anti-CD40 (C), selon les conditions de co-culture. (n=6 expériences) *P<0,05; ns: non significatif.

8.2.1 Fixation du GA sur les LB d'amygdales

Nous avons complété notre étude par une analyse par microscopie confocale de la fixation du GA-FITC sur des LB totaux purifiés d'amygdales. Comme cela fut observé par cytométrie en flux, nous montrons, que tous les LB ne fixent pas le GA. La proportion de LB fixant le GA augmente avec la concentration de GA pour atteindre un plateau à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 21A**). D'autre part, nous constatons que le GA-FITC se fixe au niveau de la membrane des LB mais également au niveau du cytoplasme des cellules (**Figure 21B**). La présence du GA au niveau intracellulaire est soit le reflet de son internalisation, soit témoigne de la mort des cellules, qui une fois leur membrane cytoplasmique devenue perméable, sont capables de contenir le GA.

Pour répondre à cette dernière interrogation, nous avons parallèlement estimé la toxicité du GA sur les LB. La viabilité cellulaire est appréciée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage des LB par du DRAQ-7. Les cellules B sont sensibilisées avec des concentrations croissantes de GA, puis sont marquées et fixées dans les mêmes conditions que précédemment avant analyse par cytométrie en flux. Le GA ne génère pas de mort cellulaire importante puisque la survie cellulaire varie entre 97% pour la plus faible concentration de GA testée et 89 % pour la plus forte concentration (**Figure 21C**). Ces résultats invalident de ce fait l'hypothèse selon laquelle la présence du GA au niveau du cytoplasme des LB soit le reflet d'une mort cellulaire importante des cellules.

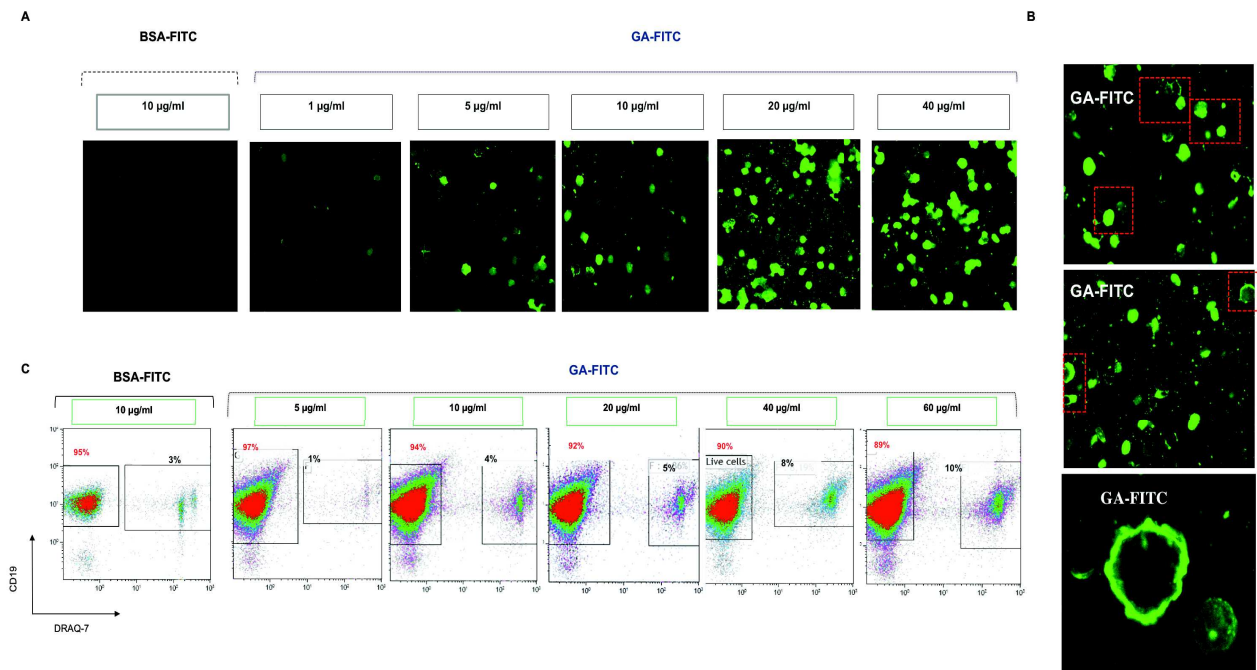


Figure 21 : Caractérisation de la fixation du GA sur les LB.

Des LB d'amygdales sont incubés durant 1h avec de la BSA-FITC ou bien avec des concentrations croissantes de GA-FITC. (A): Les LB sont fixés au formaldéhyde 4% et visualisés par microscopie confocale (grossissement x60). (B): Exemples de fixation membranaire et cytoplasmique du GA. (C): Les LB sont marqués avec un AC anti-CD19 et le DRAQ-7 puis analysés par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules vivantes (en rouge) et de cellules mortes (en noir) sont indiquées (BSA: Bovine serum albumin, GA: Glatiramer acetate).

D'autre part, nous avons souhaité déterminer la nature de cette fixation, en réalisant une étude cinétique de la fixation du GA sur les LB par cytométrie en flux en incubant ces derniers soit à 4°C, soit à 37°C. Après seulement 1 min d'incubation avec le GA à 4°C et à 37°C, les deux populations LB BGA^{faible} et LB GA^{fort} sont observées distinctement par cytométrie en flux (**Figure 22A**). La proportion de ces deux populations s'accroît lorsqu'on prolonge le temps de contact avec le GA. En revanche, au-delà de 2h, les deux populations de LB disparaissent lorsque les incubations sont réalisées à 37°C, alors qu'elles sont toujours présentes dans celles réalisées à 4°C (**Figure 22A**).

Pour expliquer ce phénomène de disparition des LB GA^{faible} et LB GA^{fort}, on peut supposer que le GA-FITC soit dégradé après 2h à 37°C par des enzymes. Cette dégradation induite par des phénomènes actifs n'étant pas envisageable à 4°C, cela expliquerait la persistance de la fluorescence et des deux populations LB dans cette condition. Autrement dit, ces résultats suggèrent que des récepteurs spécifiques (ou non) à la surface des LB permettent une fixation active du GA et son internalisation dans le cytoplasme.

Au-delà de 2h, le GA semble être dégradé par un système thermosensible. Des précédentes études ont indiqué que le GA a la capacité de se fixer sur de nombreuses molécules exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes telles que les glycoprotéines (Koenig et al. 2013), ou encore les molécules HLA-DR (Fridkis-Hareli et al. 1994, Fridkis-Hareli et al. 1995, Fridkis-Hareli et al. 1998). De plus, des travaux réalisés chez la souris ont également évoqué la capacité du GA à se fixer et à être internalisé par le BCR (Jackson et al. 2014, Jackson et al. 2014).

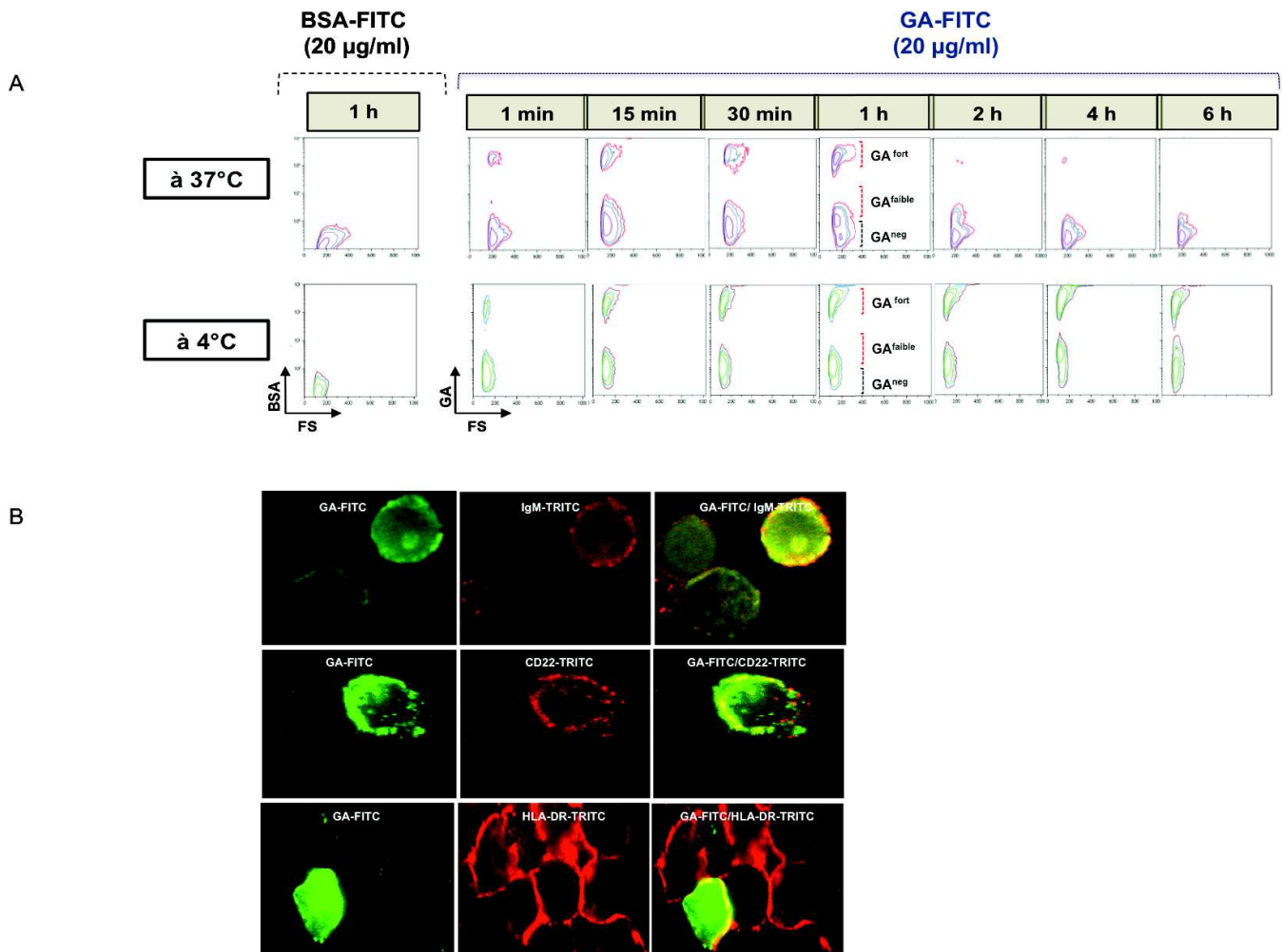


Figure 22 : Cinétique de la fixation GA sur les LB.

Les LB d'amygdales sont incubés soit à 37°C, soit à 4°C avec de la BSA-FITC durant 1h ou bien avec des temps d'incubations croissants de GA-FITC. (A): Les LB sont fixés au formaldéhyde 4% puis sont analysés par cytométrie en flux en fonction de la taille des cellules LB. (B): Les LB sont marqués avec le GA-FITC et un AC anti-CD22 ou anti-HLA-DR ou anti-IgM révélés par un AC anti-Ig-TRITC. Les LB sont ensuite fixés au formaldéhyde 4% et enfin visualisés par microscopie confocale (grossissement X100). FS: Forward Scatter, BSA: Bovine serum albumin, GA: Glatiramer acetate.

En tenant compte de ces observations, nous avons examiné par microscopie confocale la fixation du GA-FITC sur les molécules HLA-DR, les IgM et les glycoprotéines CD22 exprimées à la surface des LB d'amygdales. Nous montrons que le GA co-localise avec le BCR et est internalisé, co-localise également avec la glycoprotéine CD22 et avec les molécules HLA-DR exprimées par les LB (**Figure 22B**). En accord avec la littérature, le GA est donc en mesure de se fixer sur diverses molécules. Toutefois, bien que tous les LB expriment ces molécules, tous les LB ne fixent pas nécessairement le GA. Un exemple frappant est celui de la co-localisation du GA avec les molécules HLA-DR seulement à la surface de certains LB (**Figure 22B**).

Face à ces observations, plusieurs interrogations : y a-t-il un facteur déterminant la fixation du GA sur les LB mémoires ? si oui lequel ? Quel est l'impact d'une telle variabilité de fixation sur les LB ? Et notamment de quelle manière ces fixations affectent-elles la fonction suppressive du LB ? De nombreuses observations relatives à la fixation et l'internalisation du GA sur les molécules HLA-DR sont relatées dans la littérature (Harp et al. 2008, Harp et al. 2010). Nous avons donc choisi d'explorer plus particulièrement l'importance de cette fixation dans notre modèle de régulation *in vitro*.

8.2.1 Rôle de la fixation du GA sur les molécules HLA-DR dans la régulation

A l'aide d'un anticorps bloquant anti-HLA-DR, nous avons empêché l'accès aux sites de fixation soit au cours de l'étape de sensibilisation de 4h des LB avec le GA, soit durant la co-culture de 4 jours avec les LT. Sans pré-sensibilisation par le GA, le blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR n'affecte pas les capacités suppressives intrinsèques des LB (**Figure 23A, 23B**). D'autre part, le blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR avant cette sensibilisation n'affecte pas les propriétés suppressives des LB qui restent tout aussi efficace dans

l'inhibition de la prolifération des LT (**Figure 23A**). Ce qui suggère que la fixation du GA sur les molécules HLA-DR n'est pas nécessaire à l'étape de sensibilisation de 4h.

En revanche, la fixation du GA sur les molécules HLA-DR s'avère indispensable au développement de la fonction Breg ultérieurement puisque le blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR durant la période de contact avec les LT affecte significativement les propriétés suppressives des LB (**Figure 23B**). Il est probable que la fixation initiale du GA induisant une fonction Breg soit indépendante des molécules HLA-DR, mais permette son internalisation puis ensuite sa présentation aux LT dans le contexte des molécules HLA-DR pour contrôler leur prolifération.

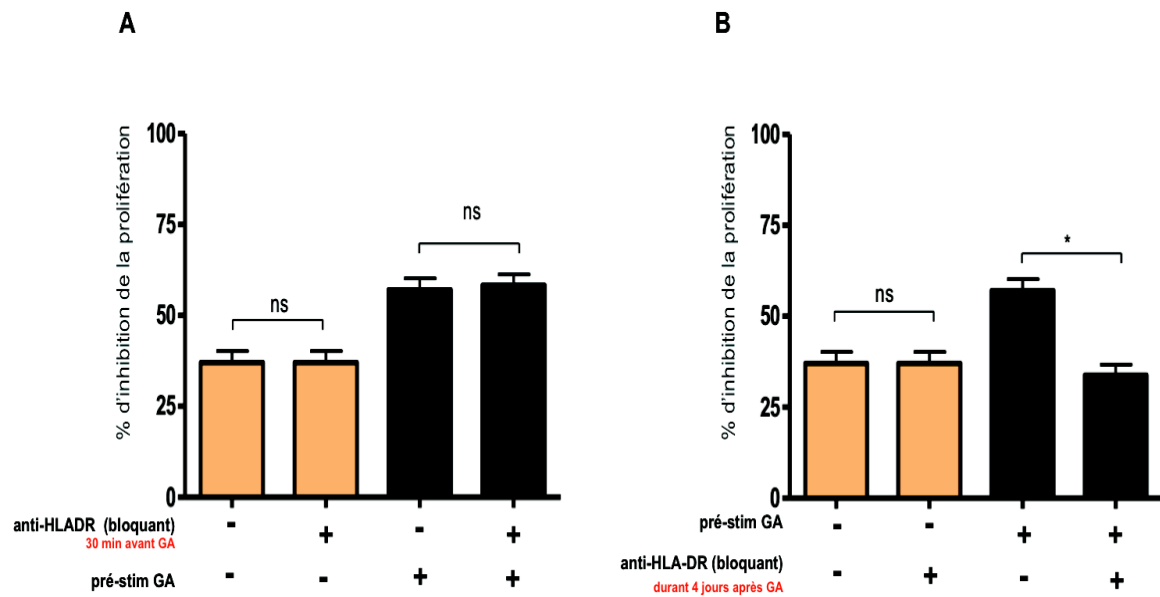


Figure 23 : Rôle des molécules HLA-DR dans l'induction de la fonction Breg par le GA.

Les LT isolés d'amygdales sont marqués au CFSE à J_0 puis sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours en présence de LB autologues stimulés par du CpG-ODN. Les LB sont préalablement pré-stimulés ou non durant 4h par du GA avant la mise en co-culture. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT par les LB est mesuré après 4 jours. (A): Un AC anti-HLA-DR bloquant est ajouté 30 min avant l'étape de pré-stimulation de 4h des LB. Les LB sont lavés puis mis en co-culture avec les LT. (B): Les LB sont pré-stimulés (en noir) ou non (en orange) 4h avec le GA, lavés puis mis en co-culture avec les LT en présence de l'AC anti-HLA-DR bloquant durant 4 jours. (n=6 expériences) * $P < 0,05$; ns non significatif.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons supprimé la courte pré-stimulation de 4h en ajoutant directement le GA dans la co-culture. Ces conditions expérimentales permettent donc un contact prolongé du GA avec les LB mais également avec les LT. Nous avons également complété ces expériences en bloquant les sites de fixation aux molécules HLA-DR durant la co-culture. Nous montrons que l'ajout du GA dans la culture simultanément à la stimulation des LT par les AC anti-CD3 et anti-CD28 ne modifie pas la prolifération des LT cultivés seuls durant 4 jours (**Figure 24A**). A notre grand étonnement, et contrairement à ce que nous avons observé suite à une courte pré-stimulation LB, des effets très variables du GA sur la fonction suppressive des LB sont constatés selon les prélèvements. En effet, les résultats révèlent 2 types de réponses opposées.

1. Dans un premier groupe de donneurs, l'ajout du GA dans la co-culture augmente significativement l'activité suppressive des LB (**Figure 24B**). Le contact prolongé avec le GA n'augmente pas davantage ce potentiel régulateur par apport aux conditions de pré-sensibilisation de 4h puisqu'on enregistre une augmentation de 20 % du pourcentage d'inhibition dans les deux cas de figures (**Figure 24B vs Figure 19B**).
2. D'autre part, dans un second groupe de donneurs, la présence du GA soit entraîne une réduction faible mais non significative de la fonction suppressive, soit annule entièrement la fonction suppressive des LB (**Figure 24B**).

Nous montrons également que l'augmentation de la fonction régulatrice par le GA est associée à une augmentation de la production d'IL-10 dans le surnageant de co-culture du groupe 1, tandis que la baisse de la fonction régulatrice en présence de GA est associée à une réduction de la concentration d'IL-10 dans le second groupe (**Figure 24C**). Par ailleurs, empêcher les sites d'accès aux molécules HLA-DR par l'AC bloquant annule l'effet supprimeur apporté par le GA dans le premier groupe mais n'a pas d'effet significatif dans le second groupe (**Figure 24D**).

De plus, l'augmentation de l'effet Breg semble être tributaire ou reliée à une proportion plus importante de LB mémoires à J_0 dans le groupe 1 par rapport au groupe 2 (**Figure 24E**).

Enfin, nous avons mis en évidence des différences d'expression de la molécule HLA- DR selon les groupes. La réduction de la fonction Breg semble tributaire ou est associée à une faible expression de HLA-DR à J_0 dans le groupe 2 par rapport au groupe 1 (**Figure 24F**). L'augmentation de la fonction Breg est observée pour les LB affichant une importante expression de HLA-DR.

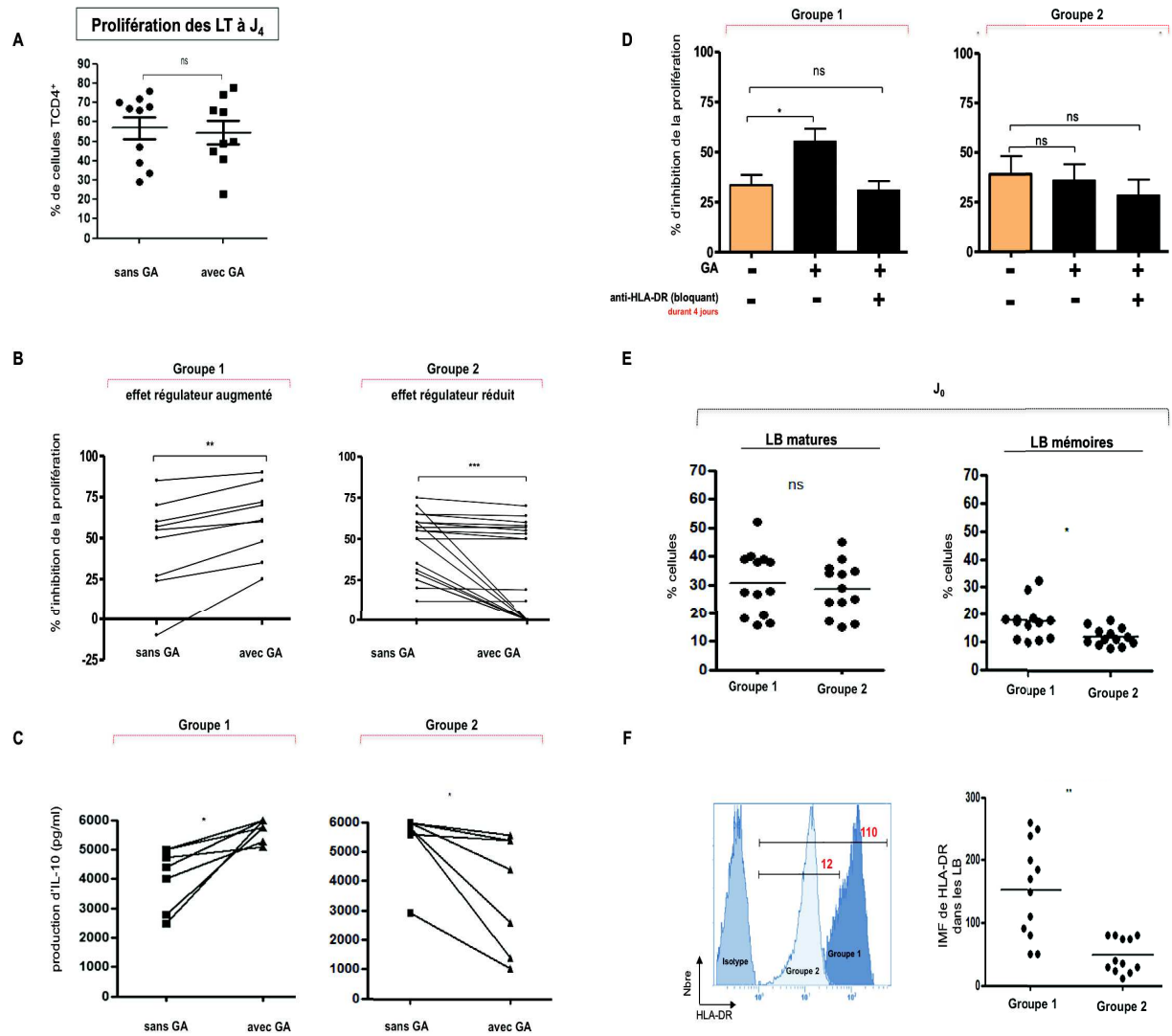


Figure 24 : Effet du GA dans l'interaction LB/ LT.

Les LT isolés d'amygdales (n=26 donneurs) sont marqués au CFSE puis stimulés dès J₀ par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours en présence ou non de LB autologues stimulés par du CpG-ODN et en présence ou non d'AC anti-HLA-DR bloquant. Selon les conditions le GA est ajouté ou non dans la co-culture à J₀. (A): Pourcentage de prolifération des LT CD4⁺ seuls à J₄. (B): Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ par les LB répartis en 2 groupes de donneurs selon le type de réponse suppressive observée. (C): Concentration d'IL-10 dans les surnageants de co-culture à J₄ pour les 2 groupes de donneurs. (D): Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ par les LB à J₄ en présence d'AC anti-HLA-DR bloquant selon les conditions de culture dans les deux groupes de donneurs. (E): Pourcentage de LB matures et LB mémoires à J₀ dans les 2 groupes de donneurs. (F): Exemple représentatif (à gauche) et moyenne (à droite) de l'expression des molécules HLA-DR des LB à J₀ pour les 2 groupes de donneurs. L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) est indiquée (en rouge) *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns: non significatif.

En conclusion, selon les donneurs, ces expériences suggèrent que la stimulation prolongée par le GA peut soit augmenter soit réduire les potentialités suppressives des LB. Ces effets sont probablement dépendant d'une part de la proportion de LB mémoires présente et d'autre part de l'intensité d'expression des molécules HLA-DR à la surface des LB totaux à J_0 . Nous confirmons que l'augmentation de la fonction Breg est associée à un processus qui met en jeu la fixation ou la présentation du GA sur les molécules HLA-DR. Par contre, la réduction de la fonction Breg semble être le résultat d'un processus indépendant des molécules HLA-DR.

Des résultats surprenants qui mettent en évidence la complexité du mécanisme d'action du GA face à l'hétérogénéité des répartitions des sous-populations LB selon les donneurs. Un point important à retenir de ces expériences est que le LB mémoire reste vraisemblablement est une cible privilégiée du GA. En raison de la complexité de l'interprétation des résultats par ce modèle de co-culture, nous avons choisi à cette étape du projet de poursuivre les investigations uniquement sur le modèle de pré-sensibilisation des LB par le GA.

8.2.2 Fixation du GA sur les LB d'amygdales.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le GA se fixe et cible particulièrement le compartiment LB mémoire, pour en modifier sa fonction et son phénotype, dans le but de lui procurer une fonction suppressive plus efficace. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences comparatives de la fonction Breg des LB mémoires triés par apport à des LB matures triés provenant de LB d'amygdales. Au préalable, nous avons tout d'abord vérifié par cytométrie en flux que dans les organes lymphoïdes secondaires tout comme pour le sang périphérique, la population de LB mémoire Bm5/eBm5 comprend les LB GA^{fort} , tandis que les LB GA^{faible} sont surtout représentés par les LB matures (naïfs/ activés) Bm1 et Bm2. De fait, deux populations de LB sont capables de fixer le GA. L'une faiblement l'autre fortement, les LB

GA^{faible} et les LB GA^{fort}, respectivement (**Figure 25A**). L'analyse de la distribution des sous-populations LB dans ces deux groupes de cellules a permis de confirmer que les BGA^{fort} appartiennent majoritairement au compartiment mémoire de phénotype CD19⁺CD27⁺IgD⁻CD38⁻, tandis que les LB GA^{faible} sont majoritairement retrouvés au sein des LB matures CD19⁺IgD⁺CD27^{-/+}CD38^{+/fort} (**Figure 25B, 25C**). Il faut noter que tous les LB du compartiment mémoire ne fixent pas fortement le GA, puisqu'on y trouve notamment quelques LB GA^{faible}, LB GA^{neg} (**Figure 25D**). Au total, les LB mémoires des organes lymphoïdes secondaires représentent très majoritairement la population LB GA^{fort} (**Figure 25D**).

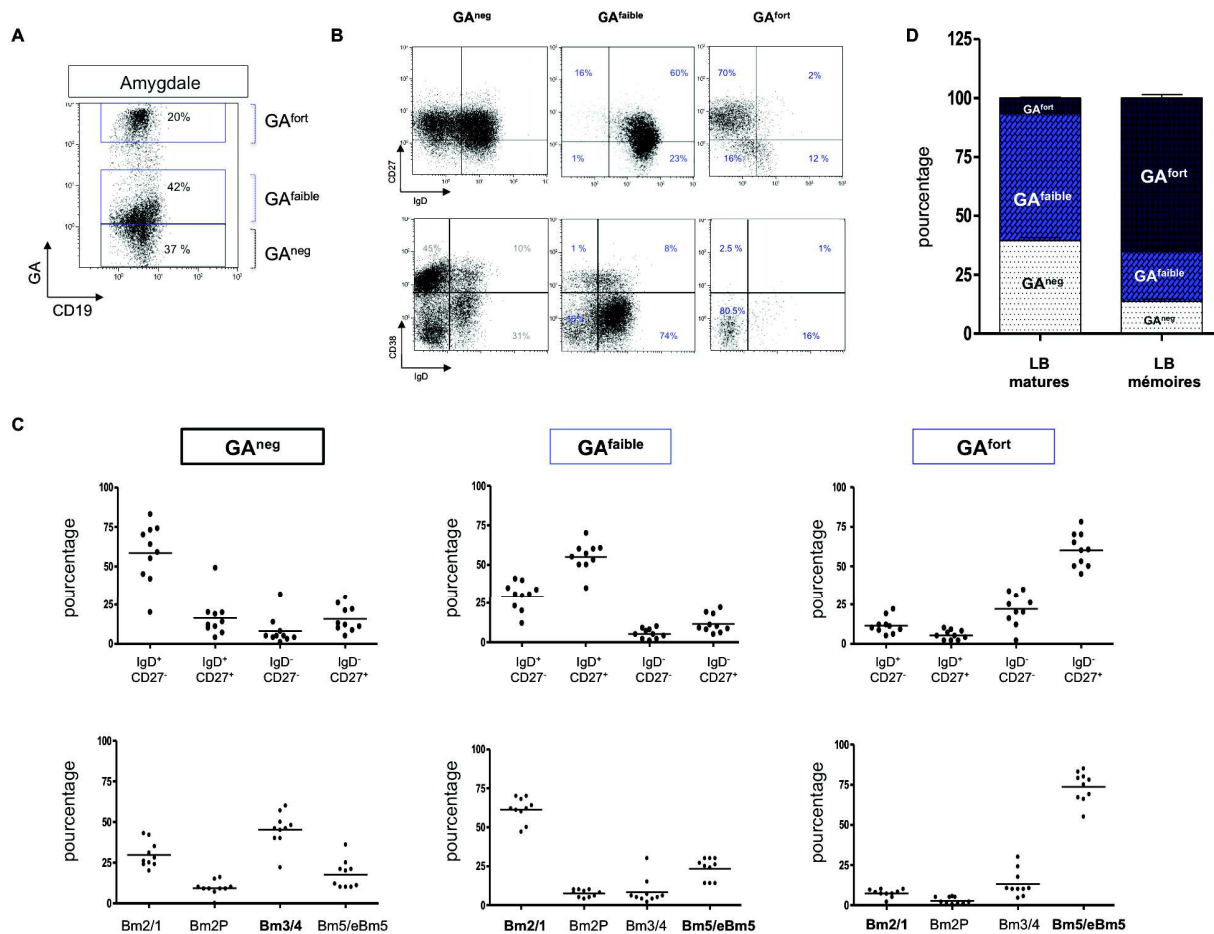


Figure 25 : Les B mémoires des organes lymphoïdes secondaires fixent fortement le GA.

Les LB isolés d'amygdales (n=10) sont incubés avec du GA-FITC puis sont marqués avec des combinaisons d'AC anti-CD19, anti-IgD, anti-CD27, anti-CD38. (A): Histogramme représentatif de la fixation du GA sur les LB CD19⁺. (B): Histogrammes représentatifs de la distribution des sous-populations selon les 3 populations de LB fixant le GA. (C): Répartition des sous-populations LB fixant le GA, évalué parmi les 3 populations de LB GA^{neg}, GA^{faible} et GA^{fort}. D: Distribution des cellules GA^{neg}, GA^{faible} et GA^{fort} dans les LB mémoires et dans les LB matures.

8.2.3 Effet du GA sur les sous populations LB matures et mémoires d'amygdales

Nous avons donc réalisé des expériences comparatives de la fonction Breg des LB mémoires par rapport à des LB matures. Pour ce faire, les deux sous-populations de LB sont triées et pré-stimulées séparément avec le GA durant 4h, avant leur mise en co-culture avec les LT autologues. Les LT marqués à J_0 par du CFSE sont stimulés durant 4 jours par anti-CD3 et anti-CD28 tandis que les cellules B sont conjointement stimulées par du CpG-ODN durant la co-culture. La mesure de la fonction Breg est évaluée sur la capacité des LB à inhiber la prolifération des LT autologues et à réduire la production de la cytokine Th1 $\text{IFN-}\gamma$. Les expériences comparatives de la fonction Breg des LB mémoires par rapport à des LB matures isolés d'amygdales confirment les précédentes observations de notre laboratoire (Nouel et al. 2014, Nouel et al. 2014). En effet, nous montrons que les LB matures sans pré-stimulation GA réduisent significativement le pourcentage de LT en prolifération contrairement aux LB mémoires (**Figure 26A**).

De manière intéressante, nous montrons que la pré-sensibilisation par le GA permet d'augmenter le potentiel régulateur des LB mémoires triés mais n'affecte aucunement celui des LB matures triés (**Figure 26A et 26B**).

Les LB mémoires sont de moins bons régulateurs par rapport aux LB matures mais deviennent statistiquement aussi efficaces que ces derniers grâce au GA (**Figure 26B**). Le calcul du taux d'inhibition de la prolifération T après la sensibilisation par le GA indique une augmentation d'un facteur 1,2 pour les LB matures et de 2,8 pour les LB mémoires (**Figure 26C**) (* $P < 0.05$). Le même constat est fait sur la capacité de contrôle de la réponse Th1. Sous l'effet du GA, la capacité de contrôle de la polarisation Th1 des LB mémoires est significativement améliorée avec une réduction plus importante de la production d' $\text{IFN-}\gamma$ dans la co-culture, tandis

que le GA n'influence pas cette propriété sur les LB matures (**Figure 26D, 26E**). Le calcul du taux d'inhibition de la production d'IFN- γ en réponse au GA est de 0,9 pour les LB matures tandis qu'il est de 1,8 pour les LB mémoires (**Figure 26F**), (*P<0.05).

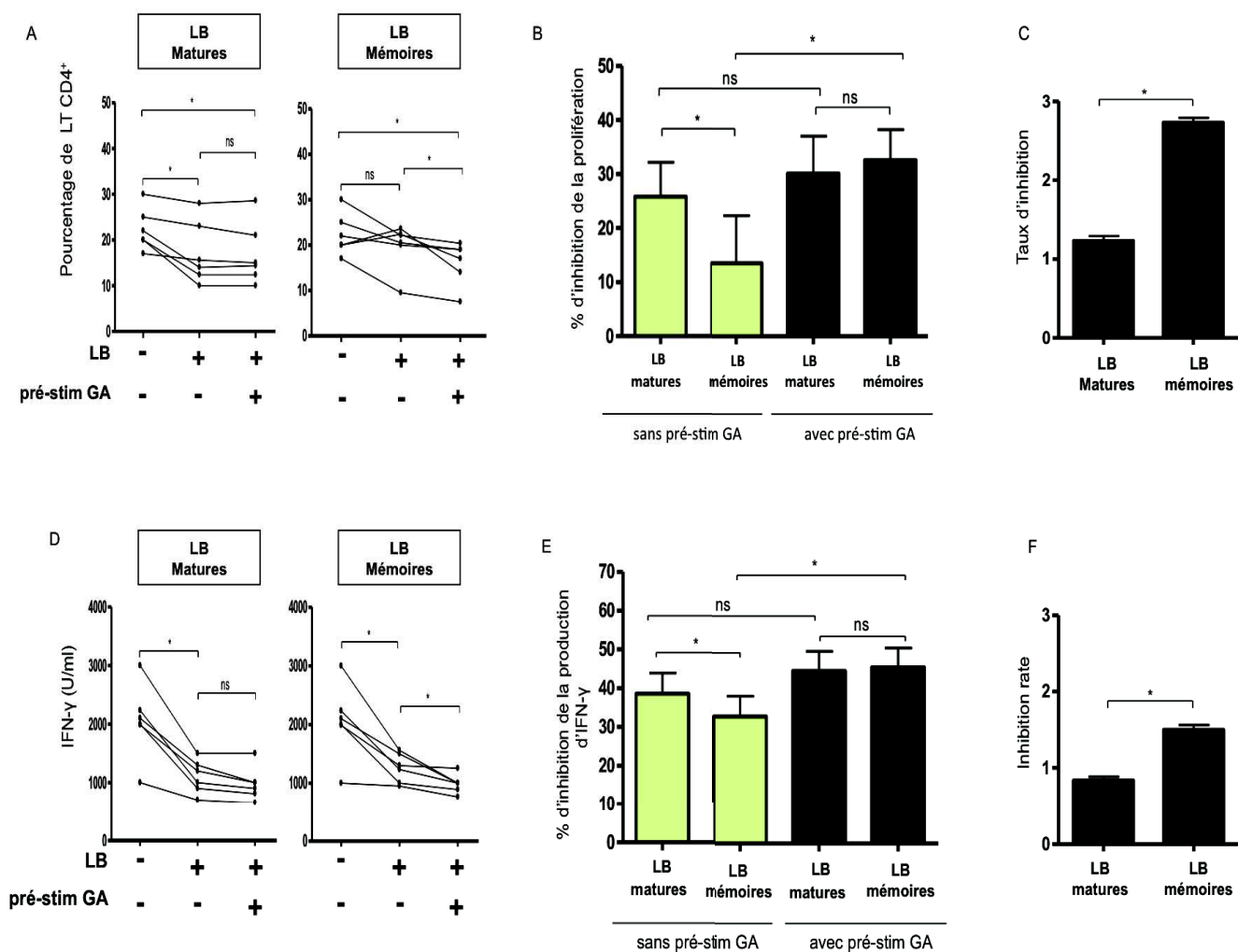


Figure 26 : Le GA accroît uniquement la fonction régulatrice des LB mémoires.

Les LT isolés d'amygdales (n=6) marqués au CFSE à J₀ sont stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours en présence ou non de LB triés autologues. Les LB mémoires et matures sont triés à partir de LB totaux, pré-stimulés (en noir) ou non (en vert) par du GA durant 4h, lavés, mis en co-culture à J₀ avec les LT autologues en présence de CpG-ODN. Le surnageant de co-culture est récupéré pour un dosage de la production d'IFN-γ par ELISA. (A): Pourcentage de LT en prolifération en présence de LB matures ou mémoires à J₄, mesurée par cytométrie en flux. (B): Pourcentage d'inhibition de la prolifération des LT par les LB matures ou mémoires à J₄, selon les conditions de co-culture. (C): Taux d'augmentation de la régulation de la prolifération T induit par la GA dans les LB matures et mémoires. (D): Concentration d'IFN-γ à J₄ dans le surnageant selon les conditions de co-culture mesurée par ELISA. (E): Pourcentage d'inhibition de la production d'IFN-γ à J₄ selon les conditions de co-culture. (F): Taux d'augmentation du contrôle de la production d'IFN-γ induit par la GA dans les LB matures et mémoires. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Des expériences menées au sein de notre laboratoire ont mis en évidence que l'IL-10 produit par les LB exerce un rôle dans la fonction inhibitrice des cytokines Th1 (Lemoine et al. 2011). De plus, de précédentes études ont montré que les LB mémoires produisent moins d'IL-10 que les LB matures (Duddy et al. 2007). En tenant compte de ces observations, nous avons évalué la production de l'IL-10 par les LB mémoires et LB matures. Les deux sous-populations triées sont pré-stimulées ou non par du GA durant 4h, lavés, puis stimulées avec un AC anti-CD40 multimérique et du CpG-ODN durant 4 jours. L'analyse du dosage de la production d'IL-10 mesurée par ELISA confirme une capacité de production d'IL-10 plus importante des LB matures (3110 ± 3 pg/ml) par rapport aux LB mémoires ($2025 \pm 4,2$ pg/ml; $P < 0.05$). Le GA augmente significativement la production d'IL-10 uniquement pour les LB mémoires qui passe à $3755 \pm 6,5$ pg/ml ($P < 0.05$), (**Figure 27A**). Ce niveau de production se situe au même niveau que celui des LB matures. Le calcul du taux d'augmentation de la production d'IL-10 apporté par le GA indique sans surprise une augmentation significative de 2,1 pour les LB mémoires contre 1,2 pour les LB matures ($*P < 0.05$), (**Figure 27B**).

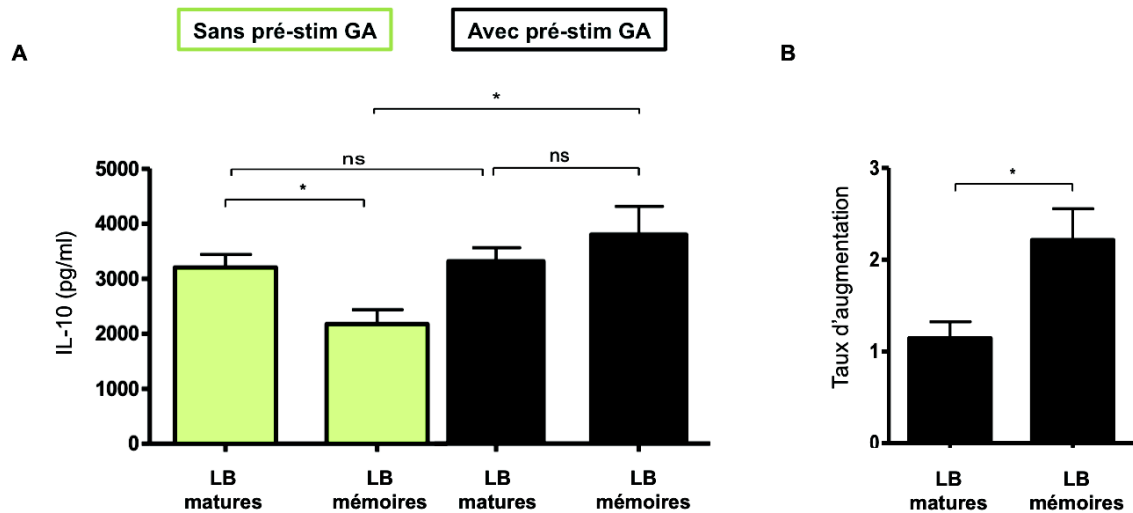


Figure 27 : Le GA induit une augmentation de la production d'IL-10 dans les LB mémoires.

Les LB mémoires et matures triés à partir de LB totaux d'amygdales (n=6), sont pré-stimulés (en noir) ou non (en vert) par du GA durant 4h, lavés, puis stimulés avec un AC anti-CD40 multimérique et du CpG-ODN durant 4 jours. Les surnageants de culture sont récupérés à J₄ pour un dosage par ELISA de la production d'IL-10. (A): Production d'IL-10 selon les conditions de culture. (B): Taux d'augmentation de la production d'IL-10 induit par la GA dans les LB matures et mémoires *P<0.05; ns: non significatif.

8.2.4 Effet du GA sur la survie et la prolifération des LB d'amygdales

Ces expériences démontrent que la pré-stimulation par le GA des LB mémoires favorise la production d'IL-10. Celle-ci résulte vraisemblablement d'une augmentation de la compétence des LB mémoires existants à produire de l'IL-10, mais elle peut aussi provenir d'une expansion et/ou d'une meilleure survie des LB mémoires grâce au GA. De plus, il n'est pas à exclure que les deux phénomènes puissent être conjoint également. Pour le vérifier, nous avons analysé les paramètres de prolifération par un marquage au CFSE, ainsi que les paramètres de viabilités cellulaires par un marquage DRAQ-7, des LB mémoires triés et sensibilisés au GA et nous les avons comparé à ceux des LB matures. Nos résultats montrent que la prolifération des LB mémoires est plus faible que celle des LB matures (**Figure 28A**). Le GA semble même bloquer la prolifération des LB mémoires. En revanche, il n'affecte aucunement celle des LB matures (**Figure 28A**). L'analyse de la survie cellulaire indique un pourcentage de survie cellulaire de $86 \pm 4\%$ pour les LB matures et de $72,7 \pm 2,5 \%$ pour les LB mémoires (**Figure 28B**). Sous l'influence du GA aucune des populations triées ne semblent en être affectées avec $87 \pm 2\%$ de cellules vivantes concernant les LB matures et $74 \pm 4\%$ pour les LB mémoires (**Figure 28B**). Ces observations écartent l'hypothèse d'un effet particulier du GA sur une expansion préférentielle et/ou une meilleure survie des LB mémoires. Si le GA augmente le potentiel régulateur ainsi que la production constitutive d'IL-10 dans les LB mémoires, nos résultats suggèrent que son mode d'action passe par une modification des compétences des cellules cibles vers un phénotype associé à la régulation et à la production d'IL-10. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité approfondir l'analyse de l'expression des molécules associées à la production d'IL-10 et à la fonction suppressive.

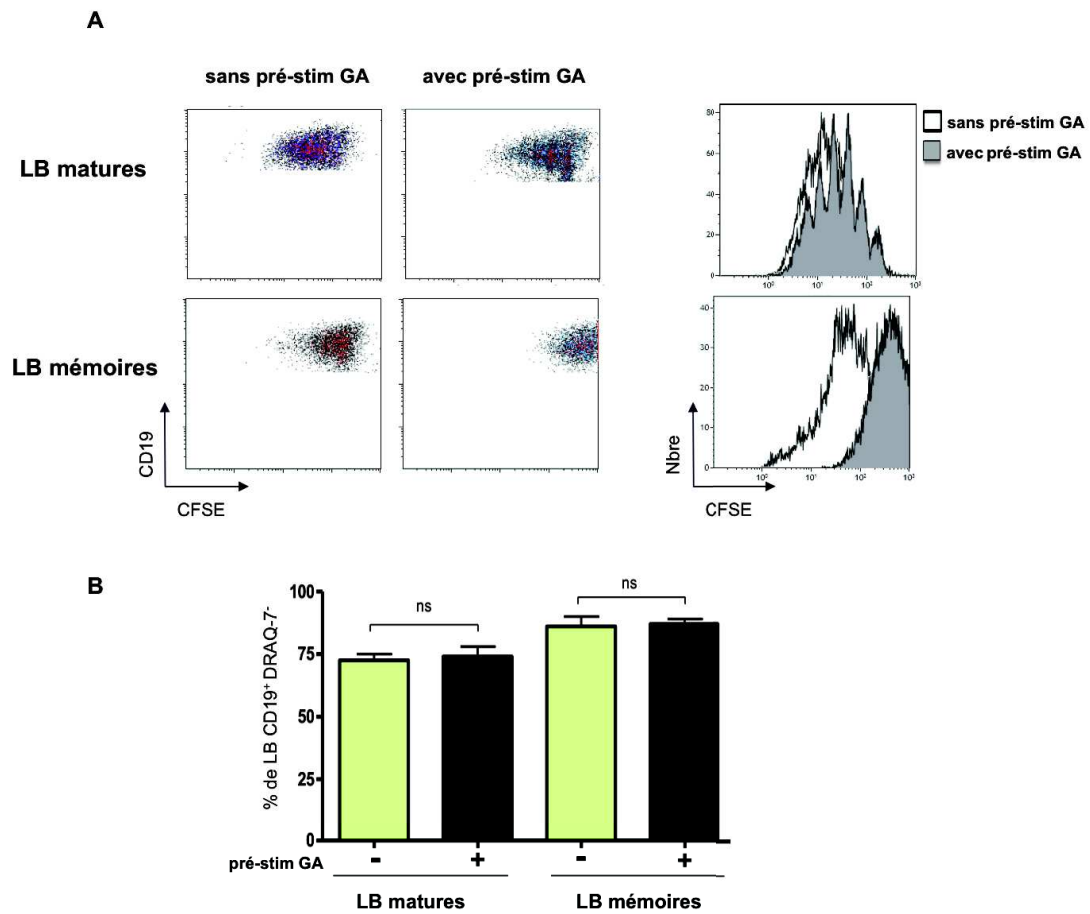


Figure 28 : Effet du GA sur la prolifération et la survie des LB.

Les LB matures et LB mémoires d'amygdales (n=6) sont triés puis pré-sensibilisés (en noir) ou non (en vert) au GA durant 4h. Les cellules sont ensuite marquées ou non au CFSE à J₀ puis stimulées avec un AC anti-CD40 multimérique et du CpG-ODN durant 4 jours. À J₄ les cellules sont marquées avec un AC anti-CD19. La réponse proliférative des LB est évaluée à J₄ par la dilution du CFSE des cellules CD19⁺. La viabilité des LB non marqués au CFSE est analysée en marquant les cellules avec un AC anti-CD19 et le DRAQ-7. (A): Exemple de profil de dilution du CFSE des LB CD19⁺ selon les conditions de culture. (B): Pourcentage des LB vivants CD19⁺DRAQ-7⁻ à J₄ selon les conditions de culture. ns: non significatif.

8.3 Effet du GA sur le phénotype Breg

Notre équipe a précédemment démontré que l'expression de CD5 par les LB est corrélée à la production d'IL-10 et également corrélée à la fonction suppressive du Breg. Les LB CD5⁺ humains possèdent en effet une meilleure capacité inhibitrice de la prolifération T par rapport aux LB CD5⁻ (Lemoine et al. 2011).

Notre équipe a également décrypté la voie intracellulaire impliquée et a montré que la molécule CD5 contrôle la production d'IL-10 par les facteurs de transcription STAT-3 et NFAT2 (Garaud et al. 2009, Garaud et al. 2011). Au vu de ces observations, nous avons analysé par cytométrie en flux, après 4 jours de co-culture avec les LT autologues, l'expression de la molécule CD5 à la surface des LB mémoires et matures triés et pré-sensibilisés au GA. Nos résultats indiquent une faible proportion de cellules CD5⁺ parmi les LB mémoires comparativement aux LB matures ($P < 0,05$) sans pré-sensibilisation au GA (**Figure 29A**). Avec une pré-sensibilisation au GA, une augmentation significative de l'expression de CD5 est observée à la surface des LB mémoires seulement (**Figure 29B et 29C**).

La recherche d'autres marqueurs associés à la fonction des Bregs et à la production d'IL-10 nous a amené à nous intéresser à l'IL-21R, puisque très récemment, deux études majeures ont révélé l'importance de l'IL-21 et de son récepteur sur le LB dans le développement et la fonction des Bregs chez la souris et chez l'Homme (Yoshizaki et al. 2012, Yang et al. 2013). L'expression de plusieurs molécules impliquées dans la régulation telles que IDO, ou encore des molécules inhibitrices de l'activation et de la prolifération T telles que CTLA-4 et PD-1 ont également été étudiées.

Tout d'abord l'analyse de l'expression de ces molécules sur les LB matures et mémoires sans pré-sensibilisation par le GA a permis de mettre en évidence pour la première fois des

différences d'expressions de ces molécules à la surface des sous-populations LB. Les LB appartenant au compartiment mature et à potentiel régulateur plus fort expriment significativement plus de CD5 mais aussi d'IL-21R ou encore de PD-1 par rapport aux LB mémoires ($P < 0,05$) (**Figure 29A**). En revanche aucune différence d'expression n'est retrouvée pour les molécules CTLA-4 et IDO (**Figure 29A**). D'autre part, l'analyse de l'expression de ces molécules sur les LB triés pré-sensibilisés au GA révèle là aussi une hausse significative de l'IL-21R et de PD-1 mais pas de CTLA-4 ni de IDO dans les LB mémoires (**Figure 29B, 29C**). En revanche le phénotype des LB matures reste là encore inchangé.

En résumé ces expériences montrent que le GA exerce deux actions majeures sur le LB mémoire. Le GA génère d'une part une meilleure capacité d'inhibition de la prolifération T, dont le mécanisme est associé à un contact cellulaire et est HLA-DR dépendant. D'autre part, le GA favorise un contrôle plus efficace de la polarisation Th1 qui est très probablement associé à sa capacité à induire la production d'IL-10 dans ces cellules. Enfin, le GA modifie le phénotype des LB mémoires puisque l'expression de molécules impliquées dans la fonction suppressive et dans la production d'IL-10 telles que CD5, IL-21R, ou encore PD-1 est significativement augmentée dans les LB mémoires.

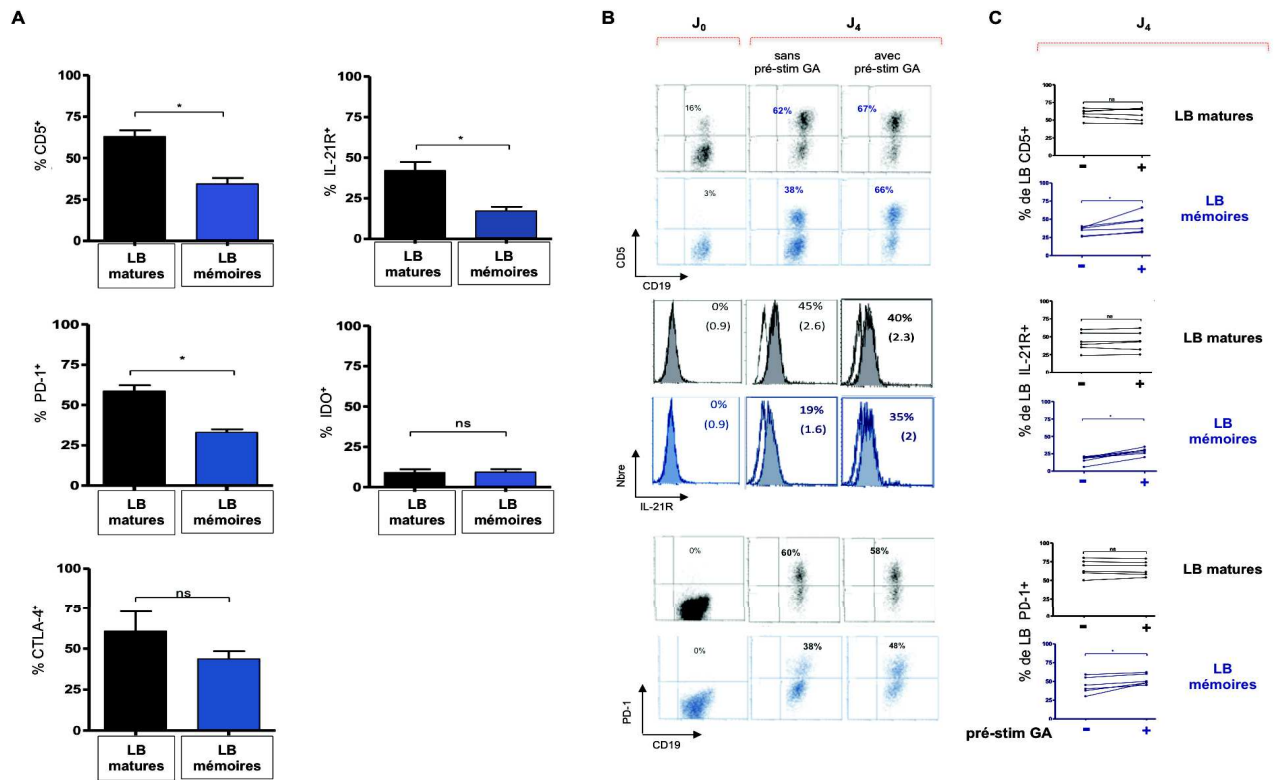


Figure 29 : Le GA est responsable du phénotype Breg des LB mémoires des organes lymphoïdes secondaires.

Les LB mémoires (en bleu) et matures (en noir) d'amygdales (n=6) sont triés à J₀ puis stimulés par du CpG-ODN durant 4 jours en co-culture avec des LT autologues eux-mêmes stimulés par deux AC anti-CD3 et anti-CD28. Les cellules sont marquées à J₄ avec des combinaisons d'AC anti-CD19, anti-IL21R et anti-CD5, anti-CD19 et anti-IDO, ou alors anti-CD19, anti-PD-1 et anti-CTLA-4. (A): Pourcentage de cellules CD5⁺, IL-21R⁺, PD-1⁺, IDO⁺ et CTLA-4⁺ dans les LB mémoires et matures à J₄ de co-culture avec les LT autologues. (B): Exemple de profil d'expression des molécules CD5, IL-21R, PD-1 à J₀ et J₄ dans les LB matures et mémoires selon les condition de co-culture. (C): Comparaison du pourcentage de cellules B positives selon leur pré-stimulation ou non pas le GA. *P<0.05; **P<0.01; ns: non significatif.

8.4 Effet du GA sur le phénotype des Bregs chez les patients LED

Les modifications phénotypiques et fonctionnelles soutenues par le GA sur les LB mémoires nous paraissent essentielles dans un contexte pathologique comme celui du LED. En effet, chez les patients LED, il est clairement établi un pourcentage plus faible de LB naïfs/matures et un pourcentage plus fort de LB mémoires et de plasmocytes par rapport aux témoins sains (Anolik et al. 2004, Anolik et al. 2004, Anolik et al. 2009). Nos résultats suggèrent que l'effet exclusif du GA sur le compartiment LB mémoire sera ainsi d'autant plus important et robuste chez les patients LED.

Par ailleurs, il est évoqué dans la littérature une réduction de la fréquence des sous-populations LB exprimant l'IL-21R chez les patients LED par rapport aux témoins sains. Cette faible expression est d'ailleurs corrélée à une évolution plus rapide de la maladie (Mitoma et al. 2005, Good et al. 2006). Etant donnée l'importance de l'IL-21R sur le LB dans le développement et la fonction des Bregs (Yoshizaki et al. 2012, Yang et al. 2013). Nous avons évalué le niveau d'IL-21R à J_0 et à J_4 dans des co-cultures de LB et LT provenant soit de patients LED soit de témoins sains et conjointement nous avons étudié les effets du GA sur l'expression de ce récepteur à J_4 sur les LB.

L'analyse de l'expression de l'IL-21R à J_0 a permis de mettre en évidence sa faible expression chez les témoins et sa quasi-inexistence à la surface des LB chez les patients LED (**Figure 30A**). Après co-culture, et sans pré-sensibilisation au GA, elle reste très faible pour les patients LED à J_4 de co-culture ($3,98 \pm 1\%$), tandis qu'elle est significativement induite chez les témoins sains avec une valeur de $62,3 \pm 4,3\%$; $*P < 0,05$ (**Figure 30B**). La pré-sensibilisation au GA entraîne une restauration de l'IL21R à la surface des LB de patients LED ($15,08 \pm 1,25\%$;

P<0,05), ainsi qu'une légère mais significative augmentation chez les témoins ($67,88 \pm 3\%$; P<0,05), (**Figure 30C**).

D'autre part, les LB des patients LED présentent un défaut de contrôle de la différenciation Th1 et de la prolifération T (Blair et al. 2010), (Lemoine et al. 2011). Sachant que l'IL-10 produit par les Bregs exerce un rôle prépondérant dans la fonction inhibitrice des cytokines Th1 (Lemoine et al. 2011), nous avons étudié les effets du GA sur la production d'IL-10 ainsi que sur l'expression de la molécule CD5 à J₄ dans des co-cultures de LB et LT provenant de patients LED.

Sans pré-sensibilisation au GA, nos résultats indiquent une production d'IL-10 dans la co-culture de $264,9 \pm 52,6$ pg/ml (**Figure 30D**). La pré-sensibilisation au GA entraîne une augmentation significative de la production d'IL-10 qui passe à $456,4 \pm 27,5$ pg/ml; P<0,05. Cette augmentation est parallèlement associée à une hausse significative de la proportion de LB CD19⁺ CD5⁺. En effet, sans pré-sensibilisation GA, $33,5 \pm 5,4\%$ des LB expriment CD5 et sous l'influence du GA, ce pourcentage passe à $44,5 \pm 5,8\%$ (**P<0,01) (**Figure 30E**).

D'autre part, sous l'influence du GA aucune différence d'expression n'est retrouvée pour les molécules CTLA-4, IDO ou encore PD-1 sur les LB des patients LED (**données non montrées**).

En résumé, ce modèle *in vitro* d'étude de la fonction Breg démontre que dans un contexte pathologique de LED, un médicament comme le GA peut restaurer une fonction suppressive défectueuse. Une courte étape de pré-sensibilisation par le GA a permis de restaurer la fonction suppressive de la prolifération T des LB de patients LED. Le GA est donc capable d'inverser intrinsèquement le comportement défectueux et le phénotype des LB. Ainsi, il restaure l'expression de l'IL-21R et augmente l'expression de CD5 à la surface des LB des patients. Ces

molécules dont on sait qu'elles sont associées à la production d'IL-10 et à la fonction suppressive des LB chez l'Homme, sont probablement à l'origine des effets bénéfiques du GA sur la fonction Breg dans ce modèle.

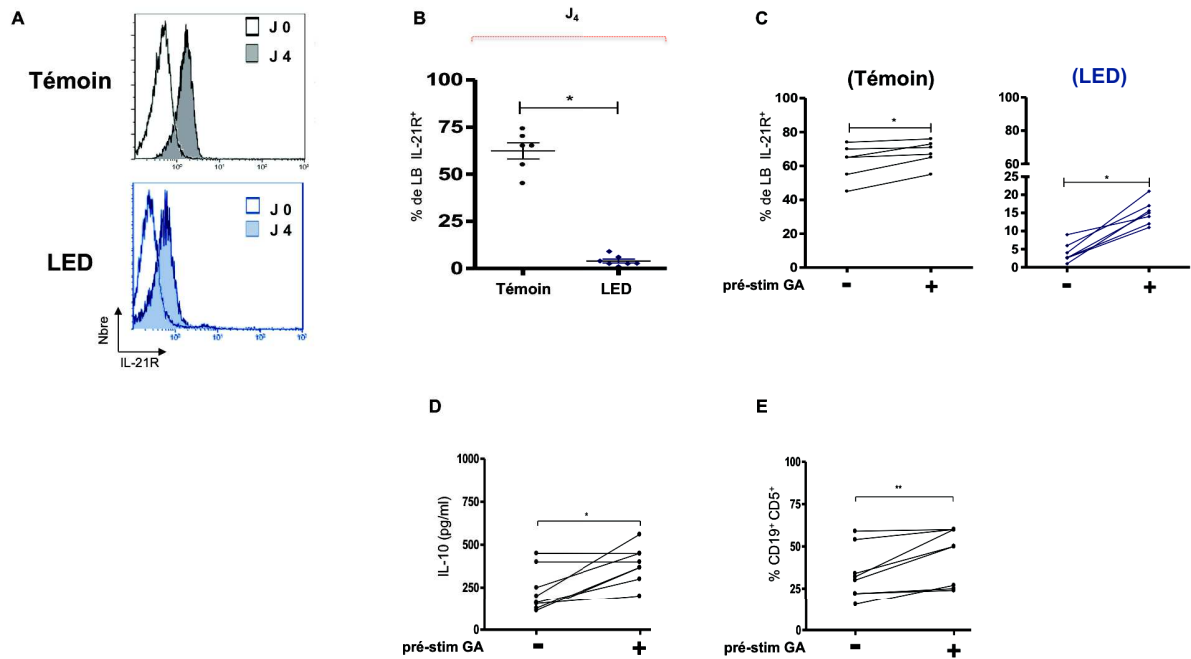


Figure 30 : La pré-stimulation des LB lupiques par le GA favorise un phénotype Breg.

Les LB totaux purifiés de patients LED (n=6) ou de témoins sains (n=6), sont sensibilisés ou non au GA durant 4h, lavés puis mis en co-culture avec des LT autologues stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 durant 4 jours. Les LB sont stimulés durant les 4 jours par du CpG-ODN. A J₀ et J₄, les cellules sont marquées avec une combinaison d'AC anti-CD19, anti-IL21R et anti-CD5. (A): Exemple de profil d'expression de l'IL-21R à J₀ et J₄ à la surface des LB de témoins sains et de patients LED. (B): Pourcentage des LB CD19⁺IL21R⁺ chez les témoins sains et chez les patients LED à J₄. (C): Pourcentage des LB CD19⁺ IL21R⁺ chez des témoins sains et des patients LED à J₄ selon les conditions de co-culture. (D): Production d'IL-10 dans les surnageants de co-cultures chez les patients LED à J₄ selon les conditions de co-culture. (E): Pourcentage des LB CD19⁺ CD5⁺ chez les patients LED à J₄ de co-culture. *P<0.05; **P<0.01; ns: non significatif.

Ces résultats font l'objet d'un article en cours de rédaction qui sera soumis au *Journal of Autoimmunity*. « GLATIRAMER ACETATE RESTORES THE DEFECTIVE ACTIVITY OF SLE REGULATORY B CELLS »

DISCUSSION

9. Discussion

Le LED est une pathologie auto-immune complexe présentant de nombreuses anomalies immunitaires, en particulier au niveau des LB (Grammer and Lipsky 2003). L'équipe de Blair en 2010 sera la pionnière à faire la démonstration d'une baisse fonctionnelle des Bregs chez les patients LED (Blair, Norena et al. 2010). Une observation substantielle qui sera par la suite partagée par d'autres équipes (Lemoine, Morva et al. 2011), (Gao, Dresel et al. 2014).

Une question majeure découle de ce constat : est-il possible de restaurer le défaut de régulation d'un LB dans un tel contexte pathologique, ou au contraire, sommes-nous face à un état irréversible de la cellule B ? Ce travail de thèse a pour vocation de répondre à cette problématique et d'identifier un procédé permettant de palier à ce déficit de la régulation B. Au moyen d'un médicament immuno-modulateur tel que le GA, nous montrons que la restauration fonctionnelle des Bregs chez les malades est possible. Ce médicament modifie intrinsèquement le profil du LB pour qu'ensuite il en amplifie ou en restaure le cas échéant ses propriétés régulatrices. A l'aube de l'engouement accordé aux procédés d'expansion des Bregs chez la souris à des fins thérapeutiques, nos observations chez l'Homme en pathologie présentent un intérêt certain et pourraient avoir une portée thérapeutique avérée. En effet, l'une des modalités thérapeutiques d'avenir serait de restaurer des Bregs défaillants. Des LB pourraient ainsi être « conditionnés » à la régulation avant leur réinjection au patient. La conception et la standardisation de tels procédés chez l'Homme permettraient de cibler le point de contrôle du système immunitaire et agir en amont du processus auto-immun.

9.1 Etude de l'induction de la fonction régulatrice des LB humains

9.1.1 Dans un contexte physiologique

Afin d'étudier l'effet du GA sur la fonction Breg dans un contexte pathologique de LED, nous avons au préalable confirmé, dans un modèle d'étude *in vitro*, le défaut fonctionnel des Bregs des malades en comparaison à un groupe de témoins sains. Ce modèle permet d'étudier l'effet du LB sur le contrôle de la prolifération des LT autologues. Pour ce faire, les LT et les LB sont ajoutés dans un système de co-culture à un ratio 1:1. Les LT sont activés par deux AC anti-CD3 et anti-CD28, tandis que les LB sont stimulés ou non via du CpG-ODN. Ce modèle de régulation validé au sein de notre laboratoire a comme postulat que la fonction régulatrice peut être progressivement acquise par les LB au contact des LT activés.

La stimulation des LT avec les deux AC anti-CD3 et anti-CD 28 permet de mimer l'activation et la prolifération d'un LT suite à sa rencontre avec un antigène. Au début de la co-culture, un dialogue B-T s'établit avec un rôle activateur des LB sur la prolifération T. Progressivement, l'activation et la prolifération T déclinent laissant place à un contrôle et une régulation immunitaire. C'est à ce moment que le Breg prend part au processus. Notre hypothèse est que les LB qui au départ sont pro-activateurs de la réponse immunitaire, acquièrent au fur et à mesure de leur contact avec les LT une fonction régulatrice qui sera appréciable dès le 4ème jour de culture. Nous consolidons l'observation selon laquelle, chez des individus sains, les LT humains activés induisent dans les LB une fonction régulatrice ayant pour finalité d'inhiber les LT eux-mêmes. De plus, la stimulation du TLR-9 des LB par du CpG-ODN permet de renforcer ce contrôle des LT.

D'autres modèles *in vitro* d'étude de la régulation des LB sur la prolifération des LT existent dans la littérature. Ainsi au laboratoire, nous avons déjà élaboré un modèle dans lequel

les LB sont pré-stimulés par des fibroblastes transfectés par le gène du CD40L humain en présence de CpG-ODN pendant 3 jours (Lemoine, Morva et al. 2011). Ces LB sont ensuite ajoutés en culture avec des LT totaux stimulés par anti-CD3 et anti-CD28 pendant 5 jours supplémentaires. Dans ce contexte, les LB inhibent fortement la prolifération des LT dès le jour 4. L'équipe de Tretter quant à elle pré-stimule des LB par un super-antigène le SAC pendant 3 jours (Tretter, Venigalla et al. 2008). Après 4 jours de culture avec des LT CD4⁺ stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, ces LB inhibent également la prolifération des LT. L'équipe de Bouaziz ajoute pour sa part directement des LB stimulés par du CpG-ODN et un anti-Ig aux LT CD4⁺CD25⁻, eux-mêmes stimulés par un anti-CD3 (Bouaziz, Calbo et al. 2010). Les auteurs observent ici une forte inhibition de la prolifération des LT à J4, non visible lorsque les LB ne sont pas activés. Ces différentes études soulignent l'importance de l'activation du LB dans sa capacité à générer un effet régulateur. Concernant notre modèle d'étude *in vitro* analysé à 4 jours de culture, les LB provenant des contrôles sains et sans aucune stimulation acquièrent un niveau faible de régulation. Une interprétation possible de cette observation est que malgré l'absence de stimulation exogène, des stimulations peuvent être apportées aux LB par le contact des LT, comme le CD40L, fortement exprimé sur les LT activés. Ce qui finalement peut expliquer que des LB, sans stimulation, soient susceptibles d'acquérir un faible pouvoir régulateur. En revanche, la stimulation des LB par du CpG-ODN est suffisante pour déceler une inhibition conséquente de la prolifération T au 4ème jour de culture. Ainsi, ce modèle avec ou sans stimulation des LB par du CpG-ODN confère l'avantage de ne pas nécessiter de pré-activation et permet de ne pas ajouter un paramètre additionnel à l'évaluation des effets du GA.

9.1.2 Dans un contexte pathologique (Le LED)

Chez les patients LED, nous confirmons que les LB sont incapables de réguler la prolifération des LT autologues. Nous savons que la stimulation TLR-9 active la fonction Breg en induisant une production d'IL-10 (Sun, Deriaud et al. 2005). Nous montrons ici que cette stimulation ne favorise pas la régulation, contrairement aux témoins sains.

Selon Wong et collaborateurs, la production d'IL-10 par les LB des patients LED est réduite sous stimulation TLR-9. Paradoxalement, ces auteurs, et bien d'autres avant eux, montrent que l'expression de TLR-9 est plus élevée et que la fréquence des cellules CD19⁺ TLR-9⁺ est plus importante chez les patients par rapport aux témoins sains (Wong, Wong et al. 2010). D'après Papadimitraki, il y a une augmentation du pourcentage des LB CD19⁺ TLR-9⁺ dans le sang périphérique des patients lupiques atteints d'une forme active de la maladie. Par ailleurs, le traitement de ces patients conduit à augmenter le niveau du TLR-9 dans les LB (Papadimitraki, Choulaki et al. 2006). Ces auteurs s'accordent à dire qu'il existe un lien entre la réponse TLR-9 des LB et la sévérité de la maladie, insinuant dès lors un défaut de la voie de signalisation de TLR-9 dans les LB. Cette hypothèse sera définitivement accréditée tout récemment grâce aux travaux de l'équipe de Sieber. L'équipe enregistre une réduction des niveaux protéiques et de réponse lors d'une stimulation de la voie de signalisation du TLR-9 dans les LB de patients lupiques atteints d'une forme sévère de la maladie. En réponse à une stimulation TLR-9, sont observées une baisse de la prolifération et de l'activation des LB et une réduction de leur capacité de production de cytokines notamment l'IL-10 et l'IL6 par rapport aux cellules de donneurs sains. D'autres analyses ont révélé une corrélation inverse entre les cytokines produites par les LB stimulés par le TLR9 et les titres d'auto-AC anti-ADN_{db} (Sieber, Daridon et al. 2014). La capacité des LB lupiques à produire des cytokines lors de l'engagement du TLR9 devient moins

efficace à mesure que l'activité de la maladie s'aggrave. Selon ces auteurs, cela pourrait correspondre soit à un état d'épuisement du signal TLR-9 chez ces patients ou bien à un stade d'évolution de la maladie dans lequel les LB seraient en phase de devenir tolérants à des stimulations TLRs pour la production de cytokines lorsque la maladie s'aggrave.

Dans notre travail, nous montrons que cette déficience des LB de LED à répondre à la stimulation TLR-9 ne s'arrête pas à l'incapacité de production de l'IL-10, mais a également des conséquences sur leur capacité à réguler la prolifération des LT. Ces observations s'ajoutent ainsi aux conclusions émises par notre équipe et avancées par d'autres selon lesquelles il existe bien une réelle anomalie fonctionnelle lymphocytaire B lupique (Blair, Norena et al. 2010); (Lemoine, Morva et al. 2011) ; (Gao, Dresel et al. 2014). Effectivement, l'équipe de Blair fut la première à montrer que la régulation par les LB de la production de cytokines pro-inflammatoires par les LT est déficiente chez les patients LED (Blair, Norena et al. 2010). Notre équipe conforte ensuite cette observation en montrant que la déficience ne s'arrête pas à celà mais concerne également l'inhibition de la prolifération T (Lemoine, Morva et al. 2011). Les LB pré-activés des patients LED sont inaptes à inhiber la prolifération des LT autologues. Il s'agit d'un phénomène singulier, propre aux LB des patients LED, puisqu'une fonction Breg persiste dans les autres maladies auto-immunes examinées (Lemoine, Morva et al. 2011).

Il est très intéressant de constater que selon l'équipe de Mauri, une restauration de la fonction Breg des LB transitionnels T2M2P par une stimulation *in vitro* du CD40 est possible chez la souris. Les auteurs démontrent que le transfert adoptif de cette population Breg conditionnée *in vitro* inhibe le développement du lupus dans les souris receveuses par l'induction de Tregs producteurs d'IL-10 (Blair, Chavez-Rueda et al. 2009). Cela dit la même équipe montrera que chez l'Homme une stimulation du CD40 de la population Breg défectueuse durant 72h concède à

une production insignifiante d'IL-10 en comparaison avec les cellules provenant des témoins sains (Blair, Norena et al. 2010). Ce qui va dans le sens des observations de Lemoine qui ajoute que cette stimulation des LB de lupiques ne permet pas de restaurer la fonction Breg sur la prolifération T (Lemoine, Morva et al. 2011). Bien que Mauri et collaborateurs n'aient pas évalué ici la restauration de la fonction régulatrice sur la prolifération des LT et bien que les protocoles expérimentaux ne soient pas les mêmes (stimulation avec une lignée transfectée par le CD40L vs agoniste CD40 à forte concentration (4µg/ml) et identification des B IL-10⁺ par cytométrie versus dosage IL-10 par ELISA à 72h), ces observations chez la souris ne vont pas dans le même sens que les observations faites par notre équipe, de même que celles présentées dans leur étude chez l'Homme en 2010. Par conséquent, nous voyons bien par cet exemple que la transposition d'observations acquises chez la souris à l'Homme n'est pas toujours possible.

Par la suite, l'équipe de Tretter tout en accréditant ce défaut de la régulation B chez les patients LED, ira plus loin dans la compréhension du processus (Gao, Dresel et al. 2014). Pour ce faire, elle réalise des co-cultures hétérologues avec soit des LT, soit des LB issus de témoins sains. Ce qui a permis de démontrer que les Bregs issus de personnes saines sont capables de réguler la prolifération des LT de patients lupiques. Alors qu'en revanche, les LT de témoins sains prolifèrent normalement en présence des Bregs de lupiques. L'hypothèse d'une insensibilité des LT lupiques est ainsi écartée et le défaut fonctionnel spécifique et singulier des Bregs chez ces patients conforté (Gao, Dresel et al. 2014).

Il est important de souligner que quel que soit le mode d'activation *in vitro* de la fonction Breg : soit la pré activation de leur CD40, ou encore l'ajout d'IL-2 endogène et un super-antigène dans la culture ou bien la stimulation dans notre cas du TLR-9 par l'ajout du CpG-ODN dans la co-culture, nous parvenons aux mêmes observations. Le Breg des patients LED est

irréremédiablement réfractaire à la régulation. Les trois voies majeures d'activation de la fonction Breg : le CD40, le BCR et TLR semblent déficientes dans les LB des malades.

9.2 Restauration de la fonction régulatrice des LB *in vitro*

La seconde étape du projet fut de s'affranchir de ces 3 modes de stimulation et de trouver une alternative d'activation de la fonction régulatrice B. Cette alternative fut de stimuler les LB des malades avec un médicament immuno-modulateur, le GA décrit comme un potentiel activateur de la fonction Breg chez la souris. En effet, chez la souris EAE, le GA a montré une capacité à induire des cellules B productrices d'IL-10 qui participent à la suppression de la réponse Th1 et Th17 en faveur d'un balance Th2 (Kala, Miravalle et al. 2011). Plus saisissant encore, tout récemment chez l'Homme, ce médicament a montré aussi une capacité à restaurer la production d'IL-10 dans les LB des patients atteints de la sclérose en plaques (Ireland, Guzman et al. 2014).

9.2.1 Etude de la fonction régulatrice des LB pré-stimulés par le Glatiramer acetate

Notre postulat de départ est que ce médicament est capable d'accroître et le cas échéant de restaurer, la fonction régulatrice des LB aussi bien chez les témoins sains que chez les patients. Afin de le vérifier, nous avons testé l'influence de ce médicament sur la fonction régulatrice B en procédant à une stimulation de 4h des LB par le GA à une concentration de 20 µg/ml, avant leur mise en culture avec des LT autologues. Le choix de la concentration fut déterminé suite à une analyse de la survie des LB en présence de concentrations croissantes du médicament. La fixation du temps de contact à 4h fut déterminée en fonction de l'observation selon laquelle une internalisation substantielle du médicament par les LB est enregistrée entre 2 et 4h d'incubation.

Conformément à l'étude de Jackson, dès 4h d'incubation avec les LB, le médicament est fortement détecté au niveau intracellulaire (Jackson et al. 2014).

Ainsi, nous montrons qu'en comparaison avec une pré-stimulation dans du milieu de culture seulement, la pré-stimulation des LB par le GA permet d'accroître la fonction Breg des LB des témoins sains. Plus intéressant encore, elle permet de restaurer une fonction Breg quasi-inexistante dans les LB des patients lupiques.

Une équipe avait précédemment montré dans une culture *in vitro* que le GA inhibe la prolifération des LT spécifiques de la MBP lorsqu'il est présenté par une lignée de LB transfectée par l'EBV. Ici, le LB ne jouerait plus son rôle de CPA en réponse à l'antigène de myéline. Le GA inhibe à chaque fois la prolifération de la lignée T spécifique du MBP, cependant les lignées dérivées de certains donneurs sont plus susceptibles à l'inhibition que d'autres. La lignée de LB transfectée par le virus EBV est prétraitée 3 jours avec 25µg/ml de GA, avant 3 jours de co-culture avec les LT (Milo and Panitch 1995). Les auteurs de cette étude enregistrent également une inhibition de la production d'IFN-γ dans la co-culture en présence du médicament et de la MBP (Milo and Panitch 1995). Il est intéressant de souligner qu'à cette époque les auteurs imputaient cette fonction du LB à sa propriété de cellule présentatrice d'antigène. A la lumière des notions récentes de régulation B, ces observations représentent déjà une ébauche possible de la fonction Breg. De ce fait, il s'agit de la toute première étude qui démontre qu'une pré-sensibilisation par le GA peut exercer sur les LB une fonction suppressive de la prolifération T et de la polarisation Th1 (Milo and Panitch 1995).

9.2.2 Les voies de signalisation possiblement empruntées par le GA

Nous savons que la stimulation TLR-9 active la fonction Breg en induisant une production d'IL-10 (Sun, Deriaud et al. 2005). Nous montrons ici que la voie TLR-9 des LB des patients est réfractaire à la stimulation par le CpG-ODN. Nos résultats issus des expériences de double stimulation GA + CpG-ODN, suggèrent que le GA exerce son effet immuno-modulateur par une voie indépendante du TLR-9. Il serait opportun d'explorer les voies de signalisation empruntées par ce médicament, notamment la phosphorylation de STAT-3 identifiée par l'équipe de Blair comme défectueuse dans la population LB transitionnelles des patients lupiques et qui serait à l'origine du défaut de production d'IL-10 en réponse à l'engagement du CD40. Il serait pertinent également d'examiner d'autres voies de signalisation du LB, telles que STAT-1. STAT-1 est un facteur de transcription qui participe à l'expression de plusieurs molécules de co-stimulations et de cytokines pro-inflammatoires et se définit comme un régulateur négatif de l'expression de l'IL-10. D'après l'étude de Weber en 2007, le GA conduit à une réduction de la phosphorylation de STAT-1 dans les monocytes de type 2 (Weber, Prod'Homme et al. 2007). D'autres exemples de voies de signalisations affectées par le GA sont répertoriés dans la littérature. Dans l'étude de Carpintero en 2010, l'auteur fait la démonstration d'une activation par le médicament de deux voies parallèles PI3K δ /AKt d'une part et MEK1/2 et ERK1/2 d'autre part qui concourent pour la phosphorylation de GSK3 contrôlant ainsi l'expression de l'IL-1Ra soluble, un inhibiteur de la cytokine pro-inflammatoire IL-1, dans les monocytes humains de type 2 (Carpintero, Brandt et al. 2010).

Récemment, des auteurs révèlent que la stimulation TLR9, mais pas une stimulation du CD40 ou du BCR, favorise une production importante d'IL-10 dans les LB chez l'Homme. De plus, ils identifient la voie d'activation de STAT-3 et de ERK nécessaire à cette production d'IL-10.

L'inhibition de ces deux voies abroge totalement cette production d'IL-10 TLR dépendante (Liu, Cao et al. 2014). Il est intéressant de constater que cette voie TLR-Myd88-STAT3 connue comme une voie de production d'anticorps (Liu, Stoop et al. 2013) est associée également ici à la production d'IL-10 qui participe à la fonction régulatrice des LB.

De façon similaire Mion et collaborateurs ont réalisé une étude sur des LB spléniques de souris et en arrivent à la même conclusion, mettant en évidence une production d'IL-10 sous 48h de stimulation du TLR-9 qui est MyD88 dépendante et TRIF-TRAM indépendante (Mion, Tonon et al. 2014). En résumé, l'unique stimulation des LB murins qui conduit à la plus importante production d'IL-10 est la stimulation TLR9. D'ailleurs, cette production est significativement réduite dans les souris Myd88 KO. L'ajout d'un inhibiteur P38 abroge également cette production d'IL-10 dans les LB. En revanche, par l'ajout d'autres inhibiteurs, il est écarté un rôle de la voie MEK/ERK dans la production d'IL-10 médiée par le CpG. MAPK P38 est essentiel à l'expression et à la sécrétion d'IL-10 dans les LB stimulés par leur TLR-9. Selon les conclusions de ces auteurs, des signaux de dangers comme le CpG induisent une production et une décharge rapide d'IL-10 représentant une réponse «réflexe» nécessaire pour restreindre ou limiter l'inflammation tandis que des médiateurs immunitaires comme le CD40L peuvent induire et / ou expandre des B10, qui acquièrent des fonctions régulatrices spécifiques dans un contexte particulier seulement après une rencontre tardive avec un second signal (Mion, Tonon et al. 2014), (Liu, Cao et al. 2014). Il serait donc intéressant d'explorer si ces voies signalétiques sont induites dans les LB stimulés par le GA.

Par ailleurs, en fonction des cellules que prend pour cible le GA, on constate qu'il peut conférer des effets diamétralement opposés. Un fait illustrant parfaitement cette observation est la divergence d'effets sur la survie cellulaire selon le type cellulaire considéré. D'après les travaux

de Ruggieri, la voie pro-apoptotique Bax/Bcl-2 serait favorisée par le GA dans les LT (Ruggieri, Avolio et al. 2006). Bien au contraire, ceux de Liu montrent que le médicament améliore la survie des cellules neuronales par activation de la voie PKC- α suite à un stress oxydatif (Liu, Johnson et al. 2007). Nous avons également déterminé par cytométrie en flux l'influence du GA sur la viabilité cellulaire des LB humains à l'aide d'un marquage DRAQ-7. Nos résultats d'analyse sur des LB sensibilisés par le GA, indiquent un pourcentage de survie cellulaire qui varie entre 97% pour la plus faible concentration de GA testée (5 μ g/ml) à 89 % pour la plus forte concentration (60 μ g/ml). Ces observations démontrent que le GA n'induit particulièrement pas de mort cellulaire des LB. En résumé, le GA perturbe de nombreuses voies différentes en fonction de la cellule qu'il prend pour cible. De ce fait, à la lumière de nos résultats, des investigations portant sur la perturbation de ces voies dans les LB chez l'Homme deviennent pertinentes dans des perspectives d'études futures, afin d'être en mesure de mieux contrôler ses effets thérapeutiques.

9.3 Fixation du Glatiramer acetate sur les LB

Après avoir confirmé au cours de la première étape de notre travail la capacité du GA à amplifier ou rétablir la fonction régulatrice déficiente des LB de patients lupiques, la seconde étape fut d'en comprendre les mécanismes. Pour cela, nous avons réalisé des expériences complémentaires. L'une d'entre elles a consisté à marquer le médicament avec un fluorochrome, le FITC, afin de suivre sa fixation sur les LB. Ainsi, l'analyse de la fixation par cytométrie en flux a permis de mettre en exergue deux populations de LB capables de fixer soit faiblement soit fortement le médicament, que l'on désignera comme les LB GA^{faible} et les LB GA^{fort} respectivement. Avec toujours, quel que soit l'échantillon testé, une population ne fixant pas le GA, qu'on qualifiera de LB GA^{Neg}. Ces résultats soutiennent les observations rapportées récemment par l'équipe de

Jackson qui dresse également ces 2 possibilités de fixation du médicament sur les LB chez l'Homme et la souris (Jackson et al. 2014). Sans pour autant identifier le phénotype de la population LB fixant fortement le GA, cette équipe démontrera que c'est seulement cette dernière qui serait à l'origine de l'efficacité clinique du médicament dans l'EAE (Jackson et al. 2014). Ici, nous allons plus loin en identifiant le phénotype de cette population LB GA^{fort} par cytométrie en flux. Ainsi, nous montrons qu'il s'agit en majorité d'une population LB appartenant au compartiment mémoire. Ces observations sont en concordance avec celles relevées par une autre étude en 2010, qui fait état d'une fixation préférentielle du GA sur les LB mémoires CD19⁺ CD27⁺ (Harp, Ireland et al. 2010), aussi bien sur les LB émanant de patients atteints de RRMS que de ceux provenant d'individus sains. De la même manière, nous mettons en évidence la même fixation du GA quel que soit la provenance de l'échantillon sanguin aussi bien des contrôles sains que des patients LED. Il convient de souligner aussi que si les LB GA^{fort} appartiennent au compartiment mémoire, tous les LB mémoires ne fixent pas fortement le médicament. Nous retrouvons en effet des LB GA^{faible} parmi les LB mémoires. La question à ce jour sans réponse est de savoir ce qui distingue ces deux catégories de LB mémoires. S'agit il de la spécificité du BCR ? De l'isotype du BCR ? Il n'est pas à exclure non plus que sur un même LB puisse coexister à la fois une faible et une forte fixation du médicament. Chacune d'elles seraient portées par un récepteur indéterminé à ce jour dont la densité d'expression serait variable.

9.4 Identification de la sous-population LB à l'origine des effets du GA

En prenant en compte l'intégralité de ces données et compte tenu du fait que des expériences réalisées au sein de notre laboratoire indiquent que les LB mémoires sont de moins bons régulateurs de la prolifération T que les LB matures (Nouel, Segalen et al. 2014), notre hypothèse consiste alors à dire que l'accroissement ou la restauration de la régulation engendrée par le GA passe par une fixation préférentielle et une sensibilisation à la régulation des LB mémoires. Afin d'asseoir cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de déplétion sélective de la population mémoire à partir des LB isolés du sang périphérique de témoins sains avant la mise en co-culture. Ainsi, nous démontrons que la simple déplétion des LB mémoires annule totalement l'effet amplificateur de la régulation apporté par le GA. Par conséquent, ce résultat qui mériterait néanmoins d'être répété, suggère fortement que le LB mémoire est un acteur essentiel dans l'induction de la fonction Breg dépendante du GA.

Nous observons, comme l'équipe de Bar-Or en 2001, que le GA influence tout particulièrement les LB mémoires. Cependant, nos conclusions fonctionnelles contrastent avec les leurs. En effet, ces auteurs ont mis en évidence *in vitro* un rôle unique porté par les LB mémoires humains dans l'activation et la prolifération des LT en réponse à l'antigène GA. Ils ont réalisé une cinétique de prolifération des LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par le GA et comparé la fonction présentatrice d'antigènes des LB mémoires à celle des LB naïfs de témoins. Ainsi, ils relèveront l'incapacité des LB naïfs CD27⁻ à induire une réponse proliférative T en réponse au GA contrairement à leurs homologues mémoires CD27⁺ (Bar-Or, Oliveira et al. 2001). Bar-Or et collaborateurs n'ont de ce fait pas évoqué ici la fonction régulatrice des LB sur la prolifération des LT. A juste titre, dans ce modèle de co-culture, les LT ne reçoivent pas de stimulation anti-CD3 anti-CD28, avec un ratio de co-culture de 2 LT pour 1 LB. De plus, les LB sont triés en LB

mémoires et LB naïfs, stimulés par une lignée transfectée avec le CD40L puis irradiés ou traités avec de la mitomycine C avant la co-culture de 5 jours avec les LT.

Les observations de Bar-Or et collaborateurs sont en accord avec celles de l'équipe de Monson, qui présente une conclusion comparable à partir de prélèvements sanguins de témoins sains et de patients RRMS (Harp, Lovett-Racke et al. 2008, Harp, Ireland et al. 2010). Ils démontrent que les LB totaux de témoins sains exercent un effet activateur de la prolifération T en réponse au GA et cet effet est porté presque exclusivement par les LB mémoires. L'étude aborde cette fois encore l'effet du GA sur les LB à travers le prisme de la fonction de cellule présentatrice d'antigènes puisque les LT ne sont pas stimulés par anti-CD3 et anti-CD28, le ratio est de 10 LT pour 1 LB. L'évaluation de la prolifération fut déterminée par un marquage CFSE à 5 jours de co-culture. Ces observations seront également confirmées chez la souris, dans l'étude de Jackson de 2014. Afin d'évaluer si les LB sont des cellules présentatrices d'antigènes compétentes pour le GA, les auteurs procèdent à un prétraitement des LB spléniques par du GA durant 24h. Après un lavage, ces LB sont cultivés avec des LT CD4⁺ spléniques en respectant un ratio de 2LB :1LT durant 48h seulement. Ils montrent que les LB induisent l'activation des LT CD4⁺ en réponse au GA puisqu'il y a une induction significative de la production d'IL-2 dans le surnageant de co-cultures chez des souris sauvages mais pas des souris CMHII KO (Jackson et al. 2014).

9.5 Mécanisme d'action du Glatiramer acetate

9.5.1 Le Glatiramer Acetate et la CPA

Ces observations ne vont certes pas dans le même sens que les nôtres puisqu'on enregistre une inhibition de la réponse proliférative T, mais ne les contredisent pas pour autant. En effet, l'absence de stimulation des LT d'une part et la durée de co-culture de 48h ou de 5 jours d'autre part déterminent probablement les conclusions de ces études.

De notre point de vue, ces deux points ont toute leur importance, sachant que la fonction régulatrice des LB s'acquiert progressivement au contact du LT et qu'elle fait suite à une étape d'activation des LT que nous induisons dans notre modèle par la stimulation anti-CD3 et anti CD28. Notre hypothèse est que le modèle de co-culture dans ces études indépendantes ne permet pas d'observer encore une fonction régulatrice. Prolonger la durée de co-culture permettrait vraisemblablement d'observer une fonction régulatrice spécifique du GA qui justement s'exercerait sur les LT répondeurs au GA. A juste titre, une analyse du protocole expérimental utilisé dans les deux études réalisées par l'équipe de Harp en 2008 puis en 2010 apportent quelques éléments de preuves soutenant notre hypothèse. L'analyse de la réponse proliférative LT de témoins sains en réponse au GA fut réalisée à 5 jours de co-culture en 2010 et à 7 jours de co-culture dans celle de 2008. Dans ces deux études les auteurs ont procédé à des conditions de stimulations identiques. Il s'avère qu'à 5 jours de co-culture avec les LB dans 6/10 des témoins sains testés les LT répondent par la prolifération, en revanche à 7 jours de co-culture seulement 2/10 des LT issus de témoins sains testés répondent à la prolifération (Harp, Lovett-Racke et al. 2008), (Harp, Ireland et al. 2010). D'ailleurs, la notion de Breg est évoquée par cette équipe dans une revue générale à ce sujet (Ireland, Blazek et al. 2012) et cette même équipe en 2014 démontrera que le GA a la capacité de restaurer la production d'IL-10 dans les LB des patients

atteints de sclérose en plaques (Ireland, Guzman et al. 2014). D'autre part, les auteurs montrent que certains LT de témoins sains semblent insensibles au GA puisqu'à 5 jours de co-culture avec les LB, la prolifération des LT dans 4/10 des témoins testés est indétectable en réponse au GA. Globalement, ces études évoquent une grande variabilité entre les échantillons de patients ou de témoins testés. Ce qui sous-entend que les LT de donneurs testés ne seront pas tous sensibles à la régulation par le GA. Pourtant, dans notre étude quel que soit le donneur testé nous parvenons grâce au prétraitement par le GA des LB à inhiber la prolifération des LT dans l'ensemble des échantillons sanguins (10/10) et d'amygdales (11/11) testé. En effet, un second paramètre n'a pas été évoqué et devrait être pris en considération dans l'interprétation des résultats, il s'agit du procédé de stimulation des LB par le GA qui diffère selon les études réalisées.

Dans l'étude de Milo, dans laquelle le GA inhibe à chaque fois la prolifération de la lignée T spécifique du MBP, la lignée de LB est prétraitée 3 jours avec le GA, avant co-culture avec les LT (Milo and Panitch 1995). De la même manière, dans notre modèle les LB sont prétraités 4h avec le GA, lavées, puis mis en co-culture avec les LT. En revanche, dans l'étude de Bar-Or, ainsi que dans celle de l'équipe de Harp, le GA est ajouté dans la culture à une concentration de 4µg/ml dans la première étude et de 10µg/ml de GA dans la seconde. Dans l'étude de Jackson, les LB reçoivent un prétraitement par le GA mais également sont au contact de GA dans la co-culture. Par conséquent, dans tous ces modèles la stimulation des LB est prolongée et le GA est au contact également avec les LT durant plusieurs jours (Bar-Or, Oliveira et al. 2001), (Harp, Lovett-Racke et al. 2008), (Harp, Ireland et al. 2010), (Jackson et al. 2014).

Cette différence de stimulation pourrait de ce fait expliquer les variations de résultats.

Notre hypothèse est que le mode de stimulation des LB par le GA détermine l'induction de la fonction suppressive dans les LB.

En effet, nous montrons que l'ajout du GA dans la culture simultanément à la stimulation des LT par les AC anti-CD3 et anti-CD28 en association avec les LB qui eux sont stimulés par le CpG-ODN, conduit à l'observation d'effets très hétérogènes qui contrastent avec les observations obtenues par un simple prétraitement des LB avant co-culture. Après une analyse de la réponse de 26 échantillons provenant d'amygdales, nous avons classé les donneurs en 3 principaux groupes selon les effets observés sur la prolifération des LT en réponse au GA.

1. Dans un premier groupe de donneurs, l'ajout du GA dans la co-culture inhibe la prolifération des LT, l'activité suppressive des LB dans ce groupe est significativement améliorée. Ce groupe comprend 9 cas parmi les 26 testés (35%).
2. Dans un second groupe de donneurs, la présence du GA n'affecte pas la prolifération des LT par rapport à la condition sans GA, l'activité suppressive des LB dans ce groupe est inchangée ou très faiblement réduite. Ce groupe contient 10 cas parmi les 26 testés (39%).
3. Enfin, dans un 3^{ème} groupe, les LT prolifèrent de la même façon que dans la condition de culture LT seuls sous stimulation anti-CD3 et anti-CD28, la présence du GA dans ce groupe annule entièrement la fonction suppressive des LB malgré la stimulation par le CpG-ODN qui permet une induction de la fonction Breg. Ce groupe comprend 7 cas et est observé dans 7 cas /26.

Par ailleurs, nous montrons que l'augmentation de la fonction régulatrice par le GA est associée à une augmentation de la production d'IL-10 dans le groupe 1, tandis que la baisse de la fonction régulatrice est associée à une réduction de la concentration d'IL-10 dans le second groupe. En conclusion, la stimulation prolongée par le GA augmente, annule et parfois n'affecte pas les potentialités suppressives du LB. Des résultats surprenants qui mettent en évidence la complexité du mécanisme d'action du GA et qui soulèvent de nombreuses questions. Nous allons

tenter de discuter ces résultats. La question principale est comment peut-on expliquer les 3 types de réponses et quels paramètres déterminent ces effets ? Ces 3 types de réponses peuvent être abordées sous deux angles différents :

Le premier aspect sera traité sous un angle clinique et oppose les observations du groupe 1 au groupe 2

- Dans le premier groupe, les LB sont sensibles à la régulation, le GA exerce un effet protecteur par sa capacité à activer les potentialités Bregs. Bien que ce soit des témoins sains, ils pourraient figurer dans les répondeurs cliniques à une thérapie par le GA.
- Le second groupe, les LB sont insensibles à la régulation par le GA puisque ce dernier n'exerce aucun effet tout au moins sur la fonction suppressive B. Ces donneurs pourraient représenter une population d'individus non répondeurs à une thérapie par le GA.

9.5.2 Réponse clinique et réponse immunologique du Glatiramer acetate

Dans un contexte pathologique pour des raisons souvent inconnues, un médicament donné peut être soit efficace soit inefficace sur une cohorte de patients traités. Avec des variations de réponses cliniques allant de bon répondeurs, de répondeurs intermédiaires et de non répondeurs. Une variabilité inter-individus qui est notamment bien décrite pour le GA. De plus, étant un médicament immuno-modulateur, il est également admis que la réponse clinique au traitement GA est corrélée à sa réponse immunologique. Les études à ce sujet sont nombreuses (Miller, Shapiro et al. 1998, Farina, Then Bergh et al. 2001, Franciotta, Zardini et al. 2003, Wieseemann, Klatt et al. 2003, Messina and Patti 2013, Farina, Wagenpfeil et al. 2002). Par exemple, une augmentation du ratio IL-4/IFN- γ dans les cellules du sang périphériques de patients traités au GA a montré être associée à une réponse clinique moyenne de patients traités (Valenzuela, Costello et al. 2007). Selon Jackson et collaborateurs, la capacité du GA à induire la production de cytokines par les LB chez l'Homme est donneur spécifique. Par exemple, il montre que dans 3 cas/6 testés *in vitro*, les LB humains stimulés par le GA, associé ou non au CD40L, réduisent leur production de TNF- α et d'IL-6 à des valeurs qui sont en dessous du seuil de base alors que ces deux cytokines sont fortement augmentées lorsque les LB reçoivent une stimulation BCR par un AC monoclonal anti-IgM. Ils parachèvent ainsi leur article en suggérant qu'une étude permettant d'évaluer si une telle dichotomie de réponse peut servir comme bio marqueur pour une utilisation optimale du GA. On retrouve dans la littérature des études cliniques qui traitent plus particulièrement de la réponse AC spécifique du GA chez les patients. Les AC spécifiques au GA ont été clairement identifiés chez les patients SEP traités au GA (Brenner, Arnon et al. 2001), (Farina, Vargas et al. 2002). Des auteurs indiquent que le niveau de réponse IgG4 spécifique au GA (qui est associé à la réponse Th2) est inversement corrélée avec le nombre de rechute mais

seulement chez les patients sous traitement par GA de longue durée (Karussis, Teitelbaum et al. 2010). Une étude très récente a clairement désignée le LB comme un éventuel bio marqueur de l'efficacité clinique du GA. Les auteurs de l'étude indiquent que les patients qui présentent dans le sang périphérique des LB réactifs aux antigènes de cerveau appartiennent au groupe dit répondeurs cliniques. C'est uniquement dans ce groupe de patients qu'ils mettent en évidence une corrélation positive et significative avec la durée du traitement et le temps écoulé depuis la dernière rechute des patients. Cette corrélation est spécifique au GA puisqu'elle ne sera pas relevée chez des patients SEP-RR traités par un autre médicament (interféron- β). Ainsi, les auteurs suggèrent que le GA exerce un effet sur les LB réactifs du cerveau d'un groupe de patients, et c'est uniquement pour ces patients qu'un bénéfice clinique par la thérapie GA est envisageable (Rovituso, Duffy et al. 2015). De ce fait, à la lumière de ces observations, il serait intéressant d'entreprendre des investigations de la fonction Breg chez des patients SEP traités au GA, et de confirmer les observations présentées ici sur un échantillon de témoins. Le Breg comme un possible bio marqueur de l'efficacité clinique du GA est une perspective d'étude future intéressante qui permettrait d'optimiser l'utilisation thérapeutique du GA chez les malades et de proposer surtout précocement des alternatives aux patients non répondeurs.

Concernant le dernier groupe d'individu, l'analyse de ce résultat sera traitée d'un point de vue purement immunologique. L'effet régulateur intrinsèque du LB apporté probablement par la stimulation CD40L, ainsi que l'effet régulateur induit par l'ajout du CpG-ODN sont totalement abrogés en présence du GA dans la co-culture. Comment le GA rend-il les LB insensibles à ces deux stimuli inducteurs de la fonction suppressive ?

9.6 Modes de fixation et les voies d'entrée possible du GA dans le LB.

9.6.1 Le Glatiramer acetate, Antigène universel ?

Hafler et collaborateurs ont assigné au GA le terme d'antigène universel capable d'interagir avec une grande diversité de LT, induisant prolifération et réactions croisées avec d'autres antigènes peptidiques (Hafler 2002). On sait également que puisque le GA est un mélange d'antigènes peptidiques, une forte prolifération T primaire est induite même chez des personnes non traitées saines (Duda, Schmied et al. 2000), (Farina, Then Bergh et al. 2001).

Ainsi, de la même manière qu'un antigène peptidique conventionnel, nous savons que le GA se fixe sur les molécules du CMH II et est reconnu par les LT via des TCR spécifiques de l'antigène (Karandikar, Crawford et al. 2002). Nous pouvons donc prendre comme postulat de départ que le GA est un antigène capable d'être reconnu par le BCR et d'induire une activation des LB qui à leur tour activent une prolifération des LT.

Nous savons qu'il y a bien un lien entre activation par le BCR des LB, fonction effectrice et fonction suppressive. Une question se pose sur ce qui fait finalement basculer la fonction du LB de l'activation des LT vers leur inhibition. De plus en plus d'auteurs s'accordent à dire que la spécificité du BCR ainsi que l'intensité des signaux délivrés par l'antigène sont probablement des éléments clés qui contrôlent le développement et l'activité des Bregs. Par exemple, d'après l'article de Seamons et collaborateurs en 2006, en réponse à un antigène donné les LB exercent des fonctions de CPA et assurent la prolifération T, mais subséquemment ces LT ne répondent plus à la prolifération. Par ailleurs, ils montrent que les LB cessent d'induire une réponse Th1 lorsque la concentration de l'antigène est faible. En revanche, suite à une exposition à de forte concentration d'antigènes, les LB activent les cellules Th1. Ils démontreront également que la fonction CPA des LB est BCR indépendante mais CMH dépendante (Seamons, Perchellet et al.

2006). Il est décrit également qu'une faible affinité ou une stimulation chronique de l'antigène à son BCR peut conduire à l'acquisition d'une compétence IL-10 *in vivo*, tandis que de forts signaux BCR peuvent détourner la signalisation intracellulaire et conduire les B10 pro à progresser sous des voies fonctionnelles différentes. Ceci vient appuyer le fait qu'une forte stimulation des LB avec des AC anti-IgM inhibe l'acquisition de compétence des B10 pro à produire de l'IL-10 durant les cultures *in vitro* (Yanaba, Bouaziz et al. 2009, Iwata, Matsushita et al. 2011); (Maseda, Candando et al. 2013). Les récents travaux de Lechouane et son équipe apportent de nouveaux arguments en faveur de ce postulat (Lechouane, Bonaud et al. 2013). Les auteurs identifient un niveau basal de la voie de signalisation du BCR dans les LB au repos qui serait déterminant pour leur réceptivité à des agonistes TLR et CD40. Ils parlent ici d'un signal BCR faible « tonique signal » constitutif indépendant de l'antigène qui facilite la différenciation spontanée des plasmocytes *in vivo* et *in vitro* en réponse à des agonistes TLRs ou à des stimulations CD40/IL-4. Dans notre modèle, nous n'apportons pas de stimulation antigénique mais nous enregistrons néanmoins un effet régulateur. Nous proposons donc l'hypothèse suivante : L'absence de l'antigène dans notre modèle contrôle sans GA n'exclut pas la présence d'un signal basal faible du BCR dans les LB. Ce signal basal constitutif du BCR pourrait favoriser une réceptivité aux signaux apportés par le CD40L des LT activés. Ainsi les LB pourraient interagir avec le CD40L exprimé par les LT, activés ici de manière poly-clonale, leur permettant de devenir régulateurs. Dans un contexte physiologique, lorsqu'un LB immature n'ayant pas été stimulé par son BCR interagit avec un LT activé, le signal basal du BCR favorise une réceptivité aux signaux apportés par le CD40L, ce qui induit la sécrétion d'IL-10, créant un environnement local anti-inflammatoire et évitant par conséquent la poursuite de la réponse inflammatoire. Tandis qu'un LB mémoire ne sera pas aussi efficace puisqu'il a déjà été stimulé par son BCR. Ce modèle de

régulation ne fait pas intervenir la fonction de cellules présentatrices d'antigènes des LB et est HLADR indépendante.

Cette hypothèse explique pourquoi dans notre modèle d'étude *in vitro*, les LB immatures triés ont une capacité supérieure à la régulation de la prolifération T, au contrôle de la polarisation Th1 et à la production d'IL-10 que les LB mémoires triés. D'autre part le signal du TLR-9 augmente les capacités inhibitrices du LB. Le TLR-9 reconnaît *in vivo* des motifs hypométhylés présents sur les ADN bactériens. Ces ADN représentent des épitopes non dévoilés tant que la bactérie n'a pas été lysée. Le signal perçu par le TLR-9 représente donc une information sur la lyse des bactéries et témoigne du développement d'une réaction immunitaire efficace. Extrapoler à notre modèle expérimental *in vitro*, ces observations sont majeures puisqu'elles pourraient expliquer que les LB interprètent la stimulation TLR-9 comme un message témoignant d'une réponse efficace couplée à la présence de cellules effectrices activées, ici les LT exprimant le CD40L. En l'absence de signal de danger induit par le BCR, le LB stimulé par CD40+TLR-9 serait donc orienté vers un profil régulateur. Mais comment expliquer qu'en présence de GA la stimulation du TLR-9 et du CD40 des LB ne soit pas efficace dans l'induction d'un contrôle de la réponse inflammatoire ?

9.6.2 Le Glatiramer Acetate et le BCR

Ireland et collaborateurs en 2012 montrent que sous stimulation anti-IgM, les LB ne produisent pas d'avantage d'IL-10 en réponse au GA (Ireland, Blazek et al. 2012). Dans une autre étude cette même équipe montre que finalement le traitement GA restaure la production d'IL-10 dans les LB stimulés par de l'IL-2 + CpG-ODN avec des niveaux d'IL-10 équivalents à ceux des témoins sains et sont également 6,5 fois plus élevés que ceux des patients non traités. En revanche, ils montrent par cytométrie en flux que sous la stimulation CpG-ODN + BCR, la fréquence des LB IL-10⁺ reste faible par rapport aux témoins sains. Comment peut-on expliquer de telles variations de réponses selon les stimuli prodigués ? Dans nos expériences, le prétraitement des LB par le GA sans aucune stimulation supplémentaire ou lorsqu'elle est associée à une stimulation CpG-ODN et CD40L permet dans les deux cas de figures d'enregistrer une induction ou une production d'IL-10 significativement plus importante par rapport aux contrôles sans GA. Jackson et collaborateurs apportent probablement une réponse puisqu'ils suggèrent que le GA bloque la fixation de l'anti-IgM. Les auteurs montrent que la stimulation du BCR par un AC monoclonal anti-IgM induit une augmentation des molécules d'activation CD86 et CMHII à la surface des LB. En revanche si les LB sont préalablement prétraités 1h par le GA avant la stimulation anti-IgM, l'induction de CD86 et de CMHII à la surface des LB est abrogée. En prenant en compte l'étude de Lechouane et Seamons sur le signal et la stimulation BCR (Lechouane, Bonaud et al. 2013), (Seamons, Perchellet et al. 2006) et les travaux de Jackson sur la fixation du GA sur le BCR, nous proposons une hypothèse permettant d'expliquer un tel résultat dans le groupe 3 dont les LB sont sensibles au GA mais insensibles à la régulation. Notre hypothèse est que l'effet régulateur est bloqué en raison d'une reconnaissance et d'une activation du BCR par le GA, ce qui annule le signal BCR tonique intracellulaire décrit par Lechouane et

qui conduit à réduire la réceptivité des LB aux signaux apportés par le CD40L des LT activés et aux signaux TLR-9 apportés par l'ajout du CpG-ODN dans nos co-cultures. Les LB qui ne reçoivent aucun stimulus sont par conséquent en incapacité à réguler la prolifération T.

D'autre part, sachant que d'une part, l'absence du CD22 qui normalement affaiblit le signal BCR et CD19 induit également une augmentation du nombre de B10 (Higuchi et al. 2002), et que d'autre part, nous montrons que le GA co-localise avec le CD22 à la surface des LB. Notre seconde hypothèse est que le GA est capable de se fixer et d'activer les molécules CD22 à la surface des LB. Le CD22 est un récepteur inhibiteur du BCR, son activation lorsque le GA est présent dans la co-culture pourrait se produire et conduire à une inhibition du signal BCR tonique intracellulaire décrit par Lehouane avec donc une insensibilité des LB aux signaux CD40L et TLR-9 apportés dans nos co-cultures.

Des investigations plus poussées seraient évidemment nécessaires pour confirmer ces hypothèses et comparer les mécanismes mis en jeu dans les LB du groupe1 qui sont à la fois sensibles au GA et à la régulation par le GA. Nous voyons bien ici que par ce mode de stimulation beaucoup de paramètres sont à prendre en compte dans l'interprétation de nos résultats et de nombreux aspects très pertinents restent encore à explorer. Cependant, étant donné que notre intérêt est porté principalement sur l'étude de la fonction Breg, l'hétérogénéité des résultats rend difficile l'étude de la fonction suppressive dans ce modèle. C'est pourquoi, nous avons choisi à cette étape du projet de poursuivre les investigations uniquement avec le modèle de pré-sensibilisation des LB par le GA.

9.7 Rôle de la fixation du GA sur la molécule HLA-DR dans la régulation

In fine, l'effet du GA sur les LB dans la littérature n'est étudié qu'à travers le prisme de la fonction de cellules présentatrices d'antigènes, le GA étant l'antigène. L'équipe de Harp et collaborateurs montre que la fonction activatrice de la prolifération T en réponse au GA est HLA-DR dépendante. En effet, l'ajout d'un AC bloquant anti-HLA-DR, qui prévient la présentation antigénique par les LB dans un contexte CMHII, supprime totalement la prolifération des LT CD4⁺ (Harp, Lovett-Racke et al. 2008). La fixation du GA sur la molécule HLA-DR fut décrite pour la première fois sur une lignée de LB par l'équipe de Fridkis-Hareli (Fridkis-Hareli, Teitelbaum et al. 1995). Bien que de nombreuses données dans la littérature indiquent une capacité du GA à se fixer directement sur les molécules HLA-DR des cellules présentatrice d'antigènes sans nécessité d'internalisation, la pertinence fonctionnelle de cette liaison reste controversée. Ainsi, dans l'étude de Monson et Harp de 2010, les auteurs purifient des LB mémoires d'un patient SEP afin de tester l'importance de l'internalisation du GA pour l'induction de la prolifération des LT CD4⁺. De manière intéressante, en prétraitant des LB mémoires avec de la chloroquine, un agent lysosomotropique prévenant l'internalisation de l'antigène, avant la co-culture avec les LT et le GA, les auteurs constatent une réduction de la prolifération des LT CD4⁺ en dessous du seuil de détection en présence de GA (Harp, Ireland et al. 2010). Autrement dit, cette équipe semble démontrer que le LB mémoire joue bien un rôle de cellule présentatrice d'antigènes, l'antigène présenté étant le GA. Cette fonction se traduit part une internalisation puis dans un second temps par une présentation du médicament sous sa forme active au sein des molécules du CMH-II pour une activation et une prolifération des LT (Harp, Ireland et al. 2010, Harp, Lovett-Racke et al. 2008).

Il est important de préciser que dans notre étude, tous les LB mémoires expriment les molécules HLA-DR avec la même intensité, mais tous ne fixent pas le médicament et nous n'avons pas identifié de récepteur spécifique permettant de prédire la population B mémoire fixant fortement le GA. Sans doute peut-il y avoir une fixation conjointe sur les molécules HLA-DR et sur le BCR pour certain LB. Néanmoins, compte tenu des observations importantes relatives à la fixation du GA sur les molécules HLA-DR, nous avons souhaité évaluer l'importance de cette fixation et de sa présentation dans la régulation de la prolifération des LT.

Nous nous sommes posées deux questions, avec deux procédés expérimentaux pour y répondre à l'aide d'un anticorps bloquant anti-HLA-DR. La première : Est-ce que la fixation du GA sur la molécule HLA-DR à l'étape de sensibilisation de 4h est nécessaire à l'induction de la fonction Breg ? La seconde : Est-ce au contact avec les LT que cette fixation est nécessaire à l'effet Breg ? Le blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR a été effectué à deux moments distincts, soit avant l'étape de sensibilisation de 4h pour répondre à la première question, soit au cours de la co-culture avec les LT, pour répondre à la deuxième.

Dans le premier cas de figure, le blocage de la fixation du GA sur les molécules HLA-DR des LB à l'étape de sensibilisation des cellules n'a aucun effet sur l'inhibition ultérieure de la prolifération des LT. Ce qui suggère que la fixation du GA sur les molécules HLA-DR n'est pas requis pour induire la fonction Breg et que le GA se fixe sur d'autre(s) molécule(s).

Notre hypothèse est que le GA se fixe sur une molécule exprimée ou non de manière spécifique par les LB mémoires, qu'il est internalisé et qu'il active la fonction Breg au contact du LT. D'autre part le blocage des molécules HLA-DR au cours de la co-culture diminue l'inhibition de la prolifération des LT. Ces résultats indiquent que la régulation passe nécessairement par la présentation du GA sur la molécule HLA-DR au TCR des LT.

Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux selon lesquels, le GA en se fixant sur la molécule HLA-DR favorise l'induction de cellules suppressives spécifiques du neuro-antigène dans l'EAE, sans que les cellules suppressives aient été identifiées dans cette étude (Teitelbaum, Milo et al. 1992, Teitelbaum, Aharoni et al. 1988).

Dans notre travail, nous montrons que les LB, et plus précisément une population de LB appartenant au compartiment mémoire, pourraient jouer ce rôle. De nombreuses questions concernant le site de fixation du médicament sur les LB sont posées et restent encore à explorer. La fixation du GA intervient-elle grâce à un récepteur de surface cellulaire spécifique ou plutôt par des mécanismes moins spécifiques tels que la macro-pinocytose ? Pour tenter d'y répondre nous avons complété notre étude par une analyse par microscopie confocale de la fixation du GA sur des LB purifiés d'amygdales. Cette approche a permis de confirmer que tous les LB ne fixent pas le GA. L'utilisation de concentrations croissantes de GA montre une saturation de la fixation à la concentration de 20µg/ml.

9.8 Mode d'internalisation du Glatiramer acetate

D'autre part, nous constatons que le GA-FITC se fixe au niveau de la membrane des LB mais est détecté également au niveau du cytoplasme des cellules. La présence du GA au niveau intracellulaire est probablement le reflet de son internalisation dans les LB. L'analyse de la cinétique de fixation du GA sur les LB par cytométrie en flux soit à 4°C, soit à 37°C avec des durées d'incubations croissantes a permis de montrer qu'après seulement 1 min d'incubation avec le GA à 4°C et à 37°C, les deux populations LB BGA^{faible} et BGA^{fort} sont observées. Le pourcentage de ces deux populations augmente proportionnellement à la durée de contact avec le GA. En revanche, au-delà de 2h d'incubation avec le GA, les deux types de populations LB sont indétectables par cytométrie en flux dans les cultures réalisées à 37°C, bien qu'elles soient

présentent dans celles réalisées à 4°C. Pour expliquer ce phénomène, on peut supposer que le GA-FITC est dégradé à 37°C mais pas à 4°C par des enzymes thermosensibles avec nécessité d'un procédé actif d'internalisation et de dégradation du GA-FITC. Cette dégradation induite par des phénomènes actifs n'étant pas envisageable à 4°C, cela expliquerait la persistance de la fluorescence et des deux populations LB dans cette condition. L'équipe de Fridkis-Hareli, précurseur dans l'étude de la fixation du GA, montre que ce dernier possède une capacité de fixation immédiate sur des cellules présentatrices d'antigènes humaines et murines indépendamment de la température d'incubation même à 0°C (Fridkis-Hareli, Teitelbaum et al. 1994), (Fridkis-Hareli, Teitelbaum et al. 1995). En revanche, le GA est incapable de se fixer à des molécules HLA-DR purifiées à 0°C, cette fixation reste faible à 25°C avec une fixation optimale à 37°C qui augmente après 6 heures d'incubation de manière similaire que des peptides HA 306-318. Ils montrent également que le complexe GA est stable avec tous les allo types HLA utilisés, puisque la fixation est détectée après 72h d'incubation à 37°C (Fridkis-Hareli and Strominger 1998). La fixation du GA biotinylé est détectée très rapidement après contact avec différents types de cellules présentatrices d'antigènes (dès 5 min d'incubation) contrairement à d'autres neuro-antigènes comme la MBP qui n'est détectée qu'après 15 min d'incubation, ou encore comparativement à la fixation de la MBP_{p84 102} qui n'est quant à elle détectée qu'après 2h d'incubation. Selon les auteurs, la fixation immédiate du GA et l'observation selon laquelle la fixation du GA est similaire à 37°C et à 0°C suggère que l'antigène GA n'est pas internalisé avant sa fixation sur les molécules de CMH des cellules présentatrices d'antigènes.

L'équipe de Liu en 2007 a également analysé la fixation du GA-FITC sur les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes induites *in vitro*. Les cellules dendritiques sont stimulées durant 24h par du GA-FITC et analysées par microscopie confocale à 24h, 48h et 72h.

Ils montrent que le GA se localise essentiellement au niveau cytoplasmique et n'est retrouvé ni au niveau de la membrane des cellules ni au niveau nucléaire. Selon les auteurs, le GA est appréhendé par les cellules dendritiques et se retrouve au niveau du cytoplasme des cellules, puis des fragments de GA sont progressivement libérés, le GA pouvant rester dans la cellule jusqu'à 72h après la culture (Liu, Johnson et al. 2007).

9.8.1 Le GA co-localise avec de nombreuses molécules à la surface des LB

Grâce à notre analyse par microscopie confocale nous montrons que le GA co-localise avec la glycoprotéine CD22, avec l'IgM (BCR) et avec les molécules HLA-DR exprimées par les LB. Ces observations sont inédites chez l'Homme et sont en accord avec les précédentes études réalisées sur d'autres types cellulaires qui démontrent que le GA a la capacité de se fixer sur de nombreuses molécules exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes telles que les glycoprotéines (Koenig, Spooner et al. 2013) ou encore les molécules HLA-DR (Fridkis-Hareli, Teitelbaum et al. 1994, Fridkis-Hareli, Teitelbaum et al. 1995, Fridkis-Hareli and Strominger 1998). De surcroît, d'après les travaux de Jackson chez la souris mais également chez l'Homme, (Jackson et al. 2014), l'efficacité du GA passerait par une action sur la fonction de cellule présentatrice d'antigènes des LB. Leur hypothèse est que le GA se fixerait sur une population de LB via le BCR et après internalisation, serait présenté sur le CMH-II aux LT CD4+ auto-réactifs. Les auteurs suggèrent que l'effet protecteur du GA dans l'EAE est induit par une interaction avec le BCR et implique plusieurs mécanismes, y compris la présentation d'antigènes et la production de cytokines. Ils caractérisent deux populations de LB qui fixent différemment le GA : les GA^{fort} et les GA^{faible}. De manière intéressante, 70 à 90% des LB GA^{fort} disparaissent chez les souris transgéniques possédant un BCR unique spécifique de l'antigène HEL. Ce qui suggère que la population GA^{fort} provient d'une interaction spécifique entre GA et le BCR. Pour déterminer si

cette reconnaissance du GA par le BCR est nécessaire à l'efficacité du médicament, les auteurs ont transféré des LB-GA issus de souris transgéniques BCR spécifique anti-HEL dans les souris EAE. Ils enregistrent une très faible réduction du score clinique de la maladie par rapport au transfert de LB-GA issus de souris sauvages. Ce qui suggère aussi que diversité du répertoire BCR tient un rôle non négligeable dans l'effet protecteur du médicament. Ce constat est comparable à l'importance évoquée de la diversité du BCR dans la fonction antigène spécifique des Bregs chez la souris. En effet, il faut rappeler que les B10+B10pro sont réduits d'environ 90% dans les souris transgéniques possédant un BCR fixe anti-HEL (Yanaba, Bouaziz et al. 2009). Les souris dans lesquelles tous les LB expriment un unique BCR sans rapport de spécificité antigénique développent une EAE chronique suite à une immunisation avec le peptide MOG, équivalente à celle observée dans les souris déficientes en B producteurs d'IL-10 (Fillatreau, Sweenie et al. 2002). Il y aurait donc bien un lien entre l'activation par le GA via le BCR pour une fonction effectrice efficace des LB et la fonction suppressive des Bregs. L'activation du LB par son BCR serait une étape obligatoire et déterminante dans son évolution ou sa différenciation en Breg.

9.8.2 Les mécanismes déterminants les variabilités de fixation du GA

Par ailleurs, selon l'équipe de Jackson, la population GA^{faible} n'est pas altérée dans les LB issus de souris BCR anti-HEL ou de souris KO en CMH I ou CMH II. Ce qui suggère qu'une large proportion de LB peut fixer de façon non spécifique le GA, mais que cette fixation ne participerait pas à l'effet protecteur du médicament. Une étude récente publiée en 2013 étaye cette théorie. En effet, elle démontre que le GA est capable de se fixer sur des héparines sulfates, des GP96 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes dont les LB. Or, les héparines sulfates sont des polysaccharides complexes appartenant à la famille des Glycosaminoglycanes présents en abondance à la surface cellulaire. C'est ce qui permet aux auteurs de suggérer qu'il n'y a pas de récepteur spécifique au GA sur les cellules présentatrices d'antigènes. La fixation serait non spécifique et tributaire d'interactions électrostatiques et polaires. Plus la concentration en chlorure de calcium du milieu augmente, plus la fixation du médicament à sa cellule cible se réduit (Koenig, Spooner et al. 2013). Allant dans ce sens, les travaux de Fridkis-Hareli en 1998, avaient déjà indiqué que la fixation du GA sur les molécules HLA-DR variait en fonction du pH. Etant identifié comme un antigène peptidique universel et sachant que la fixation des peptides antigéniques aux molécules HLA-DR est plus importante à pH acide qu'à pH neutre (Jensen 1992); (Jensen 1990); (Mouritsen, Hansen et al. 1992, Sette, Southwood et al. 1992), les auteurs ont évalué l'influence du pH sur la capacité de fixation du GA. En utilisant un GA biotinylé incubé avec des molécules HLA-DR1, DR2, DR4 dans des solutions à pH allant de 3 à 11, la fixation du GA s'avère variable selon les différents HLA-DR testés. La fixation sur DR1 ne semble pas être affectée par la variation de pH, tandis que la fixation sur DR4 est fortement modifiée en fonction du pH du milieu. La fixation est optimale à pH 5 et elle diminue à pH basique. Concernant notre étude, bien qu'il existe des mises en évidence d'une fixation non

spécifique du GA sur les LB, il n'est pas à exclure la possibilité de deux types de fixation sur un même LB. La forte fixation pourrait être le reflet d'une fixation spécifique sur un récepteur des LB mémoires. Tandis qu'une acidification du milieu, durant la co-culture par exemple, pourrait permettre une fixation non spécifique (**Figure 31**). Afin de valider cette hypothèse des expérimentations supplémentaires seront évidemment nécessaires.

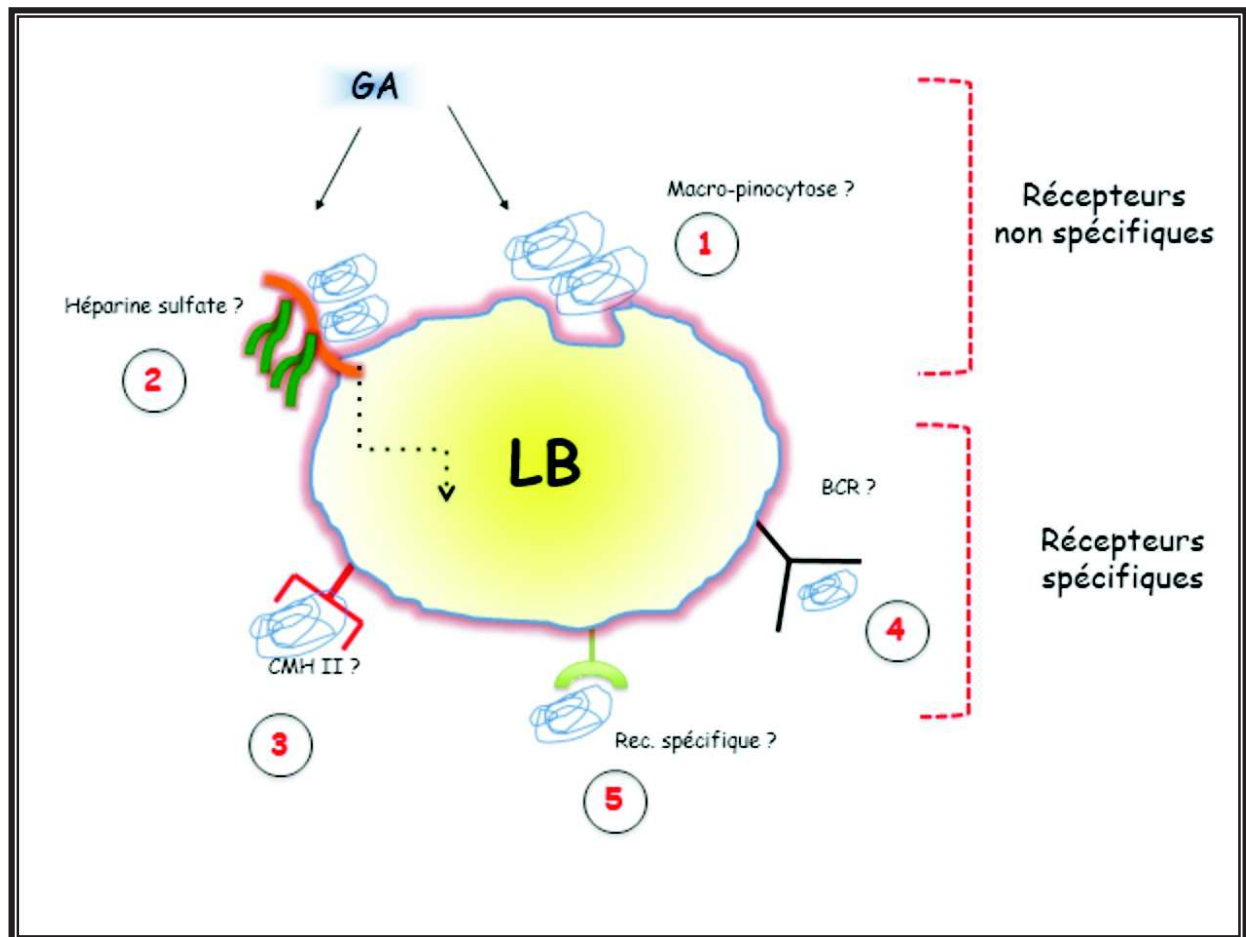


Figure 31 : Schéma représentant les modes de fixation et les voies d'entrée possible du GA dans le LB.

L'internalisation du GA dans le LB peut être envisagée de plusieurs manières: le GA peut emprunter des voies non spécifiques telles que la macro-pinocytose la fixation aux héparines sulfates (2) ou encore via d'autres molécules de transport membranaires. Le GA peut aussi se fixer de manière plus spécifique via des récepteurs de surface tels que les molécules du CMHII (3), le BCR (4) ou encore via un récepteur spécifique non identifié à ce jour (5).

Quoi qu'il en soit, au regard de l'ensemble des observations et de nos connaissances, nous avons envisagé le scénario suivant : les LB mémoires sont sensibilisés au GA et internalisent la molécule via leur BCR. Le GA est apprêté puis présenté par les molécules HLA-DR sous une conformation immuno-dominante reconnaissable par le TCR des LT. L'interaction aboutit à une activation puis une prolifération des LT. Progressivement, l'activation et la prolifération LT dépendante du GA déclinent laissant place à un contrôle et une régulation immunitaire de la prolifération de ces LT. Ce contrôle est probablement apporté par les LT-GA eux-mêmes qui induisent la fonction Breg des LB mémoires. La figure ci-dessous (**Figure 32**) schématise notre hypothèse. Nos résultats suggèrent que c'est probablement la présentation du GA par les molécules HLA-DR au TCR des LT, et non sa fixation directe sur la molécule HLA-DR, qui participe à l'effet régulateur. En suivant notre scénario de départ, on peut envisager que l'absence de l'effet Breg dépendant du GA dans nos expériences de blocage des sites de fixation aux molécules HLA-DR pourrait provenir des conséquences de la suppression de la fonction de présentation antigénique par les LB mémoires dans un contexte CMH II autrement dit de la suppression de la prolifération des LT CD4⁺ spécifiques du GA. L'existence de ces deux types de fixations est plausible. Il reste à déterminer quelle est celle qui est fonctionnellement impliquée dans la modulation des Bregs.

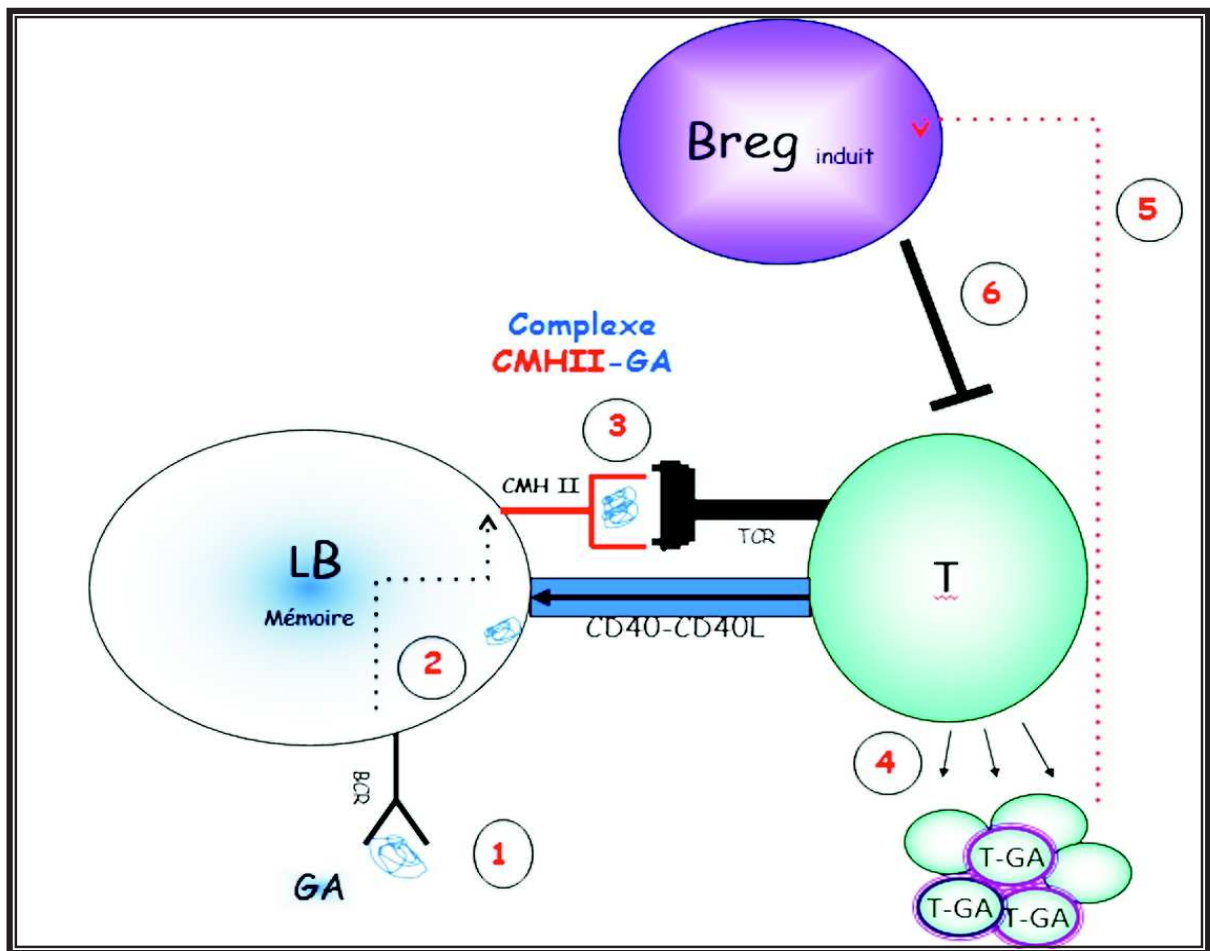


Figure 32 : Mécanisme d'action du Glatiramer acetate sur le LB humain *in vitro*

Durant l'étape de sensibilisation par le Glatiramer acetate (GA), les LB mémoires internalisent la molécule via leur BCR (en 1). Le GA est apprêté (2) puis présenté par les molécules HLA-DR sous la conformation d'un épitope immuno-dominant reconnaissable par le TCR des LT (3). L'interaction aboutit à une activation puis une prolifération des LT (4). Progressivement, l'activation et la prolifération LT dépendante du GA déclinent laissant place à un contrôle (5) et une régulation immunitaire de la prolifération de LT (6). Ce contrôle est probablement la conséquence de signaux apportés par les LT-GA eux-mêmes (5) qui induisent la fonction Breg des LB mémoires (6).

9.9 Effet du Glatiramer acetate sur les sous populations LB

Nos résultats suggèrent que le compartiment de LB mémoires renferme la population cellulaire sensible au GA à l'origine de effets régulateurs de ce dernier. La confirmation ultime que la cible du GA dans le sang périphérique est le LB mémoire, serait de réaliser des expériences comparatives de la fonction Breg des LB mémoires par rapport à celle des LB matures. En raison de la difficulté à obtenir des quantités suffisantes de LB mémoires à partir d'échantillons sanguins, nous avons choisi de réaliser ces expériences grâce à l'isolement de LB à partir d'amygdales. Pour cela, nous tout d'abord confirmé la présence des trois sortes de fixation sur les LB d'amygdales, à savoir la présence de LB GA^{fort}, de LB GA^{faible} ainsi que de LB GA^{neg}. L'identification précise de ces populations de LB est réalisée grâce à un marquage IgD, CD38, CD19, permettant de caractériser de multiples sous populations de LB (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2001). A savoir, les LB naïfs (Bm1) IgD⁺CD38⁻, les LB activés (Bm2) IgD⁺ CD38^{faible}, les cellules pré-CG Bm2' IgD⁺CD38⁺⁺, les LB du centre germinatif centroblastes (Bm3) et centrocytes (Bm4) IgD⁻CD38⁺⁺ et enfin les LB mémoires IgD⁻CD38^{+/-}. Ces derniers sont également divisés en early Bm5 CD38^{faible} et Bm5 CD38⁻. Nous avons ainsi confirmé que dans les organes lymphoïdes secondaires la population mémoire Bm5/eBm5 renferme également les LB GA^{fort}, tandis que les LB GA^{faible} sont représentés par les LB matures (naïfs/ activés) Bm1 et Bm2.

9.10 Le GA accroît uniquement la fonction régulatrice des LB mémoires

9.10.1 Le GA favorise le contrôle de la prolifération T par les LB mémoires

Des expériences de tris cellulaires des ces deux populations majeures de LB sont réalisées afin de pré-stimuler séparément les LB GA^{fort} et les LB GA^{faible} avant leur mise en co-culture avec les LT. Ainsi, nous montrons que la pré-stimulation par le GA n'améliore pas le potentiel régulateur des LB matures GA^{faible}. En revanche, comme escompté, le GA accroît significativement celui des LB mémoires GA^{fort}. Bien que les LB mémoires soient de moins bons régulateurs par rapport aux LB matures, il en résulte qu'ils deviennent statistiquement aussi efficaces grâce au GA. Ainsi, le taux d'inhibition de la prolifération T après la sensibilisation par le médicament est augmenté d'un facteur de 1,2 pour les LB matures, tandis qu'il est de 2,8 pour les LB mémoires ($P < 0.05$). Nous avons pu remarqué que sur les 8 échantillons Bm1+Bm2 triés, deux semblent avoir un effet régulateur légèrement augmenté grâce au GA. Cela peut s'expliquer par le fait que le compartiment de cellules Bm1 et Bm2 peut renfermer des LB mémoires non « switchés » capables de fixer fortement le GA (Sanz, Wei et al. 2008); (Anolik, Barnard et al. 2007).

Partant du postulat que la fonction régulatrice est progressivement acquise par les LB au contact des LT exprimant notamment le CD40L, nous formulons l'hypothèse selon laquelle au début de la co-culture, en réponse au GA les LB mémoires exercent un effet activateur sur la prolifération des LT, ces derniers étant stimulés de manière poly-clonale dans notre modèle. Etant donné que pour induire la prolifération T, il est nécessaire que le GA soit présenté sur les molécules HLA-DR des LB, en ajoutant un bloquant anti-HLA-DR dans la co-culture nous avons probablement abrogé l'effet activateur des LB mémoires apporté par le médicament et par voie de conséquence également l'effet régulateur qui s'en suit. Pour reformuler autrement, notre

hypothèse est la suivante : Au contact avec le GA, les LB mémoires qui au départ sont les seuls activateurs de la prolifération T deviennent progressivement les régulateurs de ces derniers dans un contexte Ag-GA spécifique. Cette hypothèse d'une conversion d'une population B activée effectrice en cellules B à potentiel régulateur est reprise par de nombreuses équipes. On peut évoquer par exemple l'étude de Tretter en 2008 qui a mis en évidence une population Breg induite ayant pour origine des LB fortement activés CD25⁺⁺ obtenus par une double stimulation SAC et IL-2 (Tretter, Venigalla et al. 2008). Ou encore, l'équipe de Sun en 2012, qui a induit une population Breg suppressive en incubant des LB naïfs avec un antigène approprié, ici l'Ovalbumine, conjugué à la sous-unité B de la toxine du choléra (CTB). Ce qui a permis à une majorité de LB quelle que soit leur spécificité BCR de reconnaître l'antigène, de l'apprêter et de le présenter aux LT et ensuite de produire de l'IL-10. Ces LB exercent un effet suppressif en induisant l'expression de LAP/TGF- β . Il s'agit de la première étude suggérant que n'importe quel LB peut acquérir des propriétés de régulation du moment où son BCR est activé par le complexe OVA/CTB (Sun, Czerkinsky et al. 2012).

9.10.2 Le GA affecte la production d'IL-10 par les LB mémoires

Par ailleurs, l'appréciation de la fonction Breg est aussi évaluée sur la capacité des LB à inhiber la polarisation Th1 (Lemoine, Morva et al. 2011). De manière intéressante, nous montrons ici que la population des LB mémoires triée et sensibilisée au GA permet de réduire la production d'IFN- γ des LT et favorise donc un contrôle de la polarisation Th1. Ainsi, le taux d'inhibition de la production d'IFN- γ en réponse au GA est de 0,9 pour les LB matures et reste donc inchangé tandis qu'il est de 1,8 pour les LB mémoires. Notre équipe a précédemment montré que l'inhibition de la prolifération est assurée non pas directement par les LB eux-mêmes mais par des Tregs dont l'expansion est induite par les Bregs. Nous montrons ici que la pré-stimulation des LB par le GA ne permet pas d'enregistrer une augmentation du pourcentage des T CD4⁺Foxp3⁺. Il n'est pas à exclure que d'autres populations de Tregs comme les Tr1 Tregs naturels producteurs d'IL-10 soient induits, ce que nous n'avons pas exploré ici.

On sait également que l'IL-10 produit par les Bregs exerce un rôle prépondérant dans la fonction inhibitrice des cytokines Th1. Nous avons donc analysé la capacité de production de l'IL-10 par les LB mémoires pré-stimulés avec le GA. Nous montrons effectivement une augmentation de la capacité de production d'IL-10 des LB mémoires à un taux de 2,1 tandis que celui des LB matures reste inchangé à 1,2.

Chez l'Homme, Duddy et collaborateurs ont démontré que les cellules B dérivées de patients atteints de sclérose en plaques, produisent des quantités plus faibles d'IL-10 en comparaison avec des individus sains. Ils précisent que ce sont les LB naïfs des patients qui présentent un déficit de production d'IL-10 (Duddy, Niino et al. 2007). Cette observation est importante puisque une étude récente démontre que le traitement au GA permet de restaurer cette production d'IL-10 dans les LB des patients RRMS (Ireland, Guzman et al. 2014).

Cette découverte est intéressante également dans le sens où nous montrons que le GA induit une augmentation d'IL-10 uniquement par les LB mémoires. Ce qui suggère que le médicament octroie aux LB mémoires un meilleur contrôle de la polarisation Th1. Par ailleurs, des travaux réalisés chez la souris vont dans le même sens. Selon Kala et collaborateurs, le GA induit des cellules B productrices d'IL-10 qui participent à la suppression de la réponse Th1 et Th17 en faveur d'une balance vers les cellules Th2 dans l'EAE (Kala, Rhodes et al. 2010). Des expériences complémentaires à l'aide d'AC bloquants l'IL-10 et son récepteur dans nos co-cultures permettraient de vérifier cette hypothèse. Le rôle de l'IL-10 dans la polarisation Th1 a toutefois largement été décrit et n'est plus à remettre en question (Lemoine, Morva et al. 2011), (Berthelot, Jamin et al. 2013, Nouel, Segalen et al. 2014, Nouel, Simon et al. 2014).

On peut noter également que la capacité du GA à induire une production d'IL-10 dans les LB concerne également d'autres types cellulaires. S. Jung et collaborateurs en 2004 ont montré que le GA augmente la production constitutive d'IL-10 dans les macrophages péritonéaux et les cellules dendritiques après stimulation LPS. L'induction de l'IL-10 dans les macrophages est associée à une réduction de production de TNF- α .

Les mécanismes par lesquels le GA induit cette production d'IL-10 sont inconnus. Dans les monocytes, la phosphorylation de STAT-1, qui est un facteur de transcription connu pour jouer un rôle de contrôle négatif de l'expression de l'IL-10, est réduite par le GA. Le médicament favoriserait le développement de monocytes de type II qui sécrètent plus d'IL-10 et de TGF- β et moins d'IL-12 et de TNF- α (Weber, Prod'Homme et al. 2007). Il apparaît intéressant de voir si l'effet est spécifique pour l'IL-10 et d'explorer l'influence du médicament sur la production d'autres cytokines impliquées dans la régulation des Bregs tels que le TGF- β , l'IL-35 ou encore l'IL-33. En analysant l'expression des gènes exprimés dans les cellules du sang périphériques de

14 patients RRMS avant et 3 mois après initiation d'un traitement au GA, Achiron et collaborateurs identifient 480 gènes exprimés de manière différentielle. Au niveau transcriptionnel, 262 gènes sont surexprimés et 218 gènes sont sous-exprimés. Ils discriminent notamment une surexpression de BAT1 qui diminue la production des cytokines de la phase aiguë comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α , expliquant ainsi la balance Th1 vers Th2 caractéristique des patients traités par le GA (Achiron, Feldman et al. 2009). Par ailleurs, le GA induit une réduction de l'expression de T-bet dans les LT tandis qu'il favorise l'expression de TIM-3 (Aharoni, Brenner et al. 2008). Cette observation est intéressante étant donné que, dans le liquide céphalo-rachidien des patients SEP, la molécule TIM-3 est faiblement exprimée dans les LT et s'associe à une sécrétion importante d'IFN- γ en comparaison avec les LT issus du liquide céphalo-rachidien des témoins sains (Yang, Anderson et al. 2008). On sait aujourd'hui que l'expression de TIM-3 est régulée par T-bet dans les cellules Th1 (Anderson, Lord et al. 2010). Il est parfaitement concevable qu'en agissant sur cette balance TIM-3 et T-bet, le GA favorise une balance Th2 au dépend de Th1 dans les LT pathogéniques.

Dans un modèle murin d'EAE, Begum-Haque a montré que le GA réduit l'expression de OPN et de ROR γ t dans les DC, conduisant à une réduction de l'expression de l'IL-17 tout en induisant une hausse de la production d'IL-10 (Begum-Haque, Christy et al. 2013).

En ce qui concerne nos résultats sur l'induction d'une production d'IL-10 par ce médicament, deux cas de figures peuvent se présenter, ou bien le GA augmente la capacité intrinsèque des LB mémoires à produire plus d'IL-10 en activant les facteurs de transcription appropriés par exemple, ou bien il favorise l'expansion de la population LB mémoires producteurs d'IL-10. Tout comme il pourrait également concourir aux deux phénomènes à la fois.

9.11 Mécanisme d'action du Glatiramer acetate sur les B mémoires

9.11.1 Effet du GA sur la survie et la prolifération des LB mémoires

Afin d'identifier les mode d'action du GA sur les LB mémoires, les paramètres de prolifération cellulaire par un marquage au CFSE et de viabilités cellulaires par un marquage DRAQ-7 ont été analysé dans les LB mémoires (Bm5/eBm5) triés et sensibilisés au GA et comparés aux LB matures/naïfs (Bm1/Bm2). Les cellules sont triées, sensibilisées dans un premier temps par le GA, puis marquées au CFSE. Les cellules reçoivent ensuite une double stimulation CpG-ODN et anti-CD40 multimérique durant 4 à 8 jours. Nous démontrons ainsi que le GA n'entraîne pas de prolifération des LB mémoires. Ces observations sont en accord avec celles de Harp. Les LB naïfs CD27⁻ et mémoires CD27⁺ provenant de prélèvements sanguins de patients SEP et de témoins sains sont stimulés par un anti-IgM en présence de GA. Ils ont réalisé une cinétique de prolifération des LT CD4⁺ en réponse à une stimulation par le GA et comparé la fonction présentatrice d'antigènes des LB mémoires à celle des LB naïfs de témoins. Ainsi, ils relèveront l'incapacité des LB naïfs CD27⁻ à induire une réponse proliférative T en réponse au GA contrairement à leurs homologues mémoires CD27⁺. La présence du GA n'affecte pas la prolifération des LB (Ireland, Blazek et al. 2012). Le médicament semble donc bloquer la prolifération des LB mémoires et encore une fois n'avoir aucun effet sur la prolifération des LB matures/naïfs.

Il est intéressant de constater que la prolifération des LB mémoires est plus faible que celle des LB naïfs à 4 jours et 8 jours de culture. Des études ont précédemment montré que les LB mémoires ont une prolifération équivalente à celle des LB naïfs lorsqu'ils sont stimulés 3 jours. En revanche, d'autres équipes rapporteront comme nous qu'à 5 jours de culture les LB mémoires affichent une prolifération moindre par rapport aux LB naïfs (Fecteau and Neron 2003). A juste

titre, le moment où l'analyse de la prolifération est réalisée, est effectivement déterminant selon les travaux de Bar-Or et collaborateurs. Les auteurs réalisent une cinétique de prolifération des LB naïfs CD27⁻ et des LB mémoires CD27⁺ en réponse à une stimulation par le CD40L (Bar-Or, Oliveira et al. 2001). Ils montrent qu'à 48h de stimulation les LB mémoires prolifèrent plus que les LB naïfs. En revanche, les LB naïfs entre 72h -96h de culture (cad entre 3 et 4 jours) présentent une prolifération plus importante qui rattrape finalement celle des LB mémoires. Ensuite à 120h soit 5 jours et encore plus à 7 jours de culture, l'écart se creuse puisque les LB naïfs affichent une prolifération exponentielle tandis que les LB mémoires atteignent un plateau et ne semblent plus entrer en division cellulaire (Bar-Or, Oliveira et al. 2001). Cette cinétique explique donc les observations contradictoires des travaux précédemment cités. Effectivement notre analyse à 4 jours et 8 jours de culture indique une prolifération toujours plus importante des LB matures/ naïfs par rapport aux LB mémoires. La survie des LB mémoires ne semble pas non plus être affectée pour autant, et n'est pas meilleure que celle des LB matures. Ces observations permettent d'écarter l'hypothèse d'un effet particulier du GA sur une expansion préférentielle des LB mémoires. Par conséquent, l'ensemble de nos résultats suggère que le GA augmente sélectivement la production constitutive d'IL-10 dans les LB mémoires déjà présents, ainsi que leur potentiel régulateur.

9.11.2 Effet du GA sur le phénotype Breg

Le mécanisme induit par le médicament pour déclencher cette fonction régulatrice semble donc passer par une modification de la cellule vers un phénotype LB associé à la production d'IL-10. C'est la raison pour laquelle notre intérêt s'est porté sur l'analyse de l'expression de quelques unes des molécules qui s'y attachent à commencer par la molécule CD5. En effet, un lien entre la présence de CD5 et la sécrétion d'IL-10 est connu depuis longtemps. Notre équipe a précédemment décrypté la voie intracellulaire impliquée dans la relation entre ces deux molécules et a montré que la molécule CD5 contrôlait la production d'IL-10 par les facteurs de transcription STAT-3 et NFAT2 (Garaud, Le Dantec et al. 2009, Garaud, Morva et al. 2011). L'expression de CD5 sur les LB est donc corrélée à leur production d'IL-10 et à une fonction suppressive du Breg qui peut être indépendante de l'IL-10. En effet, grâce à des expériences de tri cellulaires, notre équipe a identifié les LB CD5⁺ humains comme la population B ayant une capacité inhibitrice de la prolifération T meilleure que les LB CD5⁻, sans implication de l'IL-10 (Lemoine, Morva et al. 2011). Nous montrons ici que le GA augmente l'expression de la molécule CD5 à la surface des LB mémoires au cours de leur culture avec les LT. En revanche, il n'a aucune influence sur celle des LB matures. Des modèles murins rapportent également une expansion de B CD5⁺. D'après Begum-Haque et collaborateurs, le traitement au GA favorise en effet une augmentation de la prévalence des cellules B CD19⁺CD5⁺ dans l'EAE (Begum-Haque, Christy et al. 2011).

La recherche d'autres marqueurs associés à la fonction Breg et à la production d'IL-10 nous a amené à nous intéresser à l'IL-21R. La cytokine IL-21 se caractérise par ses nombreuses actions pléiotropes qui affectent différentes cellules immunitaires et non immunitaires. Par exemple, l'IL-21 peut affecter la différenciation, la prolifération et la fonction des LT, elle peut

également induire la maturation et augmenter la cytotoxicité des T CD8⁺ et des cellules NK. L'IL-21 affecte différents sous-types de LT notamment les cellules Th17, les Tfh et les Tregs et favorise ainsi le développement de maladies auto-immunes et inflammatoires.

Concernant ses effets sur le LB, ils sont nombreux. L'IL-21 exerce un effet majeur sur l'activation et la différenciation des LB. De plus il induit la différenciation des cellules B naïves et mémoires en plasmocytes (Gharibi, Majidi et al. 2015). Très récemment, deux études majeures ont révélé l'importance de l'IL-21 dans le développement des B régulateurs chez la souris et chez l'Homme. La première étude réalisée sur un modèle murin a montré que la stimulation IL-21 des LB CD19⁺ spléniques *ex-vivo* ne induit une augmentation d'un facteur 3 de la fréquence des Bregs producteurs d'IL-10, avec 5 fois plus de sécrétion d'IL-10. Ces observations sont surprenantes car elles montrent que cette simple stimulation permet aux B10 de produire de l'IL-10 sans nécessité d'une stimulation par de la PMA + Ionomycine. L'IL-21R semble donc être nécessaire aux fonctions effectrices des B10, tout du moins dans l'EAE. Selon cette équipe, les LB déficients en IL-21R sont incapables de transférer une protection contre l'EAE à des souris receveuses (Yoshizaki, Miyagaki et al. 2012). La seconde étude confirme ces observations dans des souris MRL qui développent spontanément un lupus. Le GA conduirait donc dans les LB mémoires vers un phénotype Breg avec une augmentation à la fois de l'expression de CD5 et de l'IL-21R et de PD-1. Ce qui est en faveur d'une augmentation associée de la production d'IL-10 par ces cellules.

Les molécules IDO et CTLA-4 ont très récemment été reliées à une coopération Breg/Treg dans un modèle *in vitro* d'étude du Breg chez l'Homme par notre équipe. Des LB activés régulent en effet la prolifération T par la production de TGF- β et d'IDO qui conduisent à l'induction de Tregs naturels mais aussi de T CD4⁺ producteurs de TGF- β et de Tregs

producteurs d'IL-10. CTLA-4 favorise la production d'IDO par le LB et lui permet de devenir un Breg induit, fonctionnellement efficace (Nouel, Pochard et al. 2015). Nous montrons dans notre travail que ces deux molécules sont induites dans les deux compartiments LB étudiés aussi bien naïf que mémoire durant la co-culture. D'autre part, une expression équivalente d'IDO est enregistrée dans les deux sous-populations LB. En revanche, l'expression de CTLA-4 à la surface des LB matures naïfs est significativement plus importante par rapport à celle du compartiment mémoire. La pré-sensibilisation par le GA n'affecte pas l'expression de ces molécules dans les LB. De manière intéressante, des auteurs ont montré que le GA induit une augmentation des Tregs producteurs d'IL-10 mais n'affecte pas l'expression de CTLA-4 intracellulaire dans ces derniers *in vitro* (Putheti, Soderstrom et al. 2003).

En résumé ces expériences montrent que le GA exerce deux actions majeures sur le LB mémoire. Le GA permet d'une part une meilleure capacité d'inhibition de la prolifération T, dont le mécanisme est dépendant d'un contact cellulaire et d'une fixation sur les molécules HLA-DR. dépendant. D'autre part, le GA favorise un contrôle plus efficace de la polarisation Th1 qui est probablement en relation avec sa capacité à induire la production d'IL-10 dans ces cellules. Enfin, le GA modifie le phénotype des LB mémoires puisque l'expression de molécules impliquées dans la fonction suppressive et la production d'IL-10 tels que CD5, IL-21R, ou encore PD-1 sont significativement augmentées. Il reste à déterminer si l'accumulation de telles molécules associées à la régulation sont à l'origine des effets exercés par GA sur la fonction Breg, ou alors, seraient une conséquence des actions régulatrices du GA sur les LB.

9.12 Le GA restaure le phénotype des Bregs producteurs d'IL-10 in vitro chez les patients LED

Les effets du GA sur l'expression de l'IL-21R des LB nous paraissent essentiels au vu des nombreux éléments de la littérature qui soutiennent l'idée du rôle important exercé par l'IL-21 dans le lupus.

1. En effet, les LB de souris développant spontanément un lupus n'expriment que faiblement le récepteur à IL-21.
2. De même chez l'Homme, alors qu'un polymorphisme du gène codant pour IL-21 représente un facteur de risque pour le développement du lupus (Sawalha, Kaufman et al. 2008), une étude en 2006 chez les sujets atteints de LED a mis en exergue une réduction de la fréquence des sous-populations B exprimant l'IL-21R (Good, Bryant et al. 2006) qui serait corrélée à une évolution plus rapide de la maladie (Mitoma, Horiuchi et al. 2005).
3. Les travaux de Yang et collaborateurs en 2013 chez la souris, puis en 2014 chez l'Homme, apportent sans doute une explication à ce lien (Yang, Yang et al. 2013). Les auteurs ont montré que l'IL-21 produite par les Tfh participe à l'induction de la production d'IL-10 durant la différenciation des B10. Ils parachèvent l'étude en montrant que l'IL-10 induit par l'IL-21 exerce une fonction régulatrice en inhibant la prolifération des LT (Yang, Yang et al. 2013). En 2014, ce phénomène est confirmé chez l'Homme dans le LED. Ils enregistrent au cours des poussées de la maladie une augmentation du pourcentage de Breg tandis que durant la phase de rémission ces derniers diminuent. L'expansion des cellules Tfh est corrélée avec l'augmentation du pourcentage des Bregs. Les auteurs mettent également en

évidence *in vitro* que la production d'IL-21 par les Tfh est responsable de la production d'IL-10 et de la différenciation des Bregs (Yang, Yang et al. 2014).

4. Yang et collaborateurs montrent que de la même manière que la molécule CD5, la voie IL-21-IL-21R semble contrôler la production d'IL-10 par les facteurs de transcription STAT-3.
5. Nous savons que les Bregs CD24^{fort} CD38^{fort} de type transitionnels isolés des patients LED sont réfractaires à la stimulation CD40 et produisent moins d'IL-10 par rapport aux contrôles (Blair et al. 2010). Nous savons également qu'en neutralisant l'IL-21, la production d'IL-10 et l'expansion des B10 *in vitro et in vivo* est inhibée et que l'IL-21 induit la production d'IL-10 par l'activation de la phosphorylation de STAT3 (p-STAT3) (Yang, Yang et al. 2014), (Yang, Yang et al. 2013).

Nos résultats montrent pour la première fois que la pré-sensibilisation GA de 4h permet de restaurer l'expression de l'IL-21R, d'augmenter celle de CD5 et enfin d'accroître la production d'IL-10 des LB lupiques. Le GA permet donc de restaurer la production d'IL-10 mais en stimulant une autre population de LB de type mémoire qui est majoritairement représentée dans le lupus. Nos expériences montrent que l'induction de l'expression de l'IL-21R sur les LB des patients lupiques est effectivement très faible par rapport aux LB des témoins sains. Ce défaut d'IL-21R pourrait participer à la déficience de production d'IL-10 par les LB chez ces patients. Toutefois, nous montrons que le GA peut restaurer l'expression de l'IL-21R, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la production d'IL-10 dans les co-cultures de LB de patients LED pré-sensibilisés au GA.

Nos données renforcent l'intérêt d'explorer d'avantage le rôle physiopathologique de l'IL-21 dans les Bregs chez l'Homme. Nos résultats préliminaires montrent que le GA n'augmentent pas la phosphorylation de STAT-3 dans les LB totaux d'amygdales (données non montrées). Il serait intéressant de tester si la stimulation GA active la phosphorylation de STAT-3 dans les LB mémoires triés. De plus, il serait pertinent d'explorer l'effet que pourrait avoir le blocage de la voie IL-21/IL-21R sur la régulation de la prolifération T dans notre modèle. Des anticorps bloquants anti-IL-21R humains sont à ce jour indisponibles mais cela pourrait faire l'objet d'investigations futures.

D'autre part, de nombreuses études cliniques réalisées sur des modèles expérimentaux murins de lupus et d'arthrites ont montré qu'un traitement avec une protéine de fusion Fc IL-21R améliore et réduit la progression du lupus et de l'arthrite (Herber, Brown et al. 2007) (Young, Hegen et al. 2007). Toutefois, dans une étude réalisée sur un autre modèle murin de lupus, les expériences ont révélé une issue plus complexe. Sur le plan thérapeutique les souris sont traitées plus longtemps (24 semaines) par rapport aux précédentes études et avec un IL-21R soluble-Fc afin de neutraliser l'IL-21 présent. Ainsi, les auteurs ont mis en évidence un effet bi-phasique de l'IL-21. Alors que le traitement précoce affecte négativement la survie des souris, à un stade tardif de la maladie en revanche le traitement améliore la survie des souris (Bubier, Bennett et al. 2007, Bubier, Sproule et al. 2009).

Chez l'Homme, un AC monoclonal humain anti-IL21R (ATR-107) a été conçu pour empêcher la fixation de l'IL-21 et bloquer l'activation de son récepteur. Les récentes tentatives de blocage de ce récepteur semblent donner des résultats contrastés chez les patients lupiques (Xue et al. 2015) A la lumière des nouvelles données sur la fonction suppressive de l'IL-21, on peut supposer que les tentatives infructueuses chez les patients lupiques s'expliquent en partie par une

neutralisation de la fonction et de la différenciation des Bregs IL-21R⁺ chez les patients lupiques, qui sont déjà moins nombreux, comme nous le démontrons, à l'état basal chez ces patients.

Une des voies qui serait également intéressante à explorer est celle faisant intervenir l'IL-21 dans la production de la molécule granzyme B dans les LB ayant un potentiel suppresseur. En effet, au sein de l'environnement tumoral chez l'Homme, il a été mis en évidence une co-localisation de LB exprimant le granzyme B avec des Tregs sécréteurs d'IL-21 (Lindner, Dahlke et al. 2013). Une analyse plus approfondie sur des LB du sang périphérique de volontaires sains a permis de montrer en culture *in vitro* que l'IL-21, combinée à une stimulation du BCR et des TLR-7 ou 9, induit la sécrétion de granzyme B capable d'inhiber la prolifération des LT CD4⁺. Plus intéressant encore, ces expériences montrent que l'IL-21 contribue à l'expression et la sécrétion de granzyme B dans la population LB particulière CD19⁺ CD5⁺. Ces données viennent s'ajouter aux observations reliant la fonction immunosuppressive à l'expression de CD5⁺ et du récepteur à l'IL-21 sur les LB. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse suivante : la population de LB mémoires étant majoritairement représentée dans le lupus, le GA serait capable d'activer *in vivo* la fonction Breg défaillante chez les patients, en restaurant l'expression de l'IL-21R dans les LB mémoires CD5⁺. Par conséquent, il serait intéressant de savoir si la restauration fonctionnelle constatée dans notre modèle est associée à une production de granzyme B.

CONCLUSION GENERALE

10. Conclusion et perspectives du projet

En résumé, dans un contexte pathologique de LED, un médicament comme le GA peut restaurer une fonction suppressive défectueuse. Une courte étape de pré-sensibilisation par le GA a permis de restaurer la fonction suppressive de la prolifération T des LB de patients LED. Le GA est donc capable de modifier intrinsèquement le comportement et le phénotype du LB. Chez les patients LED, le GA restaure l'expression de l'IL-21R et augmente l'expression de CD5 à la surface des LB. Ces deux molécules dont on sait maintenant qu'elles sont associées à la production d'IL-10 et donc indirectement à un contrôle de la polarisation Th1, sont probablement à l'origine des effets du GA sur la fonction Breg.

Les récentes découvertes issues des approches *in vitro* pour induire efficacement l'expansion des B10-Bregs chez la souris, fournissent un outil indéniable à leur manipulation à des fins thérapeutiques. Exploiter les propriétés anti-inflammatoires des Bregs représente aujourd'hui une opportunité nouvelle d'aborder la question de la thérapie chez l'Homme également. Mieux connaître le Breg, c'est savoir mieux l'appréhender dans le cadre de la pathologie. Ce travail permet de poser un nouvel éclairage sur les Bregs chez l'Homme. Globalement, nous savons aujourd'hui que les Bregs peuvent répondre à différents types de stimulation pour devenir fonctionnels. L'outil thérapeutique Breg est déjà un sujet d'actualité dans des modèles murins. Chez la souris, la stimulation des Bregs par des AC monoclonaux anti-TIM-1 induit une libération d'IL-10 et prévient le rejet d'allogreffes pancréatiques (Ding, Yeung et al. 2011). De fortes doses d'oestrogènes régulent à la hausse la fonction de certains Bregs, au moins chez la souris et dans des modèles d'EAE (Bodhankar, Galipeau et al. 2013). De la même façon, un transfert adoptif de Bregs générés *in vitro* par une stimulation GIFT-5, une fusokine formée par

une combinaison de GM-CSF et d'IL-15, conduit à une suppression de la production d'IFN- γ par des LT effecteurs et par conséquent permet de supprimer les symptômes de l'EAE (Rafei, Hsieh et al. 2009). Le développement de méthodes analogues pour les cellules humaines pourrait laisser présager à de nouvelles approches dans le traitement de maladies auto-immunes, avec plus de garanties pour le malade en occasionnant le moins d'effets secondaires indésirables possibles. Bien qu'il subsiste de nombreuses zones d'ombre à éclaircir quant à la ou les voies empruntées par le GA pour affecter intrinsèquement un LB mémoire, nous montrons qu'amplifier une fonction régulatrice et surtout la restaurer lorsqu'elle est défaillante chez les malades, est parfaitement possible *in vitro*. Devant l'engouement suscité par le développement de procédés favorisant l'expansion des Bregs chez la souris à des fins thérapeutiques, l'enjeu est aujourd'hui d'être en mesure d'extrapoler de telles démarches chez l'Homme. Ce travail, avec toute la modestie requise, contribuera à faire naître un nouvel élan vers de telles perspectives.

ANNEXES

ARTICLE

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

Bibliographie

Aasi, J., B. P. Abbott, R. Abbott, T. Abbott, M. R. Abernathy, et al. (2014). "Search for gravitational waves associated with gamma-ray bursts detected by the interplanetary network." Phys Rev Lett **113**(1): 011102.

Abramsky, O., D. Teitelbaum and R. Arnon (1977). "Effect of a synthetic polypeptide (COP 1) on patients with multiple sclerosis and with acute disseminated encephalomyelitis. Preliminary report." J Neurol Sci **31**(3): 433-438.

Afzali, B., P. Mitchell, R. I. Lechler, S. John and G. Lombardi (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells." Clin Exp Immunol **159**(2): 120-130.

Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo and A. Komiyama (2000). "CD27: a memory B-cell marker." Immunol Today **21**(5): 204-206.

Aharoni, R. (2013). "The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond." Autoimmun Rev **12**(5): 543-553.

Aharoni, R., R. Eilam, A. Stock, A. Vainshtein, E. Shezen, et al. (2010). "Glatiramer acetate reduces Th-17 inflammation and induces regulatory T-cells in the CNS of mice with relapsing-remitting or chronic EAE." J Neuroimmunol **225**(1-2): 100-111.

Aharoni, R., B. Kayhan and R. Arnon (2005). "Therapeutic effect of the immunomodulator glatiramer acetate on trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis." Inflamm Bowel Dis **11**(2): 106-115.

Aharoni, R., B. Kayhan, O. Brenner, H. Domev, G. Labunskay, et al. (2006). "Immunomodulatory therapeutic effect of glatiramer acetate on several murine models of inflammatory bowel disease." J Pharmacol Exp Ther **318**(1): 68-78.

Aharoni, R., B. Kayhan, R. Eilam, M. Sela and R. Arnon (2003). "Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14157-14162.

Aharoni, R., A. Meshorer, M. Sela and R. Arnon (2002). "Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system." J Neuroimmunol **126**(1-2): 58-68.

Aharoni, R., H. Sonego, O. Brenner, R. Eilam and R. Arnon (2007). "The therapeutic effect of glatiramer acetate in a murine model of inflammatory bowel disease is mediated by anti-inflammatory T-cells." Immunol Lett **112**(2): 110-119.

Aharoni, R., D. Teitelbaum, R. Arnon and M. Sela (2001). "Copolymer 1 inhibits manifestations of graft rejection." Transplantation **72**(4): 598-605.

Aharoni, R., D. Teitelbaum, O. Leitner, A. Meshorer, M. Sela, et al. (2000). "Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11472-11477.

Aharoni, R., D. Teitelbaum, M. Sela and R. Arnon (1997). "Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10821-10826.

Ahuja, A., J. Shupe, R. Dunn, M. Kashgarian, M. R. Kehry, et al. (2007). "Depletion of B cells in murine lupus: efficacy and resistance." J Immunol **179**(5): 3351-3361.

Al-Falahi, Y., K. L. Sand, E. Knudsen, B. B. Damaj, J. Rolin, et al. (2009). "Splenic natural killer cell activity in two models of experimental neurodegenerative diseases." J Cell Mol Med **13**(8B): 2693-2703.

Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." Annu Rev Immunol **23**: 447-485.

Anolik, J. and I. Sanz (2004). "B cells in human and murine systemic lupus erythematosus." Curr Opin Rheumatol **16**(5): 505-512.

Anolik, J. H., J. Barnard, A. Cappione, A. E. Pugh-Bernard, R. E. Felgar, et al. (2004). "Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **50**(11): 3580-3590.

Anolik, J. H., J. Barnard, T. Owen, B. Zheng, S. Kemshetti, 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.

Anolik, J. H., R. J. Looney, F. E. Lund, T. D. Randall and I. Sanz (2009). "Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets." Immunol Res **45**(2-3): 144-158.

Arnon, R. and R. Aharoni (2004). "Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14593-14598.

Arnon, R., M. Sela and D. Teitelbaum (1996). "New insights into the mechanism of action of copolymer 1 in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis." J Neurol **243**(4 Suppl 1): S8-13.

Assier, E., M. C. Boissier and J. M. Dayer (2010). "Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments." Joint Bone Spine **77**(6): 532-536.

Ayers, C. L., J. P. Mendoza, S. Sinha, K. Cunnusamy, B. M. Greenberg, et al. (2013). "Modulation of immune function occurs within hours of therapy initiation for multiple sclerosis." Clin Immunol **147**(2): 105-119.

Bar-Or, A., J. Oger, E. Gibbs, M. Niino, T. Aziz, et al. (2009). "Serial combination therapy: is immune modulation in multiple sclerosis enhanced by initial immune suppression?" Mult Scler **15**(8): 959-964.

Bar-Or, A., E. M. Oliveira, D. E. Anderson, J. I. Krieger, M. Duddy, et al. (2001). "Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state." J Immunol **167**(10): 5669-5677.

Basile, E., E. Gibbs, T. Aziz and J. Oger (2006). "During 3 years treatment of primary progressive multiple sclerosis with glatiramer acetate, specific antibodies switch from IgG1 to IgG4." J Neuroimmunol **177**(1-2): 161-166.

Begum-Haque, S., M. Christy, J. Ochoa-Reparaz, E. C. Nowak, D. Mielcarz, et al. (2011). "Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate." J Neuroimmunol **232**(1-2): 136-144.

Begum-Haque, S., M. Christy, Y. Wang, E. Kasper, J. Ochoa-Reparaz, et al. (2013). "Glatiramer acetate biases dendritic cells towards an anti-inflammatory phenotype by modulating OPN, IL-17, and ROR γ responses and by increasing IL-10 production in experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **254**(1-2): 117-124.

Begum-Haque, S., A. Sharma, M. Christy, T. Lentini, J. Ochoa-Reparaz, et al. (2010). "Increased expression of B cell-associated regulatory cytokines by glatiramer acetate in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **219**(1-2): 47-53.

Begum-Haque, S., A. Sharma, I. R. Kasper, D. M. Foureau, D. W. Mielcarz, et al. (2008). "Downregulation of IL-17 and IL-6 in the central nervous system by glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **204**(1-2): 58-65.

Benczur, M., G. G. Petrányl, G. Pálffy, M. Varga, M. Talas, et al. (1980). "Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor." Clin Exp Immunol **39**(3): 657-662.

Betelli, E., D. Baeten, A. Jager, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2006). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice." J Clin Invest **116**(9): 2393-2402.

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

Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, 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.

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

Bomprezzi, R., R. Schafer, V. Reese, A. Misra, T. L. Vollmer, et al. (2011). "Glatiramer acetate-specific antibody titres in patients with relapsing / remitting multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis." Scand J Immunol **74**(3): 219-226.

Bonelli, M., A. Savitskaya, K. von Dalwigk, C. W. Steiner, D. Aletaha, et al. (2008). "Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE)." Int Immunol **20**(7): 861-868.

Borel, P., M. Benkhoucha, M. S. Weber, S. S. Zamvil, M. L. Santiago-Raber, et al. (2008). "Glatiramer acetate treatment does not modify the clinical course of (NZB x BXSB)F1 lupus murine model." Int Immunol **20**(10): 1313-1319.

Bornstein, M. B., A. Miller, S. Slagle, M. Weitzman, H. Crystal, et al. (1987). "A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **317**(7): 408-414.

Bornstein, M. B., A. I. Miller, S. Slagle, R. Arnon, M. Sela, et al. (1984). "Clinical trials of copolymer I in multiple sclerosis." Ann N Y Acad Sci **436**: 366-372.

Bornstein, M. B., A. I. Miller, D. Teitelbaum, R. Arnon and M. Sela (1982). "Multiple sclerosis: trial of a synthetic polypeptide." Ann Neurol **11**(3): 317-319.

Boster, A., M. P. Bartoszek, C. O'Connell, D. Pitt and M. Racke (2011). "Efficacy, safety, and cost-effectiveness of glatiramer acetate in the treatment of relapsing-relapsing multiple sclerosis." Ther Adv Neurol Disord **4**(5): 319-332.

Boster, A. L., C. C. Ford, O. Neudorfer and Y. Gilgun-Sherki (2015). "Glatiramer acetate: long-term safety and efficacy in relapsing-relapsing multiple sclerosis." Expert Rev Neurother **15**(6): 575-586.

Bouaziz, J. D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, 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.

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

Breij, E. C., B. P. Brink, R. Veerhuis, C. van den Berg, R. Vloet, et al. (2008). "Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis." Ann Neurol **63**(1): 16-25.

Brenner, T., R. Arnon, M. Sela, O. Abramsky, Z. Meiner, et al. (2001). "Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone." J Neuroimmunol **115**(1-2): 152-160.

Cambridge, G., M. J. Leandro, M. Teodorescu, J. Manson, A. Rahman, et al. (2006). "B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles." Arthritis Rheum **54**(11): 3612-3622.

Capron, A., D. Dombrowicz and M. Capron (2004). "Helminth infections and allergic diseases: from the Th2 paradigm to regulatory networks." Clin Rev Allergy Immunol **26**(1): 25-34.

Capron, D. W., K. Fitch, A. Medley, C. Blagg, M. Mallott, et al. (2012). "Role of anxiety sensitivity subfactors in suicidal ideation and suicide attempt history." Depress Anxiety **29**(3): 195-201.

Carrieri, P. B., F. Carbone, F. Perna, D. Bruzzese, C. La Rocca, et al. (2015). "Longitudinal assessment of immuno-metabolic parameters in multiple sclerosis patients during treatment with glatiramer acetate." Metabolism **64**(9): 1112-1121.

Carter, N. A., R. Vasconcellos, E. C. Rosser, C. Tulone, A. Munoz-Suano, 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.

Carter, N. J. and G. M. Keating (2010). "Glatiramer acetate: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis." Drugs **70**(12): 1545-1577.

Chan, O. and M. J. Shlomchik (1998). "A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice." J Immunol **160**(1): 51-59.

Chan, O. T., L. G. Hannum, A. M. Haberman, M. P. Madaio and M. J. Shlomchik (1999). "A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus." J Exp Med **189**(10): 1639-1648.

Chang, T. T., C. Jabs, R. A. Sobel, V. K. Kuchroo and A. H. Sharpe (1999). "Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **190**(5): 733-740.

Chang, T. T., R. A. Sobel, T. Wei, R. M. Ransohoff, V. K. Kuchroo, et al. (2003). "Recovery from EAE is associated with decreased survival of encephalitogenic T cells in the CNS of B7-1/B7-2-deficient mice." Eur J Immunol **33**(7): 2022-2032.

Chen, C., X. Liu, B. Wan and J. Z. Zhang (2009). "Regulatory properties of copolymer I in Th17 differentiation by altering STAT3 phosphorylation." J Immunol **183**(1): 246-253.

Chen, M., B. Gran, K. Costello, K. Johnson, R. Martin, et al. (2001). "Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and crossreactivity with myelin basic protein in patients with MS." Mult Scler **7**(4): 209-219.

Cohen, P. L. and R. A. Eisenberg (1991). "Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease." Annu Rev Immunol **9**: 243-269.

- Collison, L. W., V. Chaturvedi, A. L. Henderson, P. R. Giacomin, C. Guy, et al. (2010). "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population." Nat Immunol **11**(12): 1093-1101.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.
- Comi, G. and L. Moiola (2002). "Glatiramer acetate." Neurologia **17**(5): 244-258.
- Conti-Fine, B. M., M. Milani and H. J. Kaminski (2006). "Myasthenia gravis: past, present, and future." J Clin Invest **116**(11): 2843-2854.
- Correale, J., M. Farez and G. Razzitte (2008). "Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells." Ann Neurol **64**(2): 187-199.
- Correale, J. and M. I. Gaitan (2015). "Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection." Acta Neurol Scand Suppl **132**(199): 46-55.
- Cui, G., Y. Zhang, Z. Gong, J. Z. Zhang and Y. Q. Zang (2009). "Induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell response by glatiramer acetate in type 1 diabetes." Cell Res **19**(5): 574-583.
- Cunningham-Rundles, C. (2011). "Autoimmunity in primary immune deficiency: taking lessons from our patients." Clin Exp Immunol **164** Suppl 2: 6-11.
- Curtin, F. and H. P. Hartung (2014). "Novel therapeutic options for multiple sclerosis." Expert Rev Clin Pharmacol **7**(1): 91-104.
- Daïen, C. I., S. Gailhac, T. Mura, R. Audo, B. Combe, 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.
- Dalbeth, N., R. Gundle, R. J. Davies, Y. C. Lee, A. J. McMichael, et al. (2004). "CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation." J Immunol **173**(10): 6418-6426.
- Dalwadi, H., B. Wei, M. Schrage, K. Spicher, T. T. Su, et al. (2003). "B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene." J Immunol **170**(4): 1707-1715.
- Dang, H. and R. J. Harbeck (1984). "The in vivo and in vitro glomerular deposition of isolated anti-double-stranded-DNA antibodies in NZB/W mice." Clin Immunol Immunopathol **30**(2): 265-278.
- de Andres, C., M. Tejera-Alhambra, B. Alonso, L. Valor, R. Teijeiro, et al. (2014). "New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids." J Neuroimmunol **270**(1-2): 37-44.

de Masson, A., J. D. Bouaziz, H. Le Buanec, M. Robin, A. O'Meara, 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 Santi, L., M. C. Costantini and P. Annunziata (2005). "Long time interval between multiple sclerosis onset and occurrence of primary Sjogren's syndrome in a woman treated with interferon-beta." *Acta Neurol Scand* **112**(3): 194-196.

Deniz, G., G. Erten, U. C. Kucuksezer, D. Kocacik, C. Karagiannidis, et al. (2008). "Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses." *J Immunol* **180**(2): 850-857.

Denkins, Y., I. J. Fidler and M. L. Kripke (1989). "Exposure of mice to UV-B radiation suppresses delayed hypersensitivity to *Candida albicans*." *Photochem Photobiol* **49**(5): 615-619.

Di Caro, V., B. Phillips, C. Engman, J. Harnaha, M. Trucco, et al. (2013). "Retinoic acid-producing, ex-vivo-generated human tolerogenic dendritic cells induce the proliferation of immunosuppressive B lymphocytes." *Clin Exp Immunol* **174**(2): 302-317.

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

Ding, Q., M. Yeung, G. Camirand, Q. Zeng, H. Akiba, 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.

Dittel, B. N., T. H. Urbania and C. A. Janeway, Jr. (2000). "Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice." *J Autoimmun* **14**(4): 311-318.

Duda, P. W., J. I. Krieger, M. C. Schmied, C. Balentine and D. A. Hafler (2000). "Human and murine CD4 T cell reactivity to a complex antigen: recognition of the synthetic random polypeptide glatiramer acetate." *J Immunol* **165**(12): 7300-7307.

Duda, P. W., M. C. Schmied, S. L. Cook, J. I. Krieger and D. A. Hafler (2000). "Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis." *J Clin Invest* **105**(7): 967-976.

Duddy, M. and A. Bar-Or (2006). "B-cells in multiple sclerosis." *Int MS J* **13**(3): 84-90.

Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, et al. (2007). "Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis." *J Immunol* **178**(10): 6092-6099.

Duddy, M. E., A. Alter and A. Bar-Or (2004). "Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?" *J Immunol* **172**(6): 3422-3427.

Eisenberg, R. and R. J. Looney (2005). "The therapeutic potential of anti-CD20 "what do B-cells do?"." *Clin Immunol* **117**(3): 207-213.

El Fassi, D., C. H. Nielsen, J. Kjeldsen, O. Clemmensen and L. Hegedus (2008). "Ulcerative colitis following B lymphocyte depletion with rituximab in a patient with Graves' disease." Gut **57**(5): 714-715.

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

Farina, C., F. Then Bergh, H. Albrecht, E. Meinl, A. Yassouridis, et al. (2001). "Treatment of multiple sclerosis with Copaxone (COP): Elispot assay detects COP-induced interleukin-4 and interferon-gamma response in blood cells." Brain **124**(Pt 4): 705-719.

Farina, C., S. Wagenpfeil and R. Hohlfeld (2002). "Immunological assay for assessing the efficacy of glatiramer acetate (Copaxone) in multiple sclerosis. A pilot study." J Neurol **249**(11): 1587-1592.

Fatima, Z., U. Motosugi, M. Hori, K. Ishigame, T. Onodera, et al. (2012). "High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRI using 1.5 tesla clinical scanner; determination of displacement parameters in the brains of normal versus multiple sclerosis and low-grade glioma subjects." J Neuroimaging **22**(3): 279-284.

Fife, B. T., M. D. Griffin, A. K. Abbas, R. M. Locksley and J. A. Bluestone (2006). "Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist." J Clin Invest **116**(8): 2252-2261.

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

Flodstrom, M., F. D. Shi, N. Sarvetnick and H. G. Ljunggren (2002). "The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease?" Scand J Immunol **55**(5): 432-441.

Franciotta, D., E. Zardini, R. Bergamaschi, L. Andreoni and V. Cosi (2003). "Interferon gamma and interleukin 4 producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients undergoing immunomodulatory treatment." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(1): 123-126.

Frenkel, D., R. Maron, D. S. Burt and H. L. Weiner (2005). "Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease." J Clin Invest **115**(9): 2423-2433.

Fridkis-Hareli, M. and J. L. Strominger (1998). "Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules." J Immunol **160**(9): 4386-4397.

Fridkis-Hareli, M., D. Teitelbaum, R. Arnon and M. Sela (1995). "Synthetic copolymer 1 and myelin basic protein do not require processing prior to binding to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells." Cell Immunol **163**(2): 229-236.

Fridkis-Hareli, M., D. Teitelbaum, E. Gurevich, I. Pecht, C. Brautbar, et al. (1994). "Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4872-4876.

Fritz, J. H., O. L. Rojas, N. Simard, D. D. McCarthy, S. Hapfelmeier, et al. (2012). "Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut." Nature **481**(7380): 199-203.

Gao, N., J. Dresel, V. Eckstein, R. Gellert, H. Storch, et al. (2014). "Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheumatol **66**(10): 2849-2861.

Garaud, S., C. Le Dantec, A. R. de Mendoza, R. A. Mageed, P. Youinou, et al. (2009). "IL-10 production by B cells expressing CD5 with the alternative exon 1B." Ann N Y Acad Sci **1173**: 280-285.

Garaud, S., A. Morva, S. Lemoine, S. Hillion, A. Bordron, et al. (2011). "CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation." J Immunol **186**(8): 4835-4844.

Goetz, M., R. Atreya, M. Ghalibafian, P. R. Galle and M. F. Neurath (2007). "Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy." Inflamm Bowel Dis **13**(11): 1365-1368.

Good, K. L., V. L. Bryant and S. G. Tangye (2006). "Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21." J Immunol **177**(8): 5236-5247.

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

Grunebaum, E., E. Malatzky-Goshen and Y. Shoenfeld (1989). "Natural killer cells and autoimmunity." Immunol Res **8**(4): 292-304.

Gur, C., D. Karussis, E. Golden, S. Doron, Y. Ilan, et al. (2006). "Amelioration of experimental colitis by Copaxone is associated with class-II-restricted CD4 immune blocking." Clin Immunol **118**(2-3): 307-316.

Haas, J., M. Korporal, B. Balint, B. Fritzsche, A. Schwarz, et al. (2009). "Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis." J Neuroimmunol **216**(1-2): 113-117.

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

Hafler, D. A. (2002). "Degeneracy, as opposed to specificity, in immunotherapy." J Clin Invest **109**(5): 581-584.

Harp, C. T., S. Ireland, L. S. Davis, G. Remington, B. Cassidy, et al. (2010). "Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-gamma production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein." Eur J Immunol **40**(10): 2942-2956.

Harp, C. T., A. E. Lovett-Racke, M. K. Racke, E. M. Frohman and N. L. Monson (2008). "Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis." Clin Immunol **128**(3): 382-391.

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

Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, et al. (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.

Hawker, K., P. O'Connor, M. S. Freedman, P. A. Calabresi, J. Antel, et al. (2009). "Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial." Ann Neurol **66**(4): 460-471.

Hedegaard, C. J., N. Chen, F. Sellebjerg, P. S. Sorensen, R. G. Leslie, et al. (2009). "Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP." Immunology **128**(1 Suppl): e451-461.

Heine, G., U. Niesner, H. D. Chang, A. Steinmeyer, U. Zugel, et al. (2008). "1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells." Eur J Immunol **38**(8): 2210-2218.

Hestvik, A. L., G. Skorstad, D. A. Price, F. Vartdal and T. Holmoy (2008). "Multiple sclerosis: glatiramer acetate induces anti-inflammatory T cells in the cerebrospinal fluid." Mult Scler **14**(6): 749-758.

Higuchi, T., Y. Aiba, T. Nomura, J. Matsuda, K. Mochida, et al. (2002). "Cutting Edge: Ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease." J Immunol **168**(1): 9-12.

Hjelmstrom, P., A. E. Juedes, J. Fjell and N. H. Ruddle (1998). "B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization." J Immunol **161**(9): 4480-4483.

Hong, J., N. Li, X. Zhang, B. Zheng and J. Z. Zhang (2005). "Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6449-6454.

Horani, A., N. Muhanna, O. Pappo, A. Melhem, C. E. Alvarez, et al. (2007). "Beneficial effect of glatiramer acetate (Copaxone) on immune modulation of experimental hepatic fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(2): G628-638.

Howie, S., M. Norval and J. Maingay (1986). "Exposure to low-dose ultraviolet radiation suppresses delayed-type hypersensitivity to herpes simplex virus in mice." J Invest Dermatol **86**(2): 125-128.

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.

Inglese, M. and M. Petracca (2015). "Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia." Schizophr Res **161**(1): 94-101.

Ireland, S. J., A. A. Guzman, D. E. O'Brien, S. Hughes, B. Greenberg, et al. (2014). "The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." JAMA Neurol **71**(11): 1421-1428.

Isaksson, M., B. Ardesjo, L. Ronnblom, O. Kampe, H. Lassmann, et al. (2009). "Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE." Eur J Immunol **39**(10): 2925-2935.

Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, 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.

Jackson, L., S. Selva, T. Niedzielko and T. Vollmer (2014). "B Cell Receptor Recognition Of Glatiramer Acetate Is Required For Efficacy In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis And Results In Differential Cytokine Production In MS Patients (P1.210)." Neurology **82**(10 Supplement): P1.210.

Jackson, L., S. Selva, T. Niedzielko and T. Vollmer (2014). "B cell receptor recognition of glatiramer acetate is required for efficacy through antigen presentation and cytokine production." J Clin Cell Immunol **5**(1): 1-14.

Jacobi, A. M., K. Reiter, M. Mackay, C. Aranow, F. Hiepe, et al. (2008). "Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95." Arthritis Rheum **58**(6): 1762-1773.

Jamin, C., A. Morva, S. Lemoine, C. Daridon, A. R. de Mendoza, et al. (2008). "Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity." Arthritis Rheum **58**(7): 1900-1906.

Jeannin, P., S. Lecoanet, Y. Delneste, J. F. Gauchat and J. Y. Bonnefoy (1998). "IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10." J Immunol **160**(7): 3555-3561.

Jee, Y., R. Liu, X. F. Bai, D. I. Campagnolo, F. D. Shi, et al. (2006). "Do Th2 cells mediate the effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis?" Int Immunol **18**(4): 537-544.

Jeevan, A. and M. L. Kripke (1989). "Effect of a single exposure to ultraviolet radiation on Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection in mice." J Immunol **143**(9): 2837-2843.

Jeong, Y. I., S. H. Hong, S. H. Cho, W. J. Lee and S. E. Lee (2012). "Induction of IL-10-producing CD1dhighCD5+ regulatory B cells following Babesia microti-infection." PLoS One **7**(10): e46553.

Jezewska, E., M. Bjorkholm, R. Giscombe, G. Holm and O. Tullgren (1985). "Surface markers and cytotoxic activity of blood natural killer cells studied at the single cell level in Hodgkin's disease." Clin Exp Immunol **61**(1): 96-102.

Jiang, G., Y. Ke, D. Sun, Y. Wang, H. J. Kaplan, et al. (2009). "Regulatory role of TLR ligands on the activation of autoreactive T cells by retinal astrocytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(10): 4769-4776.

Jin, G., Y. Hamaguchi, T. Matsushita, M. Hasegawa, D. Le Huu, et al. (2013). "B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells." J Allergy Clin Immunol **131**(6): 1674-1682.

Johnson, K. P. (1996). "A review of the clinical efficacy profile of copolymer 1: new U.S. phase III trial data." J Neurol **243**(4 Suppl 1): S3-7.

Johnson, K. P. (2010). "Glatiramer acetate and the glatiramoid class of immunomodulator drugs in multiple sclerosis: an update." Expert Opin Drug Metab Toxicol **6**(5): 643-660.

Johnson, K. P., B. R. Brooks, J. A. Cohen, C. C. Ford, J. Goldstein, et al. (1995). "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **45**(7): 1268-1276.

Johnson, K. P., B. R. Brooks, J. A. Cohen, C. C. Ford, J. Goldstein, et al. (2001). "Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. 1998 [classical article]." Neurology **57**(12 Suppl 5): S46-53.

Jung, S., I. Siglienti, O. Grauer, T. Magnus, G. Scarlato, et al. (2004). "Induction of IL-10 in rat peritoneal macrophages and dendritic cells by glatiramer acetate." J Neuroimmunol **148**(1-2): 63-73.

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

Kala, M., A. Miravalle and T. Vollmer (2011). "Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate." J Neuroimmunol **235**(1-2): 9-17.

Kala, M., S. N. Rhodes, W. H. Piao, F. D. Shi, D. I. Campagnolo, et al. (2010). "B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis." Exp Neurol **221**(1): 136-145.

Kalampokis, I., A. Yoshizaki and T. F. Tedder (2013). "IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease." Arthritis Res Ther **15 Suppl 1**: S1.

Kaltenmeier, C., A. Gawanbacht, T. Beyer, S. Lindner, T. Trzaska, et al. (2015). "CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients." J Immunol **194**(8): 3768-3777.

Karandikar, N. J., M. P. Crawford, X. Yan, R. B. Ratts, J. M. Brenchley, et al. (2002). "Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis." J Clin Invest **109**(5): 641-649.

Karussis, D., D. Teitelbaum, C. Sicsic, T. Brenner and A. C. m.-c. I. s. group (2010). "Long-term treatment of multiple sclerosis with glatiramer acetate: natural history of the subtypes of anti-glatiramer acetate antibodies and their correlation with clinical efficacy." J Neuroimmunol **220**(1-2): 125-130.

Katz, R. F., M. Spiegelman and B. Holtzman (2006). "The dynamics of melt and shear localization in partially molten aggregates." Nature **442**(7103): 676-679.

Kawamoto, N., H. Ohnishi, N. Kondo and J. L. Strominger (2013). "The role of dendritic cells in the generation of CD4(+) CD25(HI) Foxp3(+) T cells induced by amino acid copolymers." Int Immunol **25**(1): 53-65.

Kennedy, M. W. and D. B. Thomas (1983). "A regulatory role for the memory B cell as suppressor-inducer of feedback control." J Exp Med **157**(2): 547-558.

Kessel, A., T. Haj, R. Peri, A. Snir, D. Melamed, 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.

Kim, H. J., K. Biernacki, A. Prat, J. P. Antel and A. Bar-Or (2004). "Inflammatory potential and migratory capacities across human brain endothelial cells of distinct glatiramer acetate-reactive T cells generated in treated multiple sclerosis patients." Clin Immunol **111**(1): 38-46.

Kim, H. J., I. Ifergan, J. P. Antel, R. Seguin, M. Duddy, et al. (2004). "Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis." J Immunol **172**(11): 7144-7153.

Klein, U., K. Rajewsky and R. Kuppers (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.

Knippenberg, S., E. Peelen, J. Smolders, M. Thewissen, P. Menheere, et al. (2011). "Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission." J Neuroimmunol **239**(1-2): 80-86.

Koenig, P. A., E. Spooner, N. Kawamoto, J. L. Strominger and H. L. Ploegh (2013). "Amino acid copolymers that alleviate experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo interact with heparan sulfates and glycoprotein 96 in APCs." J Immunol **191**(1): 208-216.

Kortylewski, M. and H. Yu (2007). "Stat3 as a potential target for cancer immunotherapy." J Immunother **30**(2): 131-139.

Koshy, M., D. Berger and M. K. Crow (1996). "Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes." J Clin Invest **98**(3): 826-837.

L'Age-Stehr, J., H. Teichmann, R. K. Gershon and H. Cantor (1980). "Stimulation of regulatory T cell circuits by immunoglobulin-dependent structures on activated B cells." Eur J Immunol **10**(1): 21-26.

La Mantia, L., C. Di Pietrantonj, M. Rovaris, G. Rigon, S. Frau, et al. (2015). "Comparative efficacy of interferon beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **86**(9): 1016-1020.

Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderon Gomez, et al. (2008). "TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity." J Immunol **180**(7): 4763-4773.

Lanzavecchia, A. (1987). "Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells." Immunol Rev **99**: 39-51.

Laouar, Y., F. S. Sutterwala, L. Gorelik and R. A. Flavell (2005). "Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma." Nat Immunol **6**(6): 600-607.

Lassmann, H. (2010). "Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models." Exp Neurol **225**(1): 2-8.

Lechouane, F., A. Bonaud, L. Delpy, S. Casola, Z. Oruc, et al. (2013). "B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation." Eur J Immunol **43**(3): 619-628.

Lee, J. H., J. Noh, G. Noh, W. S. Choi and S. S. Lee (2011). "IL-10 is predominantly produced by CD19(low)CD5(+) regulatory B cell subpopulation: characterisation of CD19 (high) and CD19(low) subpopulations of CD5(+) B cells." Yonsei Med J **52**(5): 851-855.

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

Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, et al. (2013). "Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." Cancer Res **73**(8): 2468-2479.

Liu, J., T. V. Johnson, J. Lin, S. H. Ramirez, T. K. Bronich, et al. (2007). "T cell independent mechanism for copolymer-1-induced neuroprotection." Eur J Immunol **37**(11): 3143-3154.

Looney, R. J., J. H. Anolik, D. Campbell, R. E. Felgar, F. Young, et al. (2004). "B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab." Arthritis Rheum **50**(8): 2580-2589.

Lucisano Valim, Y. M. and P. J. Lachmann (1991). "The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions." Clin Exp Immunol **84**(1): 1-8.

Ma, J., Y. Usui, K. Takeda, N. Harada, H. Yagita, et al. (2011). "TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production." Biochem Biophys Res Commun **406**(2): 223-228.

Maseda, D., S. H. Smith, D. J. DiLillo, J. M. Bryant, K. M. Candando, 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, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, et al. (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." Immunity **41**(6): 1040-1051.

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

Matsumoto, Y., K. Kohyama, Y. Aikawa, T. Shin, Y. Kawazoe, et al. (1998). "Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol **28**(5): 1681-1688.

Matsumura, Y., S. N. Byrne, D. X. Nghiem, Y. Miyahara and S. E. Ullrich (2006). "A role for inflammatory mediators in the induction of immunoregulatory B cells." J Immunol **177**(7): 4810-4817.

Matsushita, T., M. Horikawa, Y. Iwata and T. F. Tedder (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis." J Immunol **185**(4): 2240-2252.

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

Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol **30**: 221-241.

Mauri, C. and M. R. Ehrenstein (2008). "The 'short' history of regulatory B cells." Trends Immunol **29**(1): 34-40.

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

Merrill, J. T., C. M. Neuwelt, D. J. Wallace, J. C. Shanahan, K. M. Latinis, et al. (2010). "Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial." Arthritis Rheum **62**(1): 222-233.

Messina, S. and F. Patti (2013). "The pharmacokinetics of glatiramer acetate for multiple sclerosis treatment." Expert Opin Drug Metab Toxicol **9**(10): 1349-1359.

Miles, K., J. Heaney, Z. Sibinska, D. Salter, J. Savill, et al. (2012). "A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(3): 887-892.

Miller, A., S. Shapiro, R. Gershtein, A. Kinarty, H. Rawashdeh, et al. (1998). "Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation." J Neuroimmunol **92**(1-2): 113-121.

Miller, S. D., E. J. McMahon, B. Schreiner and S. L. Bailey (2007). "Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." Ann N Y Acad Sci **1103**: 179-191.

Milo, R. and H. Panitch (1995). "Additive effects of copolymer-1 and interferon beta-1b on the immune response to myelin basic protein." J Neuroimmunol **61**(2): 185-193.

Mion, F., F. D'Inca, L. Danelli, B. Toffoletto, C. Guarnotta, et al. (2014). "Mast cells control the expansion and differentiation of IL-10-competent B cells." J Immunol **193**(9): 4568-4579.

Mitoma, H., T. Horiuchi, Y. Kimoto, H. Tsukamoto, A. Uchino, et al. (2005). "Decreased expression of interleukin-21 receptor on peripheral B lymphocytes in systemic lupus erythematosus." Int J Mol Med **16**(4): 609-615.

Mizoguchi, A. and A. K. Bhan (2006). "A case for regulatory B cells." J Immunol **176**(2): 705-710.

Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, R. N. Smith, F. I. Preffer and A. K. Bhan (1997). "Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice." J Exp Med **186**(10): 1749-1756.

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

Molnarfi, N., U. Schulze-Topphoff, M. S. Weber, J. C. Patarroyo, T. Prod'homme, et al. (2013). "MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies." J Exp Med **210**(13): 2921-2937.

Nakano, S., S. Morimoto, J. Suzuki, A. Mitsuo, Y. Nakiri, et al. (2007). "Down-regulation of CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis." Autoimmunity **40**(1): 9-15.

Nashold, F. E., K. A. Hoag, J. Goverman and C. E. Hayes (2001). "Rag-1-dependent cells are necessary for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **119**(1): 16-29.

Neesse, A., P. Michl, S. Kunsch, T. M. Gress and M. Steinkamp (2009). "Glatiramer acetate: a novel therapeutic approach in Crohn's disease?" Inflamm Bowel Dis **15**(1): 156-157.

Neuhaus, O., C. Farina, A. Yassouridis, H. Wiendl, F. Then Bergh, et al. (2000). "Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7452-7457.

Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, 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, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, et al. (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-1847.

Ng, K. P., G. Cambridge, M. J. Leandro, J. C. Edwards, M. Ehrenstein, et al. (2007). "B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response." Ann Rheum Dis **66**(9): 1259-1262.

Nishimura, S., I. Manabe, S. Takaki, M. Nagasaki, M. Otsu, et al. (2013). "Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation." Cell Metab.

Noh, G. and J. H. Lee (2011). "Regulatory B cells and allergic diseases." Allergy Asthma Immunol Res **3**(3): 168-177.

Noh, J. and G. Noh (2012). "Allergen-specific responses of CD19(high) and CD19(low) B Cells in Non-IgE-mediated food allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis: presence of IL-17- and IL-32-producing regulatory B cells (Br17 & Br32)." Inflamm Allergy Drug Targets **11**(4): 320-329.

Nouel, A., I. Segalen, C. Jamin, L. Doucet, S. Caillard, 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, C. Jamin, J. O. Pers and S. Hillion (2014). "Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation." Front Immunol **5**: 11.

Olkhanud, P. B., B. Damdinsuren, M. Bodogai, R. E. Gress, R. Sen, et al. (2011). "Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells." Cancer Res **71**(10): 3505-3515.

Pachner, A. R., L. Li and K. Narayan (2007). "Intrathecal antibody production in an animal model of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **185**(1-2): 57-63.

Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, 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, R. Danger, M. Giral, M. Racape, 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.

Pettinelli, C. B. and D. E. McFarlin (1981). "Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes." *J Immunol* **127**(4): 1420-1423.

Pillai, V. and N. J. Karandikar (2007). "Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation?" *Immunol Lett* **114**(1): 9-15.

Poe, J. C., S. H. Smith, K. M. Haas, K. Yanaba, T. Tsubata, et al. (2011). "Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice." *PLoS One* **6**(7): e22464.

Praksova, P., P. Stourac, J. Bednarik, E. Vlckova, Z. Mikulkova, et al. (2012). "Immunoregulatory T cells in multiple sclerosis and the effect of interferon beta and glatiramer acetate treatment on T cell subpopulations." *J Neurol Sci* **319**(1-2): 18-23.

Qian, L., C. Qian, Y. Chen, Y. Bai, Y. Bao, et al. (2012). "Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcgammaRIIbhi regulatory B cells through IFN-beta and CD40L." *Blood* **120**(3): 581-591.

Qin, Y., D. Q. Zhang, A. Prat, S. Pouly and J. Antel (2000). "Characterization of T cell lines derived from glatiramer-acetate-treated multiple sclerosis patients." *J Neuroimmunol* **108**(1-2): 201-206.

Racke, M. K., A. E. Lovett-Racke and N. J. Karandikar (2010). "The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis." *Neurology* **74 Suppl 1**: S25-30.

Rafei, M., J. Hsieh, S. Zehntner, M. Li, K. Forner, et al. (2009). "A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties." *Nat Med* **15**(9): 1038-1045.

Rauch, P. J., A. Chudnovskiy, C. S. Robbins, G. F. Weber, M. Etzrodt, et al. (2012). "Innate response activator B cells protect against microbial sepsis." *Science* **335**(6068): 597-601.

Ray, A., S. Basu, C. B. Williams, N. H. Salzman and B. N. Dittel (2012). "A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand." *J Immunol* **188**(7): 3188-3198.

Rodriguez-Caruncho, C., I. Bielsa, M. T. Fernandez-Figueras, J. Roca, J. M. Carrascosa, et al. (2015). "Lupus erythematosus tumidus: a clinical and histological study of 25 cases." *Lupus* **24**(7): 751-755.

Rolle, L., M. Memarzadeh Tehran, A. Morell-Garcia, Y. Raeva, A. Schumacher, et al. (2013). "Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy." Am J Reprod Immunol **70**(6): 448-453.

Romagnani, S. (1999). "Th1/Th2 cells." Inflamm Bowel Dis **5**(4): 285-294.

Rosser, E. C., K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, et al. (2014). "Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production." Nat Med **20**(11): 1334-1339.

Ruggieri, M., C. Avolio, S. Scacco, C. Pica, A. Lia, et al. (2006). "Glatiramer acetate induces pro-apoptotic mechanisms involving Bcl-2, Bax and Cyt-c in peripheral lymphocytes from multiple sclerosis patients." J Neurol **253**(2): 231-236.

Salama, H. H., J. Hong, Y. C. Zang, A. El-Mongui and J. Zhang (2003). "Blocking effects of serum reactive antibodies induced by glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis." Brain **126**(Pt 12): 2638-2647.

Sand, K. L., E. Knudsen, J. Rolin, Y. Al-Falahi and A. A. Maghazachi (2009). "Modulation of natural killer cell cytotoxicity and cytokine release by the drug glatiramer acetate." Cell Mol Life Sci **66**(8): 1446-1456.

Sanna, A., M. L. Fois, G. Arru, Y. M. Huang, H. Link, et al. (2006). "Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis." Clin Exp Immunol **143**(2): 357-362.

Sanz, I., J. H. Anolik and R. J. Looney (2007). "B cell depletion therapy in autoimmune diseases." Front Biosci **12**: 2546-2567.

Sanz, I., C. Wei, F. E. Lee and J. Anolik (2008). "Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells." Semin Immunol **20**(1): 67-82.

Saresella, M., I. Marventano, F. R. Guerini, M. Zanzottera, S. Delbue, et al. (2008). "Myelin basic protein-specific T lymphocytes proliferation and programmed cell death in demyelinating diseases." Clin Immunol **129**(3): 509-517.

Saresella, M., I. Marventano, R. Longhi, F. Lissoni, D. Trabattoni, et al. (2008). "CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy." FASEB J **22**(10): 3500-3508.

Sattler, S., G. S. Ling, D. Xu, L. Hussaarts, A. Romaine, et al. (2014). "IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut." J Autoimmun **50**: 107-122.

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

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

Schmied, M., P. W. Duda, J. I. Krieger, C. Trollmo and D. A. Hafler (2003). "In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis." Clin Immunol **106**(3): 163-174.

Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol **21**: 305-334.

Seamons, A., A. Perchellet and J. Goverman (2006). "Endogenous myelin basic protein is presented in the periphery by both dendritic cells and resting B cells with different functional consequences." J Immunol **177**(4): 2097-2106.

Serafini, B., B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, E. Capello, et al. (2006). "Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells." J Neuropathol Exp Neurol **65**(2): 124-141.

Serra, P. and P. Santamaria (2006). "To 'B' regulated: B cells as members of the regulatory workforce." Trends Immunol **27**(1): 7-10.

Sfikakis, P. P., J. N. Boletis, S. Lionaki, V. Vigklis, K. G. Fragiadaki, et al. (2005). "Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial." Arthritis Rheum **52**(2): 501-513.

Shaw, M. H., N. Kamada, Y. G. Kim and G. Nunez (2012). "Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine." J Exp Med **209**(2): 251-258.

Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, et al. (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.

Shimamura, T., S. Habu, K. Hashimoto and S. Sasaki (1984). "Feedback suppression of the immune response in vivo. III. Lyt-1+ B cells are suppressor-inducer cells." Cell Immunol **83**(1): 221-224.

Shlomchik, M. J., M. P. Madaio, D. Ni, M. Trounstein and D. Huszar (1994). "The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity." J Exp Med **180**(4): 1295-1306.

Silva, H. M., M. C. Takenaka, P. M. Moraes-Vieira, S. M. Monteiro, M. O. Hernandez, et al. (2012). "Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation." Mol Med **18**: 733-743.

Sinha, S., F. R. Itani and N. J. Karandikar (2014). "Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells." Immunol Res **59**(1-3): 254-265.

Smith, K. G., R. B. Jones, S. M. Burns and D. R. Jayne (2006). "Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment." Arthritis Rheum **54**(9): 2970-2982.

Snir, A., A. Kessel, T. Haj, I. Rosner, G. Slobodin, et al. (2011). "Anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab): a B cell targeting therapy." Clin Exp Rheumatol **29**(4): 697-700.

Spach, K. M., F. E. Nashold, B. N. Dittel and C. E. Hayes (2006). "IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(9): 6030-6037.

Stasi, R., N. Cooper, G. Del Poeta, E. Stipa, M. Laura Evangelista, et al. (2008). "Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab." Blood **112**(4): 1147-1150.

Staugaitis, S. M., J. K. Roberts, R. L. Sacco, J. R. Miller and A. J. Dwork (1998). "Devic type multiple sclerosis in an 81 year old woman." J Neurol Neurosurg Psychiatry **64**(3): 417-418.

Stern, J. N., D. B. Keskin, H. Zhang, H. Lv, Z. Kato, et al. (2008). "Amino acid copolymer-specific IL-10-secreting regulatory T cells that ameliorate autoimmune diseases in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5172-5176.

Stockschlaeder, M., O. Shardakova, K. Weber, V. R. Stoldt, B. Fehse, et al. (2010). "Highly efficient lentiviral transduction of phenotypically and genotypically characterized endothelial progenitor cells from adult peripheral blood." Blood Coagul Fibrinolysis **21**(5): 464-473.

Sun, C. M., E. Deriaud, C. Leclerc and R. Lo-Man (2005). "Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs." Immunity **22**(4): 467-477.

Sun, J. B., C. Czerkinsky and J. Holmgren (2012). "B lymphocytes treated in vitro with antigen coupled to cholera toxin B subunit induce antigen-specific Foxp3(+) regulatory T cells and protect against experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **188**(4): 1686-1697.

Tangye, S. G., Y. J. Liu, G. Aversa, J. H. Phillips and J. E. de Vries (1998). "Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27." J Exp Med **188**(9): 1691-1703.

Tedder, T. F. and W. J. Leonard (2014). "Autoimmunity: regulatory B cells--IL-35 and IL-21 regulate the regulators." Nat Rev Rheumatol **10**(8): 452-453.

Teitelbaum, D., T. Brenner, O. Abramsky, R. Aharoni, M. Sela, et al. (2003). "Antibodies to glatiramer acetate do not interfere with its biological functions and therapeutic efficacy." Mult Scler **9**(6): 592-599.

Teitelbaum, D., A. Meshorer, T. Hirshfeld, R. Arnon and M. Sela (1971). "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide." Eur J Immunol **1**(4): 242-248.

Teitelbaum, D., C. Webb, M. Bree, A. Meshorer, R. Arnon, et al. (1974). "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Rhesus monkeys by a synthetic basic copolymer." Clin Immunol Immunopathol **3**(2): 256-262.

Teitelbaum, D., C. Webb, A. Meshorer, R. Arnon and M. Sela (1973). "Suppression by several synthetic polypeptides of experimental allergic encephalomyelitis induced in guinea pigs and rabbits with bovine and human basic encephalitogen." Eur J Immunol **3**(5): 273-279.

Tennakoon, D. K., R. S. Mehta, S. B. Ortega, V. Bhoj, M. K. Racke, et al. (2006). "Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis." J Immunol **176**(11): 7119-7129.

Tew, G. W., N. Rabbee, K. Wolslegel, H. J. Hsieh, J. G. Monroe, et al. (2010). "Baseline autoantibody profiles predict normalization of complement and anti-dsDNA autoantibody levels following rituximab treatment in systemic lupus erythematosus." Lupus **19**(2): 146-157.

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

Toledano, M., B. G. Weinshenker and A. J. Solomon (2015). "A Clinical Approach to the Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis." Curr Neurol Neurosci Rep **15**(8): 57.

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

Tyler, A. F., J. P. Mendoza, M. Firan and N. J. Karandikar (2013). "CD8 T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease." PLoS One **8**(6): e66772.

Ure, D. R. and M. Rodriguez (2002). "Polyreactive antibodies to glatiramer acetate promote myelin repair in murine model of demyelinating disease." FASEB J **16**(10): 1260-1262.

Urich, E., I. Gutcher, M. Prinz and B. Becher (2006). "Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18697-18702.

van de Beek, M. T., W. Taal, R. F. Veldkamp and C. J. Vecht (2003). "A woman with multiple sclerosis and pink saliva." Lancet Neurol **2**(4): 254-255.

van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Sollner, 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 Vlugt, L. E., L. A. Labuda, A. Ozir-Fazalalikhani, E. Lievers, A. K. Gloudemans, et al. (2012). "Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells." PLoS One **7**(2): e30883.

Varkony, H., V. Weinstein, E. Klinger, J. Sterling, H. Cooperman, et al. (2009). "The glatiramoid class of immunomodulator drugs." Expert Opin Pharmacother **10**(4): 657-668.

Vasconcellos, R., N. A. Carter, E. C. Rosser and C. Mauri (2011). "IL-12p35 subunit contributes to autoimmunity by limiting IL-27-driven regulatory responses." J Immunol **187**(6): 3402-3412.

Venigalla, R. K., T. Tretter, S. Krienke, R. Max, V. Eckstein, et al. (2008). "Reduced CD4⁺,CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺,CD25^{high},CD127⁻/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **58**(7): 2120-2130.

Vieira, P. L., H. C. Heystek, J. Wormmeester, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg (2003). "Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells." J Immunol **170**(9): 4483-4488.

Vrouwe, M. G., E. Elghalbzouri-Maghrani, M. Meijers, P. Schouten, B. C. Godthelp, et al. (2007). "Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair." Hum Mol Genet **16**(12): 1478-1487.

Wang, L., A. Ray, X. Jiang, J. Y. Wang, S. Basu, et al. (2015). "T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis." Mucosal Immunol.

Wang, R. X., C. R. Yu, I. M. Dambuza, R. M. Mahdi, M. B. Dolinska, et al. (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." Nat Med **20**(6): 633-641.

Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, et al. (2003). "Predominant autoantibody production by early human B cell precursors." Science **301**(5638): 1374-1377.

Watanabe, R., M. Fujimoto, N. Ishiura, Y. Kuwano, H. Nakashima, et al. (2007). "CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity." Am J Pathol **171**(2): 560-570.

Watanabe, R., N. Ishiura, H. Nakashima, Y. Kuwano, H. Okochi, et al. (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity." J Immunol **184**(9): 4801-4809.

Weber, M. S. and B. Hemmer (2010). "Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis." Results Probl Cell Differ **51**: 115-126.

Weber, M. S., T. Prod'homme, S. Youssef, S. E. Dunn, C. D. Rundle, et al. (2007). "Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease." Nat Med **13**(8): 935-943.

Weder, C., G. M. Baltariu, K. A. Wyler, H. J. Gober, C. Lienert, et al. (2005). "Clinical and immune responses correlate in glatiramer acetate therapy of multiple sclerosis." Eur J Neurol **12**(11): 869-878.

Wei, B., P. Velazquez, O. Turovskaya, K. Spricher, R. Aranda, et al. (2005). "Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 2010-2015.

Wejksza, K., C. Lee-Chang, M. Bodogai, J. Bonzo, F. J. Gonzalez, et al. (2013). "Cancer-produced metabolites of 5-lipoxygenase induce tumor-evoked regulatory B cells via peroxisome proliferator-activated receptor alpha." J Immunol **190**(6): 2575-2584.

Wiesemann, E., J. Klatt, D. Sonmez, R. Blasczyk, F. Heidenreich, et al. (2001). "Glatiramer acetate (GA) induces IL-13/IL-5 secretion in naive T cells." J Neuroimmunol **119**(1): 137-144.

Wiesemann, E., J. Klatt, C. Wenzel, F. Heidenreich and A. Windhagen (2003). "Correlation of serum IL-13 and IL-5 levels with clinical response to Glatiramer acetate in patients with multiple sclerosis." Clin Exp Immunol **133**(3): 454-460.

Williams, K. C., E. Ulvestad and W. F. Hickey (1994). "Immunology of multiple sclerosis." Clin Neurosci **2**(3-4): 229-245.

Winkler-Pickett, R., H. A. Young, J. M. Cherry, J. Diehl, J. Wine, et al. (2008). "In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses." J Immunol **180**(7): 4495-4506.

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

Wong, S. H., J. L. Barlow, S. Nabarro, P. G. Fallon and A. N. McKenzie (2010). "Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response." Immunology **131**(1): 77-88.

Wright, K. B., G. J. Viviers, N. S. Proctor, J. C. Kauffman and E. G. Bruening (1965). "Multiple Sclerosis in a South African-Born White Man and Woman." S Afr Med J **39**: 386-389.

Wu, H. J., Ivanov, II, J. Darce, K. Hattori, T. Shima, et al. (2010). "Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells." Immunity **32**(6): 815-827.

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

Xiu, Y., C. P. Wong, J. D. Bouaziz, Y. Hamaguchi, Y. Wang, et al. (2008). "B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions." J Immunol **180**(5): 2863-2875.

Xue, L., T. Hickling, R. Song, J. Nowak and B. Rup (2015). "Contribution of enhanced engagement of antigen presentation machinery to the clinical immunogenicity of a human IL21 receptor-blocking therapeutic antibody." Clin Exp Immunol.

Yan, J., B. P. Harvey, R. J. Gee, M. J. Shlomchik and M. J. Mamula (2006). "B cells drive early T cell autoimmunity in vivo prior to dendritic cell-mediated autoantigen presentation." J Immunol **177**(7): 4481-4487.

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

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

Yanaba, K., Y. Hamaguchi, G. M. Venturi, D. A. Steeber, E. W. St Clair, et al. (2007). "B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity." J Immunol **179**(2): 1369-1380.

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

Yang, C., H. Lee, S. Pal, V. Jove, J. Deng, et al. (2013). "B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis." PLoS One **8**(5): e64159.

Yang, M., L. Sun, S. Wang, K. H. Ko, H. Xu, et al. (2010). "Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells." J Immunol **184**(7): 3321-3325.

Yang, X., J. Yang, Y. Chu, J. Wang, M. Guan, et al. (2013). "T follicular helper cells mediate expansion of regulatory B cells via IL-21 in Lupus-prone MRL/lpr mice." PLoS One **8**(4): e62855.

Yeung, M. Y., Q. Ding, C. R. Brooks, S. Xiao, C. J. Workman, et al. (2015). "TIM-1 Signaling Is Required for Maintenance and Induction of Regulatory B Cells." Am J Transplant.

Yokoyama, S., D. Staunton, R. Fisher, M. Amiot, J. J. Fortin, et al. (1991). "Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48." J Immunol **146**(7): 2192-2200.

Yoshizaki, A., T. Miyagaki, D. J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, et al. (2012). "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions." Nature **491**(7423): 264-268.

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

Youinou, P., C. Jamin and P. M. Lydyard (1999). "CD5 expression in human B-cell populations." Immunol Today **20**(7): 312-316.

Zhang, B., T. Yamamura, T. Kondo, M. Fujiwara and T. Tabira (1997). "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells." J Exp Med **186**(10): 1677-1687.

Zhang, M., C. C. Chan, B. Vistica, V. Hung, B. Wiggert, et al. (2000). "Copolymer 1 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis." J Neuroimmunol **103**(2): 189-194.

Zhang, Y., Y. Eliav, S. U. Shin, T. H. Schreiber, E. R. Podack, et al. (2013). "B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion." Cancer Immunol Immunother **62**(1): 87-99.

Zhang, Y., N. Gallastegui and J. D. Rosenblatt (2015). "Regulatory B cells in anti-tumor immunity." Int Immunol **27**(10): 521-530.

Zheng, B., K. Switzer, E. Marinova, J. Zhang and S. Han (2008). "Exacerbation of autoimmune arthritis by copolymer-I through promoting type 1 immune response and autoantibody production." Autoimmunity **41**(5): 363-371.

Zhou, L. and D. R. Littman (2009). "Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation." Curr Opin Immunol **21**(2): 146-152.

Zhou, P., J. Qiu, L. L'Italien, D. Gu, D. Hodges, et al. (2010). "Mature B cells are critical to T-cell-mediated tumor immunity induced by an agonist anti-GITR monoclonal antibody." J Immunother **33**(8): 789-797.

Ziemssen, T. (2004). "Neuroprotection and glatiramer acetate: the possible role in the treatment of multiple sclerosis." Adv Exp Med Biol **541**: 111-134.

Ziemssen, T., O. Neuhaus, C. Farina, H. P. Hartung and R. Hohlfeld (2002). "[Treatment of multiple sclerosis with glatiramer acetate. Current aspects of mechanisms of action, pharmacokinetics, adverse effect profile and clinical studies]." Nervenarzt **73**(4): 321-331.

Zvartau-Hind, M., C. Caon, R. Zabad, A. Tselis, R. Lisak, et al. (2002). "Glatiramer acetate for multiple sclerosis: a comprehensive review of mechanisms and clinical efficacy." Expert Rev Neurother **2**(3): 285-294.

RESUME

Le lymphocyte B (LB) des patients lupiques est réfractaire à tous les procédés décrits à ce jour pour activer une fonction régulatrice B (Breg). Il constitue de ce fait un modèle intéressant d'étude de la déficience Breg chez l'Homme et soulève de nombreuses interrogations. Est-il possible de restaurer un défaut d'activation de la régulation LB? Si oui est-il possible d'agir à temps et le plus efficacement possible, et comment s'y prendre? Ou au contraire, est-ce un état irréversible de la cellule B? Ce travail de thèse a pour objectif principal de répondre à cette problématique essentielle à notre compréhension du Breg. Grâce à un polypeptide de synthèse le Glatiramer acetate (GA), nous montrons que la restauration de la fonction régulatrice d'un Breg chez les patients lupiques est possible. Le compartiment LB mémoire fixe fortement le GA et la pré-sensibilisation par le GA permet d'augmenter le potentiel régulateur des LB mémoires mais n'affecte aucunement celui des LB matures. Le GA exerce deux actions majeures sur le LB mémoire. D'une part, il génère une meilleure capacité d'inhibition de la prolifération T, dont le mécanisme est associé à un contact cellulaire impliquant les molécules HLA-DR. D'autre part, il favorise un contrôle plus efficace de la polarisation Th1 qui est très probablement associé à sa capacité à induire la production d'IL-10 dans ces LB. Enfin, le GA modifie le phénotype des LB mémoires puisque l'expression de CD5, IL-21R, ou encore PD-1 est significativement augmentée, autant de molécules impliquées dans la fonction suppressive et dans la production d'IL-10. En conclusion, nous montrons qu'amplifier une fonction régulatrice et surtout la restaurer lorsqu'elle est défaillante chez les malades, est parfaitement possible in vitro. Face à l'engouement suscité par le développement de procédés favorisant l'expansion des Bregs chez la souris à des fins thérapeutiques, l'enjeu est aujourd'hui d'être en mesure d'extrapoler de telles démarches chez l'Homme. Ce travail, avec toute la modestie requise, contribuera à faire naître un nouvel élan vers de telles perspectives.

ABSTRACT

B cell in systemic lupus erythematosus (SLE) is unresponsive to all methods described to date, to activate B cells regulatory (Breg) function. Therefore, it is an interesting model to study the Breg deficiency in Human, and highlights many questions: is there a way to restore a defect of the Breg activation? If yes, how can we act more efficiently? Or in contrast, is it an irreversible state of the B cell? Glatiramer Acetate (GA) is a synthetic polypeptide used in the treatment of multiple sclerosis. We show that Breg activity of SLE B cells can be restored after stimulation with GA. Interestingly, memory B cells bound high level of FITC-conjugated GA in contrast to mature B cells. We demonstrate that GA can increase specifically the regulatory activities of memory B cells. GA exerts two major actions on the memory B cells. It generates an improved capacity of inhibition of the T cell proliferative response, whose mechanism is associated with a cellular contact involving HLA-DR molecules. In addition, GA supports a more effective control of the Th1 polarization which is most likely associated with its capacity to induce the production of IL-10 in these B cells. Finally, GA modifies the memory B cell phenotype since the expression CD5, IL-21R, or PD-1 is significantly increased, all molecules involved in the suppressive function and the IL-10 production. In conclusion, our results show for the first time that amplification of Breg function and additionally its restoration when it is defective in patients, can be perfectly achieved in vitro. Currently, while the development of new process supporting the expansion of Bregs in the mouse model exist, the challenge is to extrapolate such methods in human. Through the control of their regulatory potential, regulatory B cells could be the targets of novel therapeutic approach in autoimmune diseases. This study might open up new horizons in this field.