



**HAL**  
open science

# Etude de l'implication des cellules B dans l'homéostasie du système immunitaire en transplantation rénale

François Brinas

► **To cite this version:**

François Brinas. Etude de l'implication des cellules B dans l'homéostasie du système immunitaire en transplantation rénale. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2024. Français. NNT : 2024NANU1001 . tel-04698843

**HAL Id: tel-04698843**

**<https://theses.hal.science/tel-04698843>**

Submitted on 16 Sep 2024

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

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

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie-Santé*

Spécialité : « Immunologie »

Par

« **François BRINAS** »

« **Etude de l'implication des cellules B dans l'homéostasie du système immunitaire en transplantation rénale** »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 16 janvier 2024 »

Unité de recherche : CR2TI INSERM UMR 1064

## Rapporteurs avant soutenance :

Oriol Bestard-Matamoros  
Renaud Snanoudj

Professeur - Fundacio Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona  
Professeur - CHU Kremlin-Bicêtre, Paris

## Composition du Jury :

Président : Sophie Hillion  
Examineurs : Céline Delaloy  
Sophie Hillion

MCU-PH, LBAI - Université de Brest, Brest  
CR1, MOBIDIC - Université de Rennes 1, Rennes  
MCU-PH, LBAI - Université de Brest, Brest

Directeur de thèse : Sophie Brouard  
Co-encadrant : Richard Danger

DRCE1, CR2TI – UMR1064, Nantes Université  
Ingénieur Hospitalier, CR2TI – UMR1064, CHU Nantes

# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Pr. Renaud Snanoudj et le Pr. Oriol Bestard-Matamoros d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Dr. Céline Delaloy ainsi que le Dr. Sophie Hillion d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel au cours de cette thèse et de bien vouloir évaluer ce travail final en tant que membres de mon jury. Merci pour nos discussions et vos précieux conseils.

A ma directrice de thèse Sophie, je t'ai envoyé un mail à la fin de ma thèse de pharmacie et sur un timing parfait tu as tout de suite accepté de me prendre comme thésard. Tout au long de ma thèse tu as fait preuve de la même bienveillance et confiance à mon égard et pour ça je ne te remercierai jamais assez. Le calme et la sérénité sont deux qualités que je tente de développer mais merci de m'en avoir prêté tout au long de ce travail pendant lequel je sais que j'ai pu te déprimer par mon pessimisme chronique et pour ça je te présente mes excuses. Je me considère comme très chanceux d'avoir travaillé sous ta responsabilité.

A mon encadrant Richard, je te présente les mêmes excuses qu'à Sophie et je pense devoir insister. Merci pour tous le temps que tu as bien voulu m'accorder pour me former, m'aider et juste bien vouloir discuter chaque fois que j'avais un doute. Grâce à toi je ressors de cette thèse plein de connaissances et de confiance. Je souhaite à tout étudiant d'avoir un encadrement comme celui-là, merci.

Merci à tous les membres du CR2TI avec qui j'ai pu travailler car tous ont été adorables. Merci aux gens de la culture 3 qui est la pièce la plus propre du laboratoire n'en déplaise aux médisants. Merci à Gaëlle et Van Ha pour toute votre aide et votre disponibilité. Merci à Nicolas Degauque de m'avoir formé aux rouages de Omiq et pour ton aide très précieuse lors de mes analyses. Un immense merci à la matriarche de la cytométrie du CR2TI Laurence qui forme parfaitement tous les étudiants de cette unité et fait preuve de patience même quand on oublie d'éteindre un cytomètre, ce qui ne m'est jamais arrivé. Merci au Pr. Magali Giral ainsi qu'à Clarisse et Emmanuelle pour votre aide et votre participation aux aspects cliniques de ce travail. Merci à Sylvie pour ton efficacité et ta gentillesse. Merci à Amandine et Nicolas mes collègues thésards de notre équipe pour votre soutien et vos précieux coups de mains. Merci à tous mes collègues de l'open space dans lequel il fait bon travailler et rigoler.

Merci à mes proches, ma famille et surtout Delhia qui a émotionnellement parlant largement participé à ce travail.



# Sommaire

<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
INTRODUCTION .....	11
<i>I. Transplantation rénale</i> .....	11
A. Contexte et indications .....	11
B. Risques de perte du greffon .....	12
1) Risques de perte du greffon non liés à un rejet .....	12
2) Réponse allo-immune envers le greffon .....	14
a) Complexe Majeur d’Histocompatibilité et allo-antigènes.....	14
b) Organes lymphoïdes secondaires .....	14
c) Lymphocytes T .....	15
i. Activation des Lymphocytes T.....	15
ii. Processus inflammatoire médié par les LT.....	18
d) Lymphocytes B.....	19
i. Rôle des lymphocytes B dans la réponse allo-immune.....	19
ii. Processus inflammatoire du rejet humoral.....	20
e) Considération du risque allo-immun.....	21
C. Prise en charge du risque immunologique .....	23
1) Les rejets .....	23
a) Le rejet hyper-aigu .....	23
b) Le rejet aigu .....	23
c) Le rejet chronique .....	24
d) Rejets infracliniques.....	24
2) L’immunosuppression .....	24
a) Traitement d’induction .....	25
b) Traitement d’entretien .....	26
i. Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI).....	26
ii. Agents antiprolifératifs .....	27
iii. Corticostéroïdes.....	27
iv. Inhibiteurs de mTORC .....	28
v. Inhibiteurs de co-stimulation .....	28
c) Traitement du rejet.....	29
3) Les limites de la prise en charge du risque immunologique .....	30
a) Stagnation de l’amélioration de la survie des greffons.....	30
b) Effets indésirables des traitements IS.....	30

c) Minimisation/arrêt des traitements IS .....	31
D. Tolérance .....	32
<b>II. Les lymphocytes B.....</b>	<b>34</b>
A. BCR et anticorps .....	34
1) Structure .....	34
2) Génération du BCR.....	36
3) Signalisation du BCR.....	37
B. Ontogénèse lymphocytaire B .....	38
1) Progéniteurs et précurseurs des cellules B .....	38
2) Tolérance centrale .....	39
3) Tolérance périphérique des LB transitionnels.....	39
C. Maturation et activation périphérique des LB .....	40
1) Différentes populations de LB matures.....	40
2) Activation des lymphocytes B .....	41
a) Antigène thymo-indépendant.....	41
b) Antigène thymo-dépendant .....	42
3) Commutation de classe.....	43
4) Centres germinatifs et mutation hypersomatique.....	44
5) Plasmocytes .....	46
6) LB mémoires .....	47
D. Diversité phénotypique des LB.....	48
1) Marqueurs extracellulaires des principales populations de LB périphériques .....	48
2) Lymphocytes B atypiques.....	49
3) Tolérance opérationnelle et lymphocytes B.....	51
<b>III. TCL1A .....</b>	<b>53</b>
A. L'expression de TCL1A comme marqueur de la bonne fonction du greffon .....	53
B. La protéine TCL1A.....	55
1) Structure et interactions de la protéine TCL1A .....	55
2) Expression de TCL1A .....	57
a) Physiologique et pathologique .....	57
b) Eléments régulant l'expression de TCL1A.....	58
c) Le facteur de transcription CRTC2.....	58
C. Le rôle de TCL1A dans la survie des lymphocytes B.....	59
1) PI3K-Akt dans la survie des LB.....	59
2) TCL1A permet l'expression de Mcl-1 et la survie des LB naïfs par une signalisation BCR dépendante .....	60
3) Renforcement de l'effet anti-apoptotique de la voie NF-κB.....	61
D. TCL1A dans la différenciation des lymphocytes B .....	61
1) Implication de TCL1A dans l'expression de facteurs de différenciation plasmocytaires.....	61
2) Rôle de TCL1A dans les centres germinatifs.....	63
E. Lien entre TCL1A et l'IL-10 .....	63
1) La voie PI3K-Akt impliquée dans l'expression d'IL-10 .....	63
2) La surexpression de TCL1A associée aux cellules B10.....	64

3) Rôle de l'inhibition de PTPROt par TCL1A sur l'expression d'IL-10 .....	65
IV. Objectifs.....	66
V. Références .....	68
RESULTATS.....	102
I. Les patients tolérants présentent une augmentation d'une population de lymphocytes B sanguins possédant un phénotype naïf $TCL1A^{low}$ .....	102
A. Résumé de l'article .....	103
B. Introduction.....	104
C. Patient and Methods .....	105
1) Study population .....	105
2) PBMC phenotyping by spectral cytometry.....	106
3) $TCL1A^{high/low}$ naïve B-cell RNA isolation and gene expression .....	106
4) Single-cell transcriptomic analysis of $TCL1A^{low}$ B-cells .....	107
5) Statistical analysis .....	108
D. Results.....	111
1) An increased frequency of total B-cells and $TCL1A^+$ B-cells in TOLs.....	111
2) A $TCL1A^{low}$ naïve B-cell population overrepresented in TOLs .....	114
3) The $TCL1A^{low}$ naïve B-cell population harbored defective expression of genes involved in B-cell survival and differentiation and an increase in migratory and IL-10-related markers. ....	117
E. Discussion .....	119
F. Supplementary data .....	122
G. Références .....	135
II. Augmentation d'une population de lymphocytes B $CD27^- IgD^- CD11c^+$ chez des patients transplantés rénaux présentant une stabilité de leur greffon à long terme sous immunosuppression .....	141
A. Résumé de l'article .....	142
B. Introduction.....	143
C. Materials and Methods .....	144
1) Study population .....	144
2) Spectral cytometry .....	145
3) Statistical analysis .....	146
D. Results.....	146
1) Patient description .....	146
2) LTTs show a B-cell imbalance in favor of differentiated B-cell subpopulations .....	146
3) LTTs possessed a higher frequency of $CD11c^+$ B-cells with an $IgD^- CD27^- DN$ memory phenotype, class switch BCR expression and exhausted phenotype .....	147
E. Discussion .....	153
F. Supplementary data .....	156
G. Références .....	176
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	181
I. Limites rencontrées dans nos deux études .....	181
II. Etude de la population de LB naïfs $TCL1A^{low}$ chez les patients tolérants .....	182

<i>III. Etude de la population de LB mémoires CD11c<sup>+</sup> chez les patients stables à long terme .....</i>	<i>187</i>
CONCLUSION.....	190
<b>ANNEXE : REVUE TCL1A, B CELL REGULATION AND TOLERANCE IN RENAL TRANSPLANTATION .....</b>	<b>198</b>

## Publications et Communications

### Articles originaux

Brinas, F., Sailliet, N., Tilly, G., Delbos, L., Kerleau, C., Giral, M., Degauque, N., Brouard, S., Danger, R., Tolerant Kidney Transplanted Patients Display an increase of a blood B-cell population with a TCL1A<sup>low</sup> Naive phenotype

(soumis)

Brinas, F., Sailliet, N., Tilly, G., Delbos, L., Kerleau, C., Giral, M., Degauque, N., Brouard, S., Danger, R., Rise of a CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells population in kidney recipients achieving long term graft stability under immunosuppression

(en préparation)

### Revue générale (avec comité de lecture)

Brinas F, Danger R, Brouard S. TCL1A, B-cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation. Cells. 2021 Jun 1;10(6):1367. doi: 10.3390/cells10061367. PMID: 34206047

### Communications orales

#### **TCL1A protein involvement in B-cells and tolerance in kidney transplantation**

2023 – European Society of Transplantation Congress - Athens - du 17 au 20 septembre 2023

#### **TCL1A protein involvement in B-cells and tolerance in kidney transplantation**

2023 – Congrès du LabEx IGO – Nantes – du 11 au 12 décembre 2023

## Liste des figures

### Introduction

Figure 1 : voies de signalisations induites lors de l'activation des LT.....	6
Figure 2 : cibles des différents types de traitements IS dans l'activation des LT.....	25
Figure 3 : frise chronologique d'appartition des traitement IS utilisés en transplantation rénale.....	29
Figure 4 : courbe de survie des greffons par décennie en années de transplantation.....	30
Figure 5 : Structure d'un anticorps.....	35
Figure 6 : Les différents isotypes d'anticorps.....	36
Figure 7 : Recombinaison des segments de gènes V(D)J et C permettant la génération d'une Ig.....	37
Figure 8 : follicule de la rate avec circulation des cellules selon l'expression de chimiokines et de leur récepteurs.....	42
Figure 9 : représentation d'un centre germinatif avec circulation des cellules selon l'expression de chimiokines et de leur récepteurs.....	45
Figure 10 : schéma de la signalisation intracellulaire impliquant la protéine TCL1A dans les lymphocytes B.....	56

### Résultats I

Figure 1 : Fréquence des principales populations de PBMCs.....	111
Figure 2 : Fréquence des sous-populations de LB.....	113
Figure 3 : Distribution des populations de LB précoces en fonction de l'expression de TCL1A.....	115
Figure 4 : Expression différentielle d'ARN dans les populations de cellules B TCL1A <sup>low</sup> et TCL1A <sup>high</sup> .....	117

### Résultats II

Figure 1 : Phénotypage des cellules B.....	148
Figure 2 : Répartition des LB CD11c <sup>+</sup> dans les sous-populations de LB en fonction de l'expression d'IgD et de CD27.....	149
Figure 3 : Répartition des LB CD11c <sup>+</sup> dans les compartiments des LB IgA <sup>+</sup> et IgG <sup>+</sup> .....	150
Figure 4 : Fréquence des cellules exprimant des marqueurs relatifs à l'activation et la régulation des LB dans les LB CD11c <sup>+</sup> .....	151

Figure 5 : expression différentielle de marqueurs relatifs à l'activation et la régulation des LB CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>-</sup> .....152

## Liste des tableaux

### Introduction

Tableau 1 : Principaux effets indésirables liés aux thérapies IS.....31

Tableau 2 : expression des marqueurs extracellulaires classiquement utilisés pour la distinction des principales populations de LB présentes en périphérie.....48

### Résultats

Tableau 1: Données cliniques des individus de chaque groupes.....108

## Liste des abréviations

ADCC : *antibody mediated cytotoxicity*

CNI : inhibiteurs de la calcineurine

AID : *activation-induced cytidine deaminase*

CREB : *cAMP response element-binding protein*

APC : présentatrices d'antigènes professionnels

CRTC2 : *transducer of regulated CREB protein 2*

ARNm : ARN messager

CSH : cellules souches hématopoïétiques

ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

CSR : commutation de classe

B-CLL : leucémie lymphocytaire chronique

DAG : diacylglycérol

B

DAMPs : *damage-associated molecular patterns*

BCR : récepteur des LB

BLNK : *B-cell linker protein*

DSA : *donnor specific antibody*

Breg : LB régulateurs

FGF : *fibroblast growth factor*

BTK : *Bruton's tyrosine kinase*

GC : centre germinatif

cellules dendritiques : DC

GSK-3 : *Glycogen Synthase Kinase-3*

CFR : cellules fibroblastiques réticulaires

GVHD : *graft versus host disease*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

HLA : *human leukocyte antigen*

HTA : hypertension artérielle

HV : volontaires sains

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IP3 : Inositol triphosphate

IS : Immunosuppresseur

ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

IV : intra veineux

LPS : lypopolysaccharides

LT régulateurs : Treg

LTA : lymphotoxine  $\alpha$

lymphocytes B : LB

lymphocytes T : LT

MAP : *mitogen-activated protein*

MO : moelle osseuse

MPA : acide mycophénolique

mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1*

MZ : zone marginale

NK : *natural killer*

OLII : organes lymphoïdes secondaires

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase

PLC : progéniteur lymphoïde commun

PLC $\gamma$ 2 : Phospholipase C gamma 2

PRA : *panel-reactive antibody*

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

PTPROt : *truncated receptor-type protein tyrosine phosphatase*

S1P : sphingosine 1 phosphate

SAB : *single-antigen beads*

SHM : hypermutation somatique

TCL1A : *T cell leukemia lymphoma protein 1A*

TCR : récepteur des LT

T<sub>FH</sub> : *LT follicular helper*

TGF- $\beta$  : *Transforming Growth Factor beta*

Th : LT auxiliaires ou *helper*

TLR : *toll like receptors*

TNF- $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

TOL : patients tolérants

TRAF : *tumor necrosis factor receptor-associated factor*

WT : phénotype sauvage ou *wild type*

XM : cross-match



# Introduction

## I. Transplantation rénale

### A. Contexte et indications

Les reins sont des organes vitaux ayant pour rôle principal la filtration du sang pour répondre aux besoins physiologiques de l'organisme. Leurs capacités d'élimination et de réabsorption permettent l'adaptation qualitative et quantitative des urines en eau, sucres, acides aminés et autres éléments essentiels à l'homéostasie cellulaire tel le sodium et les bicarbonates. Ils régulent ainsi dans l'organisme de nombreux paramètres incluant la volémie intra- et extra cellulaire, l'équilibre acido-basique et le métabolisme phospho-calcique. Ils ont également un rôle endocrinien, notamment responsables de 90% de la production d'érythropoïétine, une hormone de croissance permettant la différenciation des précurseurs érythrocytaires en érythrocytes (Gueutin et al., 2012). L'insuffisance rénale chronique et son évolution vers une insuffisance rénale terminale est une pathologie dont l'incidence croissante de ces dernières décennies la place parmi les principales causes de mortalité et de perte d'années de vie à travers le monde, touchant près de 10% de la population mondiale soit 800 millions d'individus (Hashmi et al., 2023; Kovesdy, 2022). La définition clinique de l'insuffisance rénale chronique varie mais elle peut être définie par un débit de filtration glomérulaire inférieur à 60 mL/min, un taux d'albumine supérieur à 30 mg par gramme de créatinine, associés à d'autres anomalies au niveau de la structure ou de la fonction rénale pendant plus de 3 mois (Hashmi et al., 2023). Une insuffisance rénale terminale est définie par un débit de filtration glomérulaire inférieur à 15 ml/min. Les causes d'insuffisance rénale sont multiples mais les principales sont l'âge, le diabète, l'hypertension, les maladies vasculaires et glomérulaires (Hashmi et al., 2023; Kovesdy, 2022). Il n'existe pas de traitements curatifs de la perte de fonction rénale qui est irréversible. Les principaux traitements visent à diminuer les facteurs de risque pour retarder la dégradation de la fonction rénale, incluant des traitements antihypertenseurs, hypolipémiants, ainsi que des recommandations sur le mode de vie (apports en sodium, protéines, contrôle du diabète, tabagisme), qui permettront de ralentir la dégradation des reins, mesurée principalement par le débit de filtration glomérulaire et la protéinurie. Toutefois, si l'insuffisance rénale progresse au stade terminal (grade V) et/ou est associée à d'autres facteurs aggravants (ex : acidose métabolique sévère, hyperkaliémie,

péricardite), le patient se verra indiquer une thérapie de suppléance rénale à long terme (Hashmi et al., 2023; Kovesdy, 2022).

Il existe deux principales méthodes de suppléance rénale utilisant une membrane semi-perméable pour la filtration et l'épuration du sang, la dialyse péritonéale para-corporelle et l'hémodialyse extracorporelle. Dans la première l'injection d'un dialysat à l'aide d'un cathéter souple dans l'espace péritonéal permet d'utiliser les propriétés filtrantes du péritoine pour l'épuration du sang par un gradient osmotique entre le sang et le dialysat qui est progressivement éliminé. L'hémodialyse utilise un dialyseur pour filtrer le sang à l'extérieur du corps et le réinjecter ensuite. Ces deux méthodes permettent la prise en charge rapide des patients avec de nombreuses modalités, pouvant être réalisées en continue ou discontinue, adaptées en fonction des caractéristiques du patient (âge, comorbidité, sévérité de la maladie, hospitalisation ou soins ambulatoires) et des ressources (financières, équipement, formation) (Fleming, 2011; Villa et al., 2015). Ces thérapies sont cependant coûteuses et sont associées à une perte de la qualité de vie des patients par rapport à une transplantation rénale considérée à ce jour comme le traitement de référence de l'insuffisance rénale permettant non seulement un gain de qualité de vie mais aussi de temps de survie (Jansz et al., 2018).

La transplantation rénale est indiquée pour les patients en dialyse ou la nécessitant, contre-indiquée en cas de cancer métastasé et d'infection non résolue. Le patient ayant émis la volonté d'être transplanté est informé des risques et préparé pour la transplantation. Le corps médical effectuera une batterie de tests en fonction de l'historique de santé du patient et s'assurera notamment de sa motivation et de son observance aux traitements immunosuppresseurs nécessaires à la stabilité du greffon. Les principales limites de la greffe sont la durée que le candidat pourra passer en liste d'attente, une fois greffé en l'absence de complications chirurgicales, les effets indésirables liés aux traitements immunosuppresseurs (IS) et la survenue possible d'une insuffisance rénale pouvant mener à la perte du greffon (Anglicheau et al., 2019).

## **B. Risques de perte du greffon**

### **1) Risques de perte du greffon non liés à un rejet**

En transplantation rénale, les deux causes d'une perte du greffon avec une incidence comparable sont la mort du receveur avec un greffon fonctionnel ou la défaillance du greffon

nécessitant un retour en dialyse ou une nouvelle transplantation (Christophe Legendre et al., 2014; Van Loon et al., 2020). Considérant ces deux possibilités, sur la période de 2005 à 2008 le taux de survie des greffons en Europe étaient de 91% après 1 an, 77% après 5 ans et 56% après 10 ans de transplantation (Gondos et al., 2013). Les causes du décès des receveurs avec un greffon fonctionnel sont principalement la survenue d'infections, de cancers ou de maladies cardiovasculaires. La défaillance du greffon quant à elle peut résulter de nombreux paramètres d'origine non-immunologique et immunologique, variant notamment en fonction de leur moment de survenue après la greffe (Christophe Legendre et al., 2014; Van Loon et al., 2020). Concernant les risques non immunologiques, à court terme après la greffe une insuffisance rénale aiguë pourra résulter d'un défaut fonctionnel du greffon (défaut de remplissage post-opératoire, problèmes hémodynamiques liés à une insuffisance cardiaque, déshydratation extracellulaire) ou d'une obstruction des voies urinaires ou vasculaires au niveau du greffon. La néphrotoxicité de certains traitements médicamenteux pris dans le cadre de la greffe, particulièrement les inhibiteurs de la calcineurine pourront entraîner une insuffisance rénale aiguë ou à long terme une dysfonction chronique du greffon. Les traitements IS pourront également favoriser la survenue de néphropathies virales pouvant être causées par plusieurs agents infectieux notamment le virus BK et le cytomégalo virus (Anglicheau et al., 2019; Christophe Legendre et al., 2014).

Les risques immunologiques de perte du greffon concernent en premier lieu la résurgence de néphropathies auto-immunes initiales à l'origine de la greffe. Plusieurs glomérulonéphrites primaires présentent un haut risque de récurrence après la greffe avec une prévalence allant de 3 à 15% pour les néphropathies à IgA, glomérulonéphrites extra-membraneuses et membranoprolifératives et la hyalinose segmentaire et focale (Lim et al., 2019). Leur physiopathologie est mal définie mais elle implique plusieurs types de cellules immunitaires dans la production de facteurs circulants, auto-anticorps et complexes immuns responsables d'une toxicité au niveau glomérulaire (Canaud et al., 2012). Ces glomérulonéphrites peuvent également récidiver secondairement à une pathologie systémique, lupus ou syndrome hémolytique et urémique par exemple. Ce dernier était une contre-indication à la greffe, responsable dans 80% des cas d'une résurgence de la glomérulopathie. L'apparition des thérapies ciblant la protéine C5 du complément (eculizumab) permet désormais un accès à la greffe pour les patients atteints de ce syndrome (Lim et al., 2019).

## 2) Réponse allo-immune envers le greffon

Une greffe de tissu ou de cellules est dite autologue quand le matériel biologique greffé provient du soi, allogénique quand il provient d'un autre individu de la même espèce et xénogénique lorsqu'il provient d'une autre espèce. Contrairement à d'autres types de greffes comme celles de cellules souches hématopoïétiques, d'os ou de peau, la transplantation rénale sera de nature allogénique (Jayne & Tyndall, 2004; Klaus & Pongsomboon, 1985; Triplett & Schow, 1996). Dans ces conditions le principal risque en transplantation rénale est la survenue d'une réponse allo-immune du receveur, dirigée contre l'organe du donneur et définie comme un rejet.

### a) Complexe Majeur d'Histocompatibilité et allo-antigènes

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) est une protéine transmembranaire hétérodimérique responsable de la présentation de résidus peptidiques autologues et allogénique appelés antigènes à la surface de nos cellules. Le CMH de classe I est exprimé à une densité variable par l'ensemble des cellules de l'organisme et permet le reflet de la protéosynthèse de la cellule par la présentation d'antigènes intracellulaires à l'issue de leur traitement par le protéasome. Le CMH de classe II en l'absence d'inflammation est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes professionnels (APC) comprenant les cellules dendritiques (DC), monocytes/macrophages et les lymphocytes B (LB). Il permet le reflet de l'environnement cellulaire par la présentation d'antigènes extracellulaires traités au niveau de l'endosome (Charles A Janeway et al., 2001). Ces protéines sont le produit de plusieurs gènes codants pour HLA-A, -B et -C pour le CMH I, HLA-DP, -DQ et -DR pour le CMH de classe II (HLA : *human leukocyte antigen*), présentant le plus haut degré de polymorphisme interindividuel parmi les gènes de l'organisme (Charles A Janeway et al., 2001; L. A. Sherman & Chattopadhyay, 1993). De ce fait les protéines du HLA responsables de la présentation d'antigènes constituent également des allo-antigènes majeurs dans l'immunisation de l'hôte envers son greffon (L. A. Sherman & Chattopadhyay, 1993; Snanoudj et al., 2019).

### b) Organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes secondaires (OLII) sont le lieu où se rencontre l'ensemble des antigènes tissulaires et des acteurs de la réponse immune adaptative. Les OLII systémiques incluant la rate et les ganglions lymphatiques ainsi que les OLII associés aux muqueuses partagent des structures communes avec des zones para-corticales riches en lymphocytes T

(LT) et des zones corticales contenant les follicules riches en LB (Stranford & Ruddle, 2012). Les OLII comportent un réseau de vaisseaux formés par les cellules fibroblastiques réticulaires (CFR) dans lesquels circulent les cellules et qui par la sécrétion de cytokines chimioattractives entraînent la formation de différentes zones, grâce à ces chimiokines et l'expression de leurs récepteurs par les cellules ciblées (Stein & Nombela-Arrieta, 2005; Stranford & Ruddle, 2012). Les DC ont un rôle de transit entre les tissus où elles captent les antigènes et sont activées et les OLII où elles présentent les antigènes (Tiberio et al., 2018). La migration vers les OLII des DC et des LT dans les zones para-corticales est dépendante de leur expression en CCR7 en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 sécrétées par les CFR (Stein & Nombela-Arrieta, 2005; Stranford & Ruddle, 2012; Tiberio et al., 2018). La migration des LB vers les follicules est permise par leur expression de CXCR5 en réponse à la chimiokine CXCL13 sécrétée par les DC folliculaires (Stein & Nombela-Arrieta, 2005; Stranford & Ruddle, 2012).

### c) Lymphocytes T

#### i. Activation des Lymphocytes T

La réponse allo-immune et le processus de rejet dépendent de la réponse immune adaptative avec l'activation des LT et LB du donneur. Après une transplantation, une réaction inflammatoire notamment liée au processus d'ischémie-reperfusion entrainera une expression accrue du CMH par les cellules du greffon ainsi que de signaux de dangers (DAMPs : *damage-associated molecular patterns*) capables d'activer les DC du donneur et du receveur via leur TLR (*toll like receptors*) qui migreront vers les OLII (Kim et al., 2008; Todd & Palmer, 2017). Les LT naïfs qui s'y trouvent via leur récepteur (TCR) reconnaissent les antigènes exogènes présentés par les DC du donneur, indirectement via les DC du receveur, ou de façon semi-directe par l'expression sur les DC du receveur de protéines entières du CMH du donneur (Brown et al., 2011; Golding & Singer, 1984; L. A. Sherman & Chattopadhyay, 1993). Les LT CD8 cytotoxiques sont activés via le CMH de classe I et les LT CD4 auxiliaires (Th) via le CMH de classe II (Harper et al., 2015). Si un TCR reconnaît une molécule du CMH avec une affinité suffisante, la synapse immunologique se met en place et peut aboutir à l'expansion clonale du lymphocyte, c'est-à-dire la prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices du LT naïf spécifique de l'allo-antigène présenté. Pour se faire, plusieurs signaux sont nécessaires aux LT (Dustin, 2014). Le premier est apporté par la liaison forte et prolongée entre le CMH sur les APC et le complexe TCR/CD3 porté par le clone LT qui lui est spécifique. Une telle liaison est permise grâce à la complémentarité entre les structures 3D constituées par le CMH, l'antigène

(épitope) et le TCR (paratope). Elle est renforcée par la liaison du CD8 et du CD4 aux CMH I et II, respectivement (Dustin, 2014). Un deuxième signal est apporté par les molécules de costimulation avec l'interaction entre le CD28 et le CD80/CD86 exprimés respectivement par les LT et les DC. Il permet de compléter le premier signal sans quoi les LT subissent une anergie et entrent en apoptose (Schwartz, 2003). Ces interactions au niveau transmembranaire activent dans les LT les kinases Fyn, Lck et ZAP-70, entraînant une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de la phospholipase C gamma 2 (PLC $\gamma$ 2) et la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3) (Dustin, 2014). Le DAG active les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B (D. Wang et al., 2004). L'IP3 entraîne un influx de calcium dans le cytoplasme permettant l'activation par la calcineurine qui elle-même induit la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT, permettant sa translocation dans le noyau (Rao et al., 1997). Les signaux I et II permettent également via la voie de la Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) l'activation du complexe protéique mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) impliqué dans la prolifération des LT (Pollizzi & Powell, 2015). Ces voies de signalisation entraînent la production de protéines, telle que l'interleukine 2 (IL-2), nécessaires à la survie, la prolifération et l'acquisition des fonctions effectrices des LT pendant leur expansion clonale, (Hwang et al., 2020) (figure 1).

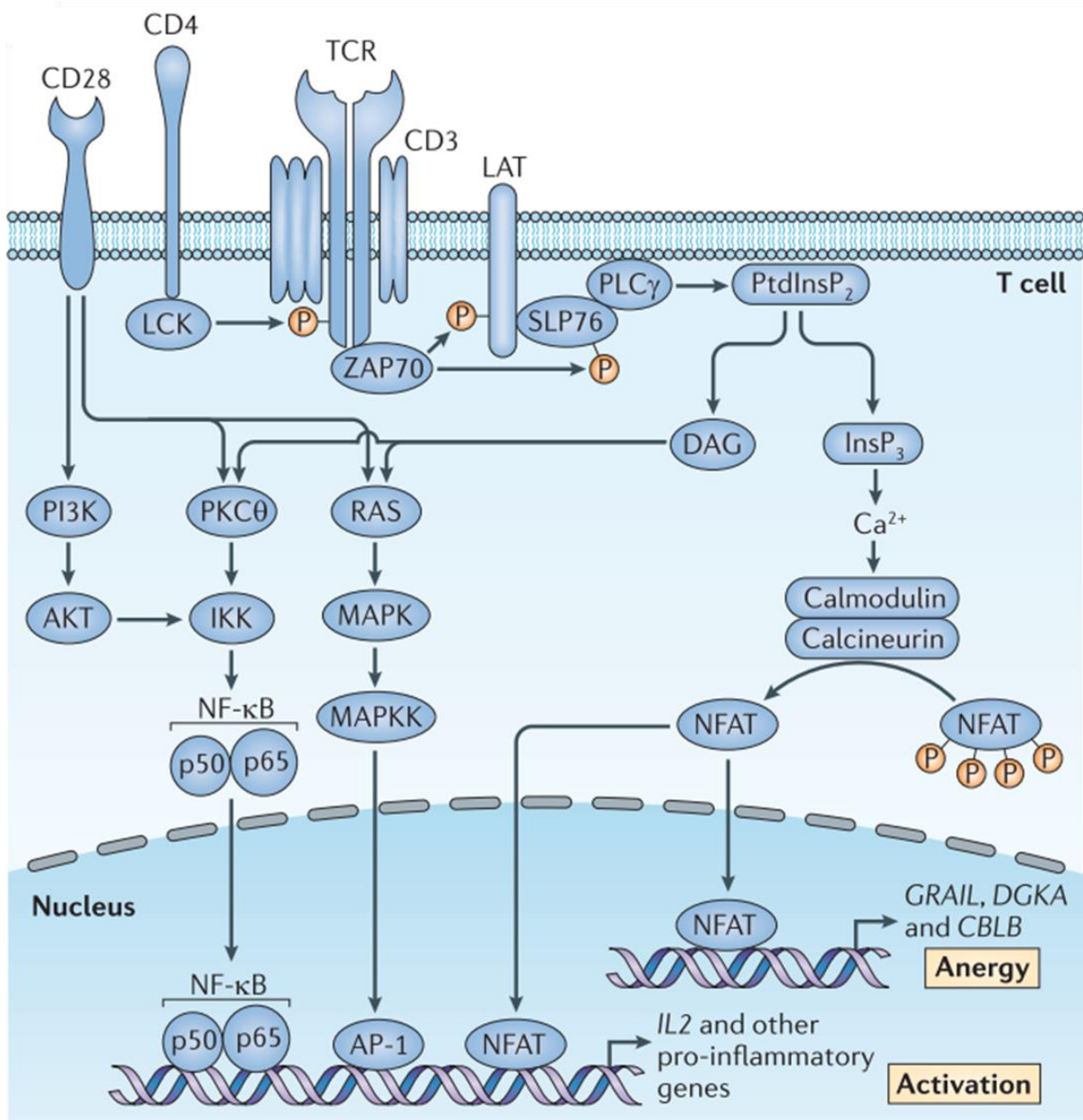


Figure 1 : voies de signalisations induites lors de l'activation des LT. D'après (Pollizzi & Powell, 2014). Sont représentées les principales voies de signalisation induites par l'activation des LT partant du TCR et de ses corécepteurs activant les voies de la PLC $\gamma$ 2, PI3K, PKC $\theta$  et MAPK aboutissant à l'activation des facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B, AP-1 et NFAT.

Le signal apporté par le TCR ainsi que celui de cytokines de l'environnement est nécessaire à l'acquisition des fonctions effectrices des LT naïfs lors de leur expansion clonale (Hwang et al., 2020). L'IL-2 et l'IL-12 sont nécessaires aux LT CD8 pour l'expression de Granzyme et de Perforine leur conférant leurs propriétés cytotoxiques (Curtsinger et al., 1999). Les LT CD4 pourront acquérir différents profils impliqués dans autant de types de réponses. Les Th1 sont induits par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et l'IL-12 et sont mobilisés dans la réponse contre les agents infectieux intracellulaires. Les Th2 sont induits par l'IL-4 et l'IL-2 et sont impliqués dans les réponses antiparasitaires et les processus allergiques. Les Th17 sont induits par le TGF-

$\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) et l'IL-6 et sont impliqués dans la réponse aux agents infectieux extracellulaires notamment bactériens et fongiques. Les LT régulateurs (Treg) sont induits en l'absence d'IL-6 par le TGF- $\beta$  et l'IL-2 et permettent notamment de réguler l'activation des autres cellules lymphocytaires (Zhu & Paul, 2010). Suite à leur expansion clonale les LT acquièrent des propriétés effectrices permettant la réponse contre leur antigène spécifique. Le processus de contraction clonal est alors favorisé par la disparition de l'antigène responsable de la réponse immune. Il entraîne la mort de la majorité des LT effecteurs par apoptose et la persistance de LT mémoires à long terme (Beverley, 2008).

#### ii. Processus inflammatoire médié par les LT

Suite à leur activation dans les OLI, la migration des LT effecteurs et mémoires se fait par l'expression de récepteurs tels que CXCR3 et CCR5 répondant aux chimiokines sécrétées au niveau des centres inflammatoires que constitue le greffon (Kim et al., 2008; Mackay & Rosen, 2000; Segerer et al., 2001). La reconnaissance de leur antigène spécifique présenté par les cellules du greffon associée à des corécepteurs permet l'activation des LT et l'acquisition de leurs mécanismes effecteurs incluant la cytotoxicité et la production de cytokines pro-inflammatoires (Cornell et al., 2008; Nankivell & Alexander, 2010). L'activation des LT CD8 entraîne la dégranulation de vésicules chargées en perforine, Granzyme A et B par exocytose, ainsi que la production de Fas ligand qui active le récepteur Fas à la surface des cellules cibles. Ces mécanismes entraînent l'apoptose et la mort des cellules du greffon (Halle et al., 2017). Les LT peuvent également produire localement du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) dont la liaison aux cellules tubulaires épithéliales du greffon exprimant le récepteur du TNF- $\alpha$  induit leur apoptose (Al-Lamki et al., 2001; Imagawa et al., 1991). Le rejet cellulaire a des manifestations vasculaires avec des infiltrats au niveau sub-endothéliale et dans l'intima de LT CD4, CD8 et de macrophages qui entraînent la lyse des cellules endothéliales (endartérite) (Cornell et al., 2008). Les LT allo-réactifs entraînent également la rupture de la membrane basale des cellules épithéliales tubulaires où ils s'accumulent et induisent une dédifférenciation des cellules épithéliales en myofibroblastes, favorisant une fibrose des tissus tubulaires (Nankivell & Alexander, 2010). Ces lésions se manifesteront à terme cliniquement par une dysfonction du greffon et une atrophie des tubules rénaux (Bonsib et al., 2000).



## d) Lymphocytes B

### i. Rôle des lymphocytes B dans la réponse allo-immune

Nous reviendrons en détail plus loin dans ce manuscrit sur l'ontologie et l'activation des LB (cf. chapitre II). Dans les follicules primaires des OLII, les LB peuvent reconnaître via leur récepteur (BCR) un allo-antigène spécifique et interagir avec un LT CD4 *follicular helper* (T<sub>FH</sub>) partageant cette spécificité. Ce double signal aboutira à la formation de follicules secondaires ou centres germinatifs dans lesquels les LB prolifèrent et se différencient en cellules productrices d'anticorps, plasmocytes et en LB mémoires. Une étude récente a permis de mettre en évidence un mode d'activation dit direct-inversé, faisant intervenir les LT CD4<sup>+</sup> du donneur dans la coactivation de LB allo-réactifs du receveur (Charmetant et al., 2022). Dans la réponse allo-immune et le processus de rejet, les LB sont responsables de la réponse humorale envers le greffon notamment via la production d'anticorps spécifiques du donneur (DSA : *donnor specific antibody*). Les anticorps allo-spécifiques participants au rejet humoral peuvent être de plusieurs natures et avoir diverses manifestations suivant leur moment d'apparition. Avant la greffe, des anticorps préformés peuvent se trouver dans le sérum du receveur. Ces anticorps sont principalement anti-HLA, possiblement anti-ABO ou dirigés contre des antigènes présentés par les cellules endothéliales du donneur tels que le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1R), l'endothéline de type A, ou des agglutinines froides (Dragun et al., 2016; Lefaucheur et al., 2019). Ces anticorps peuvent résulter d'un évènement immunisant tel qu'une grossesse, une transfusion sanguine ou des transplantations antérieures (Colvin & Smith, 2005; Cornell et al., 2008; Nankivell & Alexander, 2010). Des anticorps anti-HLA peuvent se former après la greffe, *de novo*, et être associés à un risque important de rejet notamment en cas de mauvaise observance du traitement IS (Aravind Cherukuri et al., 2019).

Il a été montré que les LB en tant que cellules APC exprimant le CMH II peuvent également participer à l'activation des LT CD4 dans de nombreuses pathologies (Rastogi et al., 2022). Cela a également été démontré en transplantation rénale dans des cas de rejets aigus n'impliquant pas la réponse humorale, où des infiltrats de LB dans les greffons présentaient un phénotype activé avec une forte expression de HLA-DR à proximité de LT CD4 (Tsai et al., 2006; Zarkhin et al., 2008).

## ii. Processus inflammatoire du rejet humoral

Les allo-antigènes sont exprimés par plusieurs types cellulaires dans le greffon notamment par les cellules endothéliales vasculaires à la surface desquelles les DSA viennent se fixer. Les anticorps induisent un effet toxique envers leur cellules cibles via plusieurs mécanismes, en premier lieu le complément (Colvin & Smith, 2005). Le système du complément appartient à l'immunité innée et peut être activé par plusieurs voies (classique, alternative, lectines) (Walport, 2001). Dans le cas d'un rejet humoral, les anticorps activent la voie classique du complément. Cette voie fait intervenir de nombreuses protéines activées et clivées en sous-produits intermédiaires de différents rôles. Elle passe par l'activation de C1, un hétérotrimère (C1q, C1r, C1s) qui permettra la formation de la C3 convertase (C4b2a), qui active C3 amenant à la formation du complexe d'attaque membranaire entraînant la lyse des cellules cibles. Cela aura pour conséquence le détachement des cellules endothéliales de la membrane basale, leur nécrose et le développement de thromboses (Colvin & Smith, 2005; Walport, 2001). Lors de cette cascade d'activation, le C4b peut être inactivé en CD4d. Par la formation de liaisons covalentes avec les cellules cibles, le C4d peut être retrouvé pendant plusieurs jours dans l'espace vasculaire du greffon, représentant ainsi un élément diagnostique du rejet humoral en transplantation rénale (Colvin & Smith, 2005; Feucht et al., 1993; C Legendre et al., 2023). Les protéines C5a et C3a produites en parallèle également sont des anaphylatoxines aux propriétés chimiotactiques qui entraînent le recrutement de polynucléaires neutrophiles, mastocytes et macrophages qui entretiennent la réaction inflammatoire induite par le complément. L'ensemble de ces acteurs peuvent générer un bouleversement de l'homéostasie des cellules endothéliales dont la production de cytokines et facteurs de croissances tels que le FGF (*fibroblast growth factor*) entraînent la prolifération des cellules endothéliales. Egaleme nt le facteur tissulaire qui favorise le développement de microangiopathie thrombotiques dans le greffon (Benzaquen et al., 1994; Colvin & Smith, 2005; Saadi et al., 1995). A l'instar du complément, les anticorps via leur fragment Fc peuvent également recruter des cellules cytotoxiques telles que les cellules NK (*natural killers*) et les macrophages qui reconnaissent l'anticorps via le FC $\gamma$ RIIA (CD16) entraînant un effet cytotoxique médié par les anticorps dit ADCC (*antibody mediated cytotoxicity*) (Gómez Román et al., 2014; Lamarthée et al., 2023; Legris et al., 2016).

### e) Considération du risque allo-immun

En transplantation rénale, plusieurs paramètres influent le risque de réponse allo-immune envers le greffon (Bestard et al., 2022). Contrairement aux donneurs à critère standard (âge <50ans), les donneurs à critères élargis (âge >50ans avec hypertension artérielle (HTA), créatininémie >133 $\mu$ mol/L, état de mort cérébrale) et les donneurs à cœur arrêté représentent un nombre croissant de donneurs. Ces donneurs possèdent des paramètres physiologiques défavorables qui altèrent la fonction du greffon et favorisent également son immunogénicité (Kim et al., 2008). Comme évoqué dans la partie précédente, l'immunogénicité du greffon est favorisée par les dommages liés à l'ischémie-reperfusion, augmentés chez les donneurs à cœurs arrêtés et par des périodes d'ischémie froide trop importantes (Todd & Palmer, 2017). Ces donneurs à haut risques sont associés à une survie réduite du greffon (Montero et al., 2021).

L'histocompatibilité (compatibilité entre les antigènes tissulaires) entre donneur et receveur est un paramètre qui favorise l'absence de réponse allo-immune. Elle est recherchée pour les antigènes du système ABO hautement immunogènes, impératif dans le cas d'un donneur à cœur arrêté (Anglicheau et al., 2019). La compatibilité des molécules du CMH est aussi de première importance. Plusieurs études ont montré que plus le taux de compatibilité entre les molécules du CMH diminue plus la durée de vie du greffon diminue également (Williams et al., 2016). La compatibilité du CMH peut désormais être déterminée de façon hautement résolutive à l'aide de plusieurs méthodes. Des méthodes de typage sérologiques qui utilisent des anticorps dirigés contre une multitude d'allotypes du CMH et des méthodes moléculaires réalisées par séquençage direct ou l'utilisation d'amorces ou de sondes spécifiques de séquences nucléotidiques (Althaf et al., 2017). Des méthodes bio-informatiques permettent également désormais de mesurer la compatibilité des molécules du CMH au niveau structurel et dans les interactions physico-chimiques des protéines. En considérant l'épitope et le paratope fonctionnel du CMH et de l'allo-anticorps qui lui est spécifique, on détermine entre donneur et receveur un taux d'épitopes non compatibles dit charge épitopique ou « *epitope load* » (Duquesnoy, 2006; Niemann et al., 2021; Snanoudj et al., 2019).

Le test du « cross-match » (XM) permet la détection chez le receveur avant la greffe d'anticorps allo-spécifiques du donneur. Ce test est réalisé *in vitro* par la mise en contact des LT et des LB du donneur et du sérum du receveur puis la mesure de la lyse des cellules en

présence de complément (CDC-XM) et/ou de la fixation d'anticorps à leur surface mesurée par cytométrie (FCXM) (Bhaskaran et al., 2022). Un CDC-XM positif envers les cellules T ou B représente une contre-indication absolue à la greffe (Bestard et al., 2022; Bhaskaran et al., 2022). Cependant un test de cross-match négatif n'exclut pas la présence d'anticorps allo-spécifiques pouvant être la cause de rejet.

Pour les patients en attente de greffe ainsi que post-greffe, la mesure régulière de la formation d'anticorps anti-HLA est nécessaire. Elle est réalisée par des tests mesurant la réactivité des anticorps du receveur envers un panel de molécules du CMH représentatif de la population de donneurs potentiels. Ces tests de criblage d'anticorps ont été réalisés traditionnellement par cytotoxicité à partir de cellules exprimant le CMH provenant de 30 à 40 donneurs potentiels. Il permet une approximation du risque de « cross-match » positif mesuré par le score PRA (*panel-reactive antibody*). Des tests plus modernes se font sur phase solide par ELISA ou via la plateforme Luminex® utilisant des billes SAB (*single-antigen beads*) portant les antigènes du CMH dits « non-acceptés » sélectionnés parmi la population générale. La spécificité des anticorps trouvée par ces tests permet de mesurer le PRA calculé (cPRA). Ce score permet de déduire la sensibilité d'un receveur potentiel envers la population générale et est utilisé dans l'allocation d'organes (Althaf et al., 2017; Bhaskaran et al., 2022). Dans le cas d'individus possédants des anticorps allo-spécifiques avec ou sans « cross-match » positif, une procédure de désensibilisation peut être effectuée (Stegall et al., 2006). Ces techniques ont permis la création du « cross-match » virtuel (VXM), une méthode *in silico* cumulant le typage du CMH des donneurs au criblage des anticorps du receveur. Elle permet un gain de temps important dans la prédiction des résultats de « cross-match » et dans l'allocation d'organes (Althaf et al., 2017; Bhaskaran et al., 2022). En parallèle des anticorps, une considération croissante dans la gestion du risque allo-immun est le criblage des LT et LB mémoires allo-réactifs. Leur criblage s'est montré efficace comme outil de prédiction de réponses allo-immunes médiées par les LT et LB. Cette méthode pourrait à terme être également effectué en clinique (Bestard et al., 2021; Luque et al., 2019).

## C. Prise en charge du risque immunologique

### 1) Les rejets

Il existe en transplantation rénale plusieurs types de rejets classés cliniquement selon leur temps de survenue après la greffe ainsi que selon le mode de réponse allo-immune : cellulaire (médiée par les LT) humorale (médiée par les anticorps), ou mixte mêlant ces deux modes (C Legendre et al., 2023). L'ensemble de ces critères a été décrit dans la première classification de Banff en 1993 qui est régulièrement mise à jour (Roufosse et al., 2018; Solez et al., 1993).

#### a) Le rejet hyper-aigu

Sa survenue a lieu dans les minutes voire les heures qui suivent la transplantation. Ce rejet est de nature humorale et est défini par la présence chez le receveur de DSA préformés entraînant une thrombose généralisée des artères du greffon et une anurie irréversible nécessitant le retrait de la greffe (transplantectomie) (C Legendre et al., 2023; Nankivell & Alexander, 2010). Ce type de rejet est devenu rare depuis l'instauration systématique du test de « cross-match » permettant la détection chez le receveur d'anticorps préformés susceptibles de générer un tel rejet (Patel & Terasaki, 1969). Il peut toutefois survenir en cas d'erreur de « cross-match », d'incompatibilité ABO accidentelle ou d'anticorps allo-réactifs non spécifiques du CMH (C Legendre et al., 2023).

#### b) Le rejet aigu

Il se caractérise par une insuffisance rénale aiguë survenant généralement dans les 3 premiers mois de la greffe. Une biopsie rénale est nécessaire pour le diagnostiquer et préciser sa nature. Le rejet aigu cellulaire se définit par des lésions de différents grades comprenant une inflammation de l'interstitium cortical non fibreux et des foyers de tubulite, d'artérite, jusqu'à une nécrose de la paroi artérielle. Le rejet aigu humoral se caractérise par la détection de DSA (anti-HLA ou non) et de lésions de différents types : artérite, microangiopathie thrombotique, nécrose tubulaire, et la preuve d'une interaction entre anticorps et endothélium comprenant un dépôt de C4d sur les capillaires paratubulaires, une inflammation microvasculaire et/ou l'expression de transcrits/marqueurs d'activation endothéliale (C Legendre et al., 2023). Un tableau clinique similaire au rejet aigu survenant plus de 3 mois après la greffe sera dit rejet aigu tardif. Il peut être causé par une modification de l'immunosuppression liée au développement de cancers ou d'infections ou d'une mauvaise observance du patient au

traitement IS et est associé à un mauvais pronostic du fait de sa détection souvent tardive (Eid et al., 2014; C Legendre et al., 2023; Nankivell & Alexander, 2010).

### c) Le rejet chronique

Il se manifeste cliniquement après le 3<sup>ème</sup> mois de transplantation par la dégradation progressive de la fonction rénale associée à l'apparition ou l'aggravation d'une HTA et d'une protéinurie. Comme dans le rejet aigu, la biopsie permet de préciser sa nature. Le rejet chronique actif humoral est défini de façon similaire au rejet aigu par la présence de DSA associée à une preuve d'interaction d'anticorps avec l'endothélium comprenant le dépôt de C4d sur les capillaires paratubulaires, une inflammation au niveau microvasculaire et l'expression de transcrits/marqueurs d'activation endothéliale et des lésions histologiques de type glomérulopathie, multilamellation de la membrane basale des capillaires péri-tubulaires et fibrose intimale artérielle récente. Le rejet chronique actif cellulaire, comme le rejet aigu, est classé en différents grades comprenant l'association d'une inflammation totale de l'interstitium cortical, d'une inflammation au niveau de zones de fibrose, d'atrophie tubulaire, de foyers de tubulites et des lésions vasculaires de type artérites dans les grades supérieurs (C Legendre et al., 2023).

### d) Rejets infracliniques

Lors de biopsies chez des receveurs présentant une fonction rénale normale, il est possible de constater des lésions caractéristiques de rejets humoraux et/ou cellulaires. Ces rejets ont été décrits comme rejets infracliniques et présentent le même tableau clinique que ceux cités précédemment à l'exception d'une fonction rénale normale (C Legendre et al., 2023; Rush & Gibson, 2019). La biopsie des tissus rénaux est nécessaire pour détecter ce type de rejet mais elle ne peut pas être pratiquée régulièrement, c'est pourquoi des méthodes non invasives sont développées pour détecter efficacement l'apparition ou l'absence de ces lésions par la mesure de biomarqueurs sanguin et urinaires (Crespo et al., 2017; Danger et al., 2023; Zhang et al., 2019).

## 2) L'immunosuppression

La considération des risques de réponse allo-immune par les cliniciens permet de minimiser le risque de rejet notamment par l'allocation d'organes entre individus les plus histocompatibles possibles. Cependant une histocompatibilité totale est rarement atteinte et des traitements IS ciblant les différentes étapes de la réponse allo-immune sont nécessaires

pour minimiser le risque de rejet. Ces traitements IS sont toutefois des traitements lourds utilisant des principes actifs aux fenêtres thérapeutiques étroites, de possibles interactions médicamenteuses et de nombreux effets indésirables. Le protocole d'immunosuppression varie dans les différents centres selon les pratiques et est adapté en fonction du risque de réponse-allo immune ainsi que des facteurs de comorbidité et des pathologies associées qui pourraient être aggravées par certains traitements IS (Anglicheau et al., 2019).

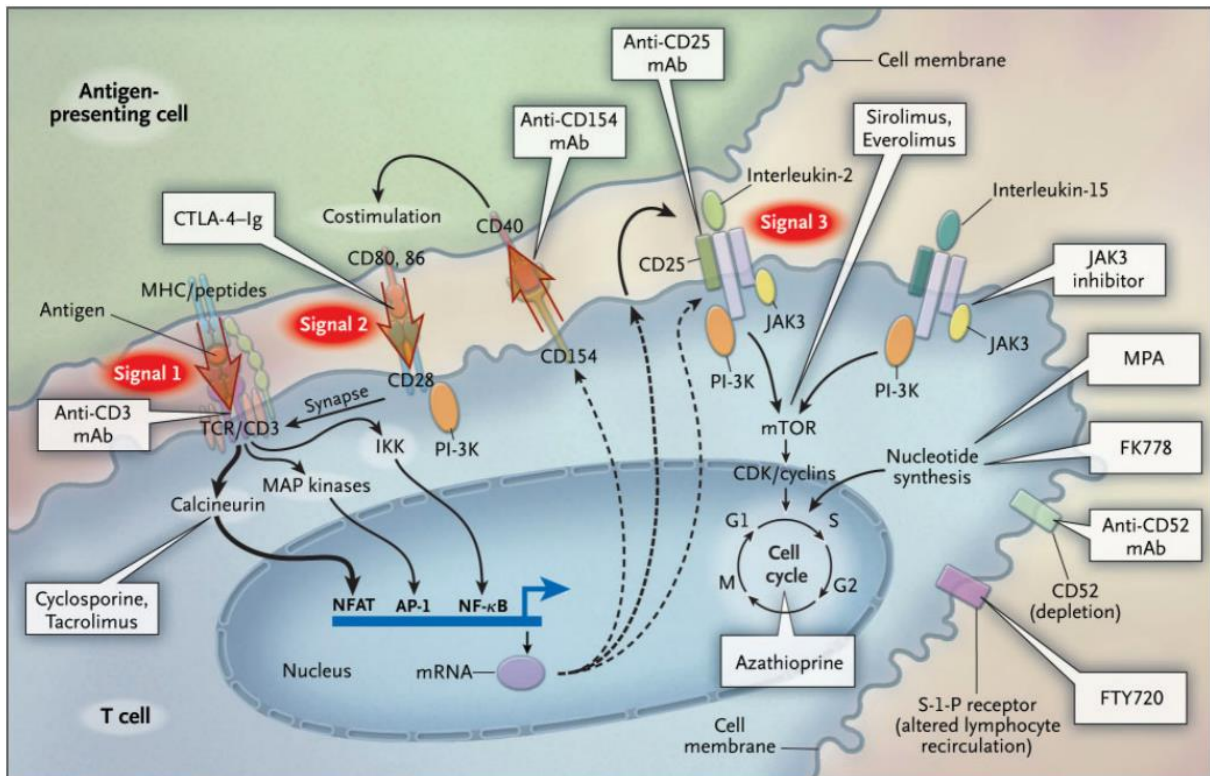


Figure 2 : cibles des différents types de traitements IS dans l'activation des LT. D'après (P. F. Halloran, 2004). Représentation des signaux induits lors de l'activation des LT par une cellule présentatrice d'antigène ainsi que de leur effet dans la cellule avec interaction de chacune des classes d'IS au niveau de ces voies.

### a) Traitement d'induction

Les traitements d'induction consistent en une forte immunosuppression par différents principes actifs durant 3 à 14 jours au début de la transplantation qui sera ensuite maintenue par d'autres agents thérapeutiques. Ces traitements d'induction ont permis de significativement réduire la survenue du rejet notamment chez les sujets à haut risque allo-immun (Bunnapradist & Takemoto, 2005; Cai & Terasaki, 2010; Laftavi et al., 2014).

Ces thérapies visent à éliminer les cellules responsables d'une éventuelle réponse allo-immune envers le greffon. L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le CD52, exprimé par plusieurs leucocytes principalement les LT et LB mais également

les cellules NK et monocytes. Une fois fixé, il induit une cytotoxicité via son fragment Fc et une déplétion durable des cellules cibles (Hanaway et al., 2011; Waldmann, 2002). Les globulines anti-thymocytes sont des anticorps polyclonaux issus de l'immunisation d'animaux, généralement de lapins, à l'aide de thymocytes humains. Elles seront dirigées contre une multitude d'antigènes thymiques induisant une déplétion durable des LT et des LB (Hardinger, 2006).

Le basiliximab est un anticorps monoclonal chimérique ciblant la sous unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (IL2RA ou CD25). Son mode d'action n'est pas déplétant mais permet d'inhiber la fixation de l'IL-2 à son récepteur et donc la prolifération des LT lors de la réponse allo-immune. Il est utilisé en thérapie d'induction en transplantation rénale pour les sujets présentant un faible risque allo-immun (Al Najjar et al., 2006; Nashan et al., 1997).

#### b) Traitement d'entretien

Le traitement d'entretien est appliqué dès le début de la transplantation et destiné à être maintenu sur toute la période de greffe, avec des adaptations et réductions de traitements quand celles-ci sont faisables ou nécessaires. Selon la pratique courante, il comporte un inhibiteur de la calcineurine, un agent antiprolifératif et des corticostéroïdes qui sont souvent arrêtés lors du suivi du patient (R. A. Lee & Gabardi, 2012).

##### i. Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI)

Cette classe de médicaments, avec la cyclosporine A et le tacrolimus, représente la clef de voûte des traitements IS de maintenance en transplantation rénale (Sayegh & Carpenter, 2004). La cyclosporine A est un peptide cyclique fongique de 11 acides aminés isolé à partir du *Tolypocladium inflatum* (Borel et al., 1976). Le tacrolimus est un antibiotique de la famille des macrolides isolé à partir de la bactérie *streptomyces tsukubaensis* (Kapturczak et al., 2004). Ces deux molécules se lient dans le cytoplasme à des protéines dites immunophilines, la cyclophiline dans le cas de la cyclosporine A et la protéine FKBP12 (*FK506-binding protein 12*) pour le tacrolimus. Ces complexes se fixent ensuite à la calcineurine, inhibant son activité de déphosphatase et la translocation du facteur de transcription NFAT dans le noyau, induisant l'expression de gènes impliqués dans l'activation des LT dans la réponse allo-immune (Bram et al., 1993). Les CNI sont responsables de nombreux effets indésirables dont la survenue paradoxale d'une néphrotoxicité (Wu et al., 2018). Une méta-analyse a montré que l'usage du tacrolimus par rapport à la cyclosporine A permet une meilleure survie du



greffon et une incidence réduite de rejet aigu (Webster et al., 2005). Bien que ces observations n'aient pas été retrouvées dans d'autres études (Woodward et al., 2005), l'usage a progressivement favorisé l'utilisation du tacrolimus pour les thérapies d'entretien (Hricik, 2015).

#### ii. Agents antiprolifératifs

L'azathioprine est l'un des premiers principes actifs IS utilisés. C'est un dérivé de l'imidazole dont l'activité dépend de sa métabolisation au niveau hépatique et cytoplasmique en plusieurs analogues de thiopurines (Anstey & Lear, 1998). Ces composés ont une activité myélosuppressive inhibant la prolifération des LT et des LB et le nombre de monocytes circulants par l'inhibition d'enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* d'acide nucléique (Aarbakke et al., 1997; R. A. Lee & Gabardi, 2012). L'azathioprine entraîne également l'apoptose spécifique des LT par blocage de l'activation de Rac 1 induite par le signal de co-stimulation du CD28 (Tiede et al., 2003). L'acide mycophénolique (MPA) est un dérivé actif des pro-drogues mycophénolate mofetil et mycophénolate sodium. Le MPA est un puissant inhibiteur spécifique et réversible de la inosine-5'-monophosphate déshydrogénase de type II, une enzyme clef dans la synthèse de l'ADN, nécessaire à la prolifération des LB et des LT activés. Le MPA régule également l'expression de protéines d'adhésion importantes pour le recrutement des lymphocytes et des monocytes au niveau des centres d'inflammation (Allison, 2005; Staats & Tett, 2014). Des études ont montré dans les années 90 que le MPA permettait de réduire l'incidence du rejet aigu par rapport à l'azathioprine, favorisant ainsi son utilisation (P. Halloran et al., 1997). Cependant, des études ultérieures n'ont pas montré de meilleurs résultats du MPA par rapport à l'azathioprine en terme de survie du greffon et du patient ni de l'incidence de cancers (Clayton et al., 2012; Schold & Kaplan, 2009).

#### iii. Corticostéroïdes

Les glucocorticoïdes font partie des premiers IS utilisés dans la prévention du rejet en greffe rénale avec la méthylprednisolone et le prednisone, les deux glucocorticoïdes les plus utilisés. Ils ont un effet IS mais également anti-inflammatoire et immunomodulateur. Après leur entrée dans la cellule, ils interagissent avec leur récepteur (GR) induisant son activation. Le GR a des effets dans le cytoplasme et dans le noyau où il interagit avec les éléments de réponse aux corticoïdes induisant la suppression ou l'expression de plusieurs gènes codants notamment de cytokines. Il inhibe également l'activité des facteurs de transcription AP-1 et

NF- $\kappa$ B au niveau nucléaire et cytoplasmique. L'ensemble de ces effets se traduit notamment par l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (ex : IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) et de la prolifération des LB et des LT par arrêt du cycle cellulaire et induction de l'apoptose (De Bosscher et al., 2003; Necela & Cidlowski, 2004). Leur utilisation à long terme s'accompagne d'effets indésirables nombreux incluant la survenue d'infections, HTA de problèmes métaboliques (hyperlipidémie, diabète) et endocriniens (Buchman, 2001). Certains centres effectuent un arrêt précoce des corticostéroïdes chez les receveurs à faible risque immunologique sur la base d'études montrant chez eux une réduction des effets indésirables sans risque accru de rejet (Thomusch et al., 2016).

#### iv. Inhibiteurs de mTORC

Le sirolimus est un antibiotique de la famille des macrolides issu de la bactérie *streptomyces hygroscopicus* et l'everolimus, un analogue semi-synthétique du sirolimus (Schuler et al., 1997). Ces deux molécules, comme le tacrolimus, forment un complexe avec la FKBP12 qui interagit et inhibe les complexes mTORC1 et mTORC2 impliqués dans la croissance cellulaire et la prolifération et dans la survie cellulaire, permettant d'inhiber l'expansion clonale des LT activés (Fantus et al., 2016; Pollizzi & Powell, 2015). L'utilisation de ces deux molécules est envisagée comme remplacement des CNI en cas de forte toxicité rénale. Ces deux molécules permettent un effet bénéfique sur la survenue de cancers et d'infections au cytomegalovirus et virus BK (Pascual et al., 2017). Toutefois, des études comparant les 2 types de traitements ont montré une augmentation de la protéinurie et une incidence accrue du rejet aigu avec les inhibiteurs de mTOR par rapport aux CNI (Ekberg et al., 2007; Flechner et al., 2011; Holdaas et al., 2011; Rostaing et al., 2015).

#### v. Inhibiteurs de co-stimulation

Le belatacept (LEA29Y) est une protéine de fusion reliant le fragment Fc d'une immunoglobuline (Ig) de type G1 à la protéine CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ou CD152. La molécule CTLA4 est exprimée par les LT et agit dans la synapse immunologique en interagissant avec le CD80 et CD86 des APC pour diminuer l'activation des LT, induite par l'interaction du CD28 avec CD80/86. Le belatacept a également été envisagé comme alternative aux CNI pour minimiser leurs effets indésirables. Des études ont montré à 1 an et à 3 ans post-transplantation une meilleure gestion des risques cardiovasculaire et métabolique par le belatacept associé à une meilleure fonction rénale qu'avec les CNI

(Charpentier et al., 2013; Rostaing et al., 2013; Vanrenterghem et al., 2011). D'autres études ont toutefois permis de montrer que l'usage du belatacept par rapport aux CNI entraînait un risque accru de rejet aigu, de survenue d'infections virales et de syndromes lymphoprolifératifs (Lombardi & François, 2022).

### c) Traitement du rejet

Les traitements d'induction et de maintenance ne permettent pas systématiquement la prévention des rejets qui sont également favorisés par le manque d'observance à leur traitement des patients. En parallèle d'une adaptation des thérapies de maintenance, le rejet cellulaire est traité par l'injection (IV) de méthylprednisolone (250-500mg) pendant 3 à 5 jours. Suivant le type de lésions, une thérapie déplétante des LT est instaurée, le plus couramment par 5 à 7 doses de globulines anti-thymocytes en IV (1-1,5mg/kg) (Cooper, 2020; Kung et al., 2021; Noguchi et al., 2020). Le traitement du rejet humoral vise à neutraliser les anticorps allo-spécifiques par des échanges plasmatiques ou plasmaphérèse permettant l'élimination des DSA du sérum du patient. Egalement par l'injection IV d'immunoglobulines aux propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices agissant sur plusieurs aspects de la réponse immune innée et adaptative (Jordan et al., 2009). Le traitement comprend également l'injection de rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 permettant la déplétion des LB du patient (Cooper, 2020). D'autres thérapies peuvent parfois y être associées visant la signalisation de l'IL-6 (ex : tocilizumab) importante dans la génération des plasmocytes (Jordan et al., 2020), ou visant le système du complément (ex : eculizumab) (Böhmig et al., 2018).

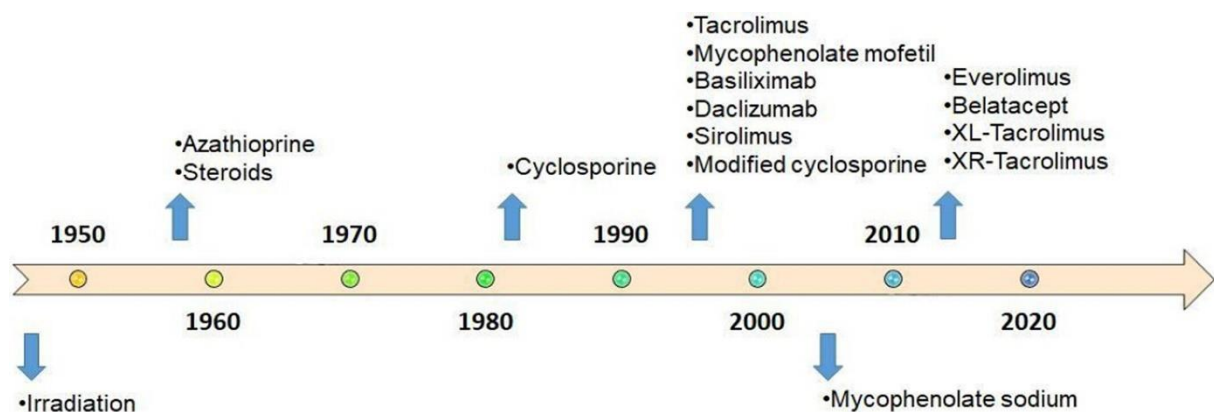


Figure 3 : frise chronologique d'apparition des traitements IS utilisés en transplantation rénale. D'après (Nelson et al., 2022).

### 3) Les limites de la prise en charge du risque immunologique

#### a) Stagnation de l'amélioration de la survie des greffons

L'arrivée dans les années 90 (figure 3) des principes actifs IS utilisés dans la prise en charge moderne du risque immunologique en transplantation rénale a permis de réduire considérablement la survenue de rejets aigus chez les patients transplantés. En France, sur les périodes de 1985-1989, 1990-1994, 1995-1999, 2000-2004 et 2005-2009, la survie des greffons à 1 an était de 82,7%, 85,9%, 90,1%, 92,0% et 92,5% et à 5 ans de 66,4%, 73,5%, 79,8%, 80,7% et 78,5%. Ces chiffres reflètent une très bonne survie à court terme, toutefois sur la période de 1993-2016 la survie à 10 ans était de 76,3% dans le cas de donneurs vivants contre 61,4% dans le cas de donneurs décédés (Rapports d'activité de l'Agence de la biomédecine). Une étude de la survie des greffons en Europe a également permis de mettre en évidence pendant la période de 2000 à 2015 une diminution des améliorations de la survie du greffon à 1 an et une stagnation de leur survie à 5 ans par rapport aux périodes précédentes. Cet état de fait reflète un besoin d'innovation dans la prise en charge des patients transplantés, notamment pour la survie du greffon à long terme (figure 4) (Coemans et al., 2018).

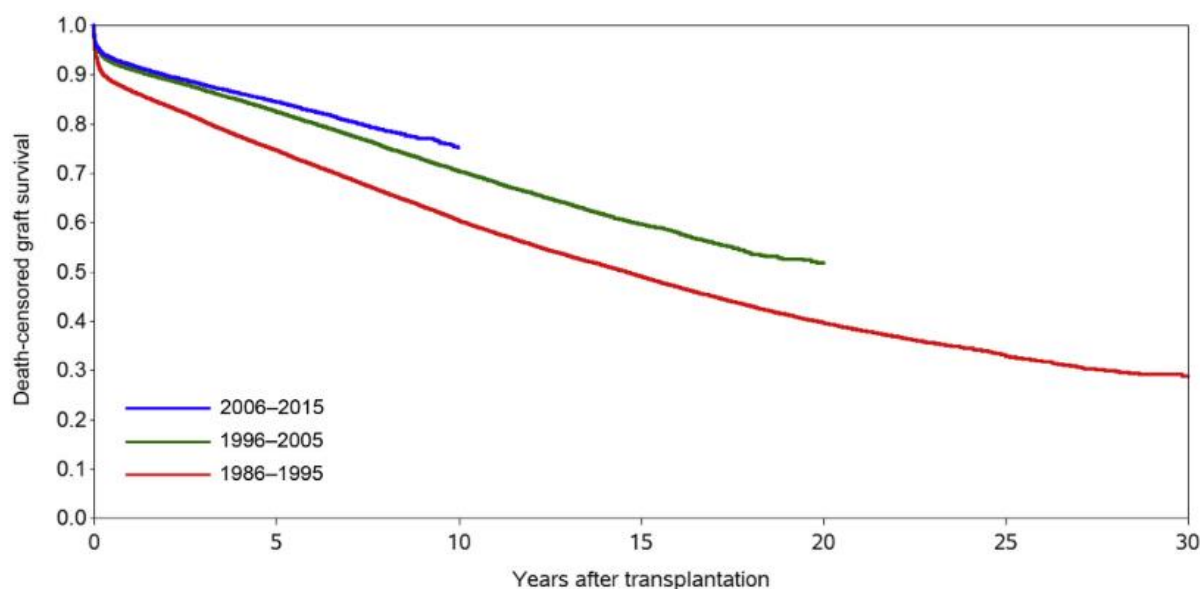


Figure 4 : courbe de survie des greffons par décennie en années de transplantation. D'après (Coemans et al., 2018). L'axe des ordonnées représente la survie (%) des greffons ne prenant pas en compte les morts avec greffon fonctionnel et des abscisses le nombre d'années de transplantation.

#### b) Effets indésirables des traitements IS

Ces traitements IS ont permis d'améliorer la survie des greffons mais sont également la source de nombreux effets indésirables pour les patients transplantés, pouvant altérer la survie du

greffon et du patient (tableau 1) (Katabathina et al., 2016). Les plus importants étant une néphrotoxicité aiguë et chronique notamment induite par les CNI (Wu et al., 2018), des troubles cardiovasculaires et métaboliques (Chevallier et al., 2021; Podestà et al., 2022), la survenue d'infections et l'apparition de cancers (Cippà et al., 2015; Dantal & Souillou, 2005; Wimmer et al., 2007).

Tableau 1 : adapté de (Katabathina et al., 2016)

<b>Principaux effets indésirables liés aux thérapies IS</b>	
<b>Néphrotoxicité</b>	
<b>Troubles cardiovasculaires et métaboliques</b>	Hypertension, hyperlipidémie, diabète
<b>Infections</b>	Virale: cytomegalovirus, herpes simplex, varicelle-zona, Epstein-Barr Fongique: candidose, aspergillose, mucormycose Bactérienne: nocardiose, légionellose, mycobactéries Parasitaire: toxoplasmose, strongyloïdose
<b>Cancer</b>	Rénal, hépatique, cutané, pulmonaire, syndrome lymphoprolifératif

### c) Minimisation/arrêt des traitements IS

Dans le but de préserver la fonction du greffon et la santé du receveur, de nombreux essais ont été faits pour réduire l'utilisation des IS. Ces réductions ont principalement porté sur les CNI et les corticostéroïdes. L'arrêt précoce des corticostéroïdes 1 semaine après la greffe, associé à une thérapie d'induction chez les sujets qui présentent un faible risque immunitaire a donné des résultats positifs sur l'incidence des effets indésirables notamment liés au diabète (Brar & Nader, 2014; Thomusch et al., 2016). Aujourd'hui, près de 30% des patients transplantés rénaux ne reçoivent pas de corticostéroïdes (Hart et al., 2019; Wojciechowski & Wiseman, 2021).

Certaines études ont visé à remplacer dès le départ ou convertir l'usage des CNI par d'autres agents thérapeutiques tels que les inhibiteurs de mTORC et le belatacept. toutefois leurs résultats ne permettent pas de dégager un consensus quant à leur supériorité par rapport aux CNI en terme de survie du greffon ou de tolérabilité (Ekberg et al., 2007; Flechner et al., 2011; Holdaas et al., 2011; Lombardi & François, 2022; Rostaing et al., 2015). D'autres études ont

évalué les conséquences de réduction du dosage des CNI progressivement ou en fonction de la survenue d'effets indésirables et ont montré que l'exposition précoce (<6 mois) à des doses réduites de CNI permettait une amélioration de la fonction rénale et un risque réduit de perte du greffon (Cockfield et al., 2019; Sawinski et al., 2016). Cependant les essais cliniques avec un arrêt des CNI ont permis de montrer une augmentation de la survenue de rejets aigus et du développement *de novo* de DSA, nécessitant la reprise des CNI (E. Dugast et al., 2016; Hricik et al., 2015; Masset et al., 2022; Sawinski et al., 2016), bien que dans certains cas une amélioration de la fonction rénale a pu être observée (Sawinski et al., 2016). Ainsi, en absence de marqueurs biologiques fiables qui permettraient de sélectionner les patients à faible risque de rejet, il semble à l'heure actuelle que l'utilisation des CNI reste incontournable pour la gestion du risque immunologique en transplantation rénale. Seule la minimisation des CNI apporte des résultats dans la prévention simultanée de la dégradation de la fonction rénale et de la survenue de rejets.

## D. Tolérance

Dans ce contexte, la tolérance immunitaire du greffon, qui se définit par l'absence à long terme de réponse destructrice du système immunitaire du receveur envers l'allogreffe sans le recours de thérapie IS, représente un scénario idéal. Depuis la description par Billingham *et al.* de l'induction de tolérance dans un modèle murin de greffe de peau, de nombreuses recherches ont essayé de développer des méthodes pour induire cet état de tolérance (Billingham et al., 1953).

Le chimérisme consiste de façon concomitante à la transplantation chez le receveur de l'organe et la greffe de cellules souches hématopoïétiques du donneur. Cette stratégie, en greffant le système immunitaire du donneur, a pour but d'utiliser le processus de tolérance envers nos propres molécules du CMH (le « soi ») dans l'éducation thymique des LT pour empêcher qu'ils ne réagissent à ce même CMH présent sur les cellules du greffon (Pilat & Wekerle, 2010). Certains essais récents ont permis l'arrêt des traitements IS et l'absence de rejet chez des receveurs HLA incompatibles (K. W. Lee et al., 2020). Cette méthode est cependant très lourde pour les patients nécessitant une myéloablation et le risque de réponse de la greffe contre son hôte (GVHD : *graft versus host disease*) (Leventhal & Ildstad, 2018; Pilat & Wekerle, 2010), même si des améliorations récentes des protocoles minimisent ce risque (Krieger et al., 2023).

Parallèlement à la réponse allo-immune, certaines cellules, LT, LB, cellules dendritiques et macrophages ont un phénotype dit régulateur et contrôlent la réponse allo-immune par la production de cytokines ou de protéines anti-inflammatoires ou immunomodulatrices (Wood et al., 2012). Ces dernières années, un intérêt particulier a été apporté à l'utilisation des Treg comme thérapie cellulaire dans plusieurs pathologies auto-immunes et en transplantation. Dans le but d'induire une tolérance dans le cadre de transplantation de cellules souches, ou d'organe avec la transplantation hépatique ou rénale, plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer la sécurité et l'efficacité de Treg autologues polyclonaux ou donneur-spécifiques (Dudreuilh et al., 2023; Que & Li, 2021; Sawitzki et al., 2020), tout comme l'utilisation de cellules dendritiques tolérogéniques (Moreau et al., 2023).

De façon surprenante, on recense dans la littérature l'existence de patients transplantés rénaux désignés comme tolérants opérationnels, c'est-à-dire présentant une fonction stable de leur greffon malgré l'arrêt de tout traitement immunosuppresseur pendant plus d'un an et ne présentant pas déficits immunitaires (S. Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016; Roussey-Kesler et al., 2006). Chez ces patients, l'arrêt des thérapies IS peut être spontané par manque d'observance ou résulter d'une décision médicale notamment dans le cas du développement d'un syndrome lymphoprolifératif (S. Brouard et al., 2012). En transplantation hépatique, plusieurs essais cliniques ont montré qu'il était possible d'arrêter l'IS avec un taux de succès d'arrêt des thérapies IS de 20 à 40% chez des patients sélectionnés avec un faible risque de rejet (Benítez et al., 2013; Branco et al., 2018; Clavien et al., 2017). En transplantation rénale, cet état de tolérance est très minoritaire avec une incidence estimée en Europe de 0,03% (Massart et al., 2016). Cependant cette estimation peut être sous-estimée de part une mauvaise estimation du nombre de patients non-observants aux traitements IS. Par ailleurs, les mécanismes associés à la tolérance opérationnelle rénale et hépatique semblent différents, faisant intervenir des mécanismes immunologiques distincts (Lozano et al., 2011). Malgré leur état de tolérance, ces patients demeurent immunocompétents et non sujets aux infections opportunistes (Ballet et al., 2006; S. Brouard et al., 2012).

Les patients présentant une tolérance opérationnelle ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières décennies dans le but de comprendre les mécanismes immunobiologiques liés à cette tolérance. En transplantation rénale, en absence d'accès à la biopsie, ces recherches se sont concentrées dans le compartiment sanguin des patients

tolérants. L'identification de biomarqueurs sanguins spécifiques de la tolérance permettrait d'identifier de potentielles patients susceptibles de bénéficier d'une minimisation potentiellement plus sûre de leur traitement IS, ou d'identifier des cibles pharmacologiques pour la mise en place de thérapies d'induction de tolérance (Baron et al., 2015; Danger et al., 2017).

Plusieurs études ont montrées chez les patients tolérants une augmentation de la fréquence des cellules Treg CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> aux propriétés immunosuppressives (Braudeau et al., 2007; Braza et al., 2015; Durand et al., 2018), et une diminution des cellules Tfh PD-1<sup>high</sup> CCR7<sup>low</sup> (Chenouard et al., 2017). Une autre étude a montré que les cellules NK des patients tolérants présentaient une expression réduite de CD16 et de GZMA dans la sous-population de NK CD56<sup>dim</sup> associée à une altération de leur propriétés fonctionnelles *in vitro* (Dugast et al., 2017). Également, plusieurs études ont montré une activation altérée de la signalisation STAT6 associée à une expression réduite des ARN messagers (ARNm) de Myd88, TLR4, TLR5 et SLC8A1 dans les cellules monocytaires des patients (Braudeau et al., 2008; Moraes-Vieira et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Ces études témoignent donc d'un profil immun particulier, en faveur d'un contrôle de la réponse immune. Le compartiment des lymphocytes B a particulièrement été étudié et est celui qui a été décrit comme présentant le plus de particularités associées au phénotype de la tolérance opérationnelle (M. Chesneau et al., 2014; K. A. Newell et al., 2015; Kenneth A. Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Silva et al., 2012). Avant de décrire ces altérations, une description de l'ontologie et du développement des LB est nécessaire.

## II. Les lymphocytes B

### A. BCR et anticorps

#### 1) Structure

Dans un contexte physiologique, les lymphocytes B représentent 5 à 15% des lymphocytes sanguins circulants. La réponse immune adaptative repose sur la reconnaissance spécifique d'un antigène permise par le TCR et le BCR à la surface des LT et des LB, respectivement. Le BCR est une immunoglobuline, ou un anticorps de surface qui porte la spécificité clonale du LB pour un antigène défini et permet son activation. La conformation des anticorps varie selon leur isotype et sous-classe. Classiquement en prenant l'exemple d'une IgG1, l'anticorps est défini comme une protéine polypeptidique d'environ 150kDa composée de deux chaînes



lourdes (H = *Heavy* ~50KDa) contenant 3 domaines constants (CH1, CH2, CH3) et un domaine variable (VH) ainsi que de deux chaînes légères (L = *Light* ~25KDa) avec un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL) formant ainsi 4 chaînes maintenues entre elles par des liaisons covalentes (ponts disulfures) verticalement symétriques (figure 5) (George, 2000).

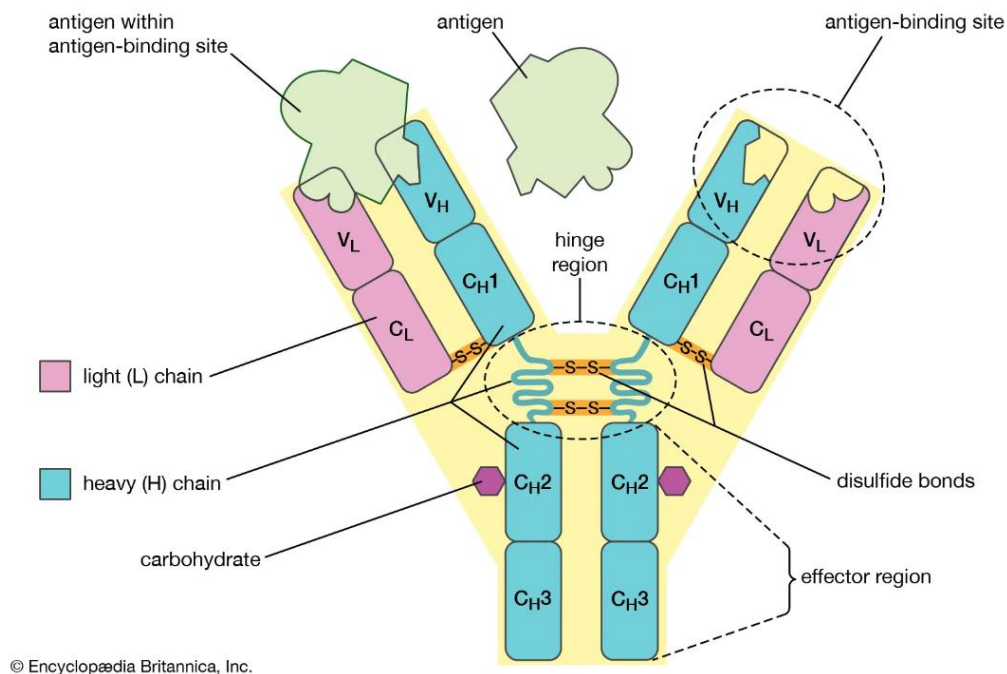


Figure 5 : Structure d'un anticorps. D'après encyclopædia Britannica, Inc. Les chaînes lourdes (H) sont représentées en bleu et les légères (L) en rose. Domaines variables : V, constants : C.

La spécificité pour l'antigène est apportée par les domaines variables CL et VL avec une séquence en acides aminés comprenant des parties charnières conservées dites « *framework* » et 3 trois parties variables nommées CDRs pour « *complementarity-determining regions* » qui après repliement de la protéine formeront une structure en 3 dimensions unique appelée paratope et capable de fixer spécifiquement son épitope complémentaire sur un antigène. Le fragment d'anticorps composé des domaines CL, VL, VH et CH1 est appelé Fab (*Fragment antigen binding*) et est capable de lier l'antigène. Les domaines CH3 et CH2 des chaînes lourdes constituent la fraction cristallisable (Fc) de l'anticorps. Le Fc contient des régions capables de fixer et d'activer différents effecteurs du système immunitaire (ex : complément, FcγR) et ainsi l'induction d'une réponse immunitaire dépendante des anticorps et du complément. Il permet également d'interagir avec le FcRn permettant un recyclage de l'anticorps et sa persistance dans l'organisme (George, 2000). Suivant le stade de maturation du LB, le BCR et les anticorps produits seront de différents isotypes et sous-classes dépendants de la nature de leurs chaînes lourdes : IgD ou δ, IgM ou μ, IgE ou ε, IgA ou α (sous-classes : IgA1, IgA2) et IgG ou γ (IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4). Les chaînes légères sont soit  $\kappa$  (kappa) soit  $\lambda$  (lambda) (George, 2000). En transplantation rénale, les sous-classes des Ig sont associées à des rejets humoraux différents, possiblement par leurs capacités variables de liaison au complément et de recrutement des cellules effectrices (Lefaucheur et al., 2016).

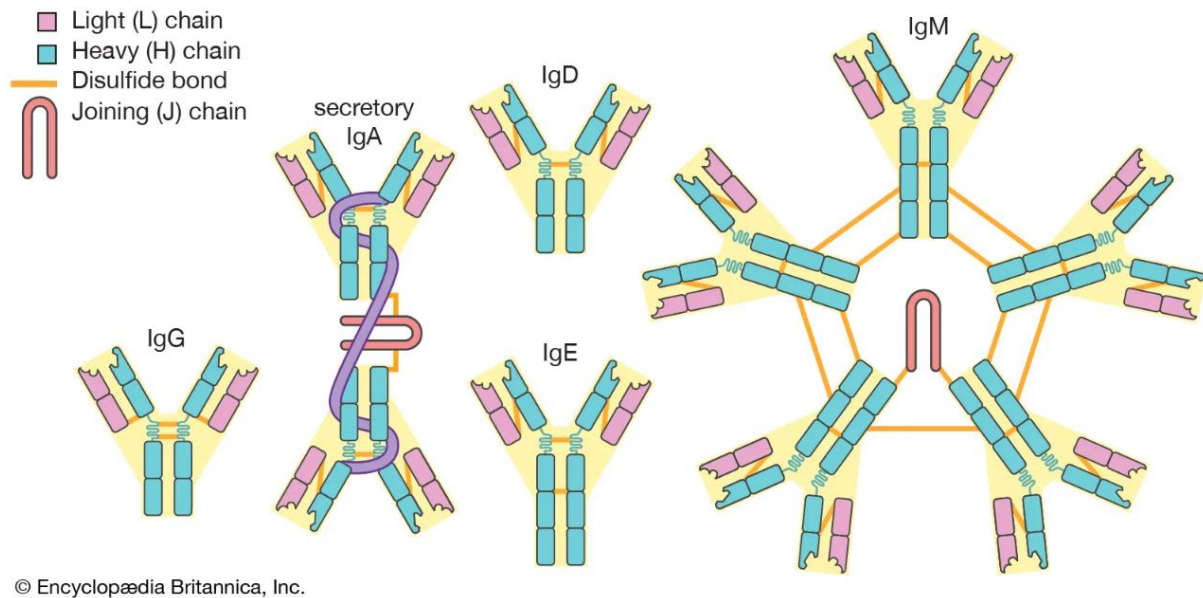


Figure 6 : Les différents isotypes d'anticorps. D'après encyclopedia Britannica, Inc.

## 2) Génération du BCR

Concernant la spécificité des BCR aux antigènes portés par leur domaines variables, nous sommes génétiquement capables de produire une diversité du BCR de l'ordre de  $10^{18}$  permettant de reconnaître autant d'antigènes (Elhanati et al., 2015). Cette diversité du BCR résulte de la recombinaison somatique de segments de gènes codants pour les chaînes lourdes et légères qui le constituent. Pour les chaînes lourdes, le chromosome 14 comprend l'ensemble des exons codants pour les régions constantes des différentes classes d'Ig  $C\delta$ ,  $\mu$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ , qui s'associent avec une partie variable issue de la recombinaison aléatoire d'exons de 3 familles de gènes dits de variabilité ( $V_H$ ), de diversité ( $D_H$ ) et de jonction ( $J_H$ ) comprenant chacun plusieurs loci. Les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  sont codées par des gènes situés sur le chromosome 2 et 22 respectivement, avec un exon constant ( $C_{\kappa}$ ,  $\lambda$ ) qui s'associe avec la partie variable issue de la recombinaison d'exons  $V_{\kappa}$ ,  $V_{\lambda}$  et  $J_{\kappa}$ ,  $J_{\lambda}$  (figure 7). La recombinaison somatique des segments V(D)J codants pour la partie variable des Ig est permise par un complexe enzymatique de 2 recombinases exprimées uniquement par les lymphocytes : RAG1

et RAG2 qui induisent la coupure entre chaque exon au niveau de séquences complémentaires de signal de recombinaison (RSS) permettant leur recombinaison ultérieure (figure 7) (Janeway et al., 2001; Schatz & Swanson, 2011).

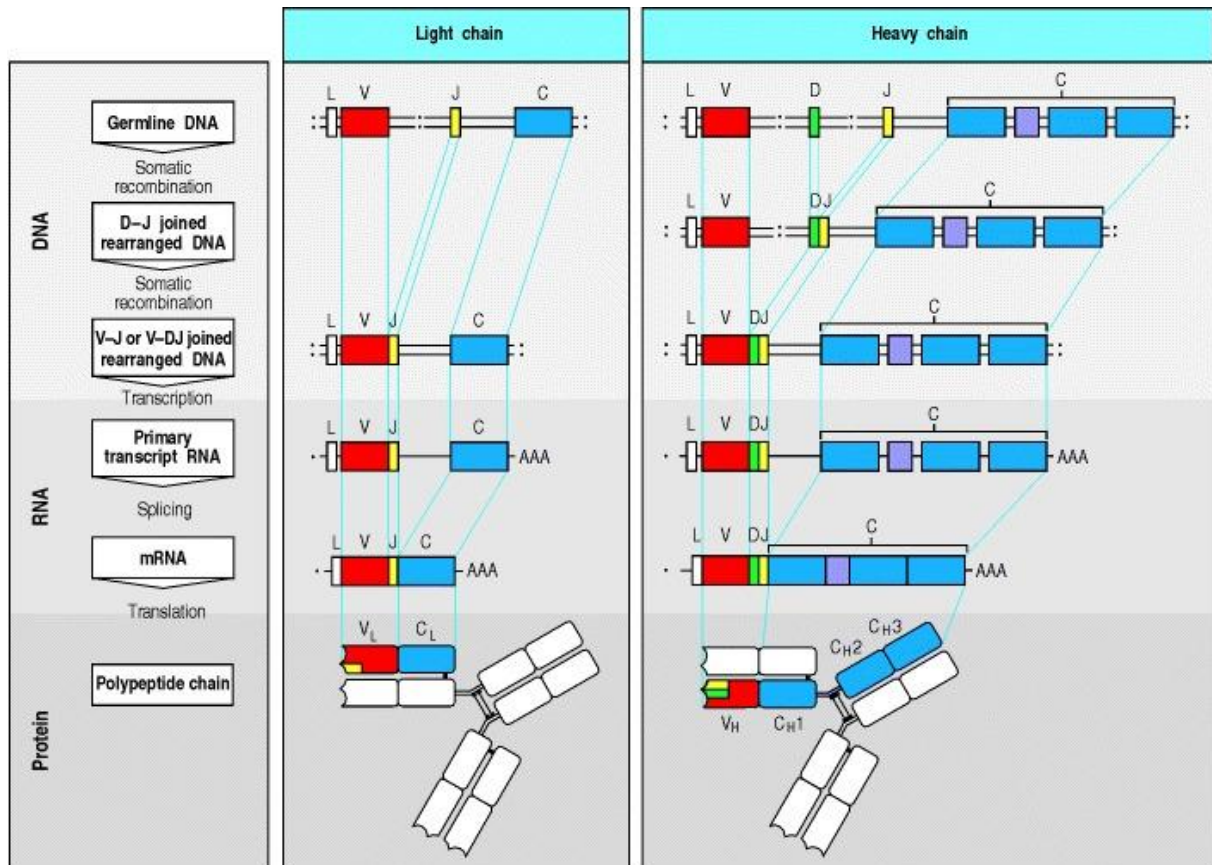


Figure 7 : Recombinaison des segments de gènes V(D)J et C permettant la génération d'une Ig. D'après (Janeway et al., 2001). Les segments de variabilité sont représentés en rouge, de diversité en vert, de jonction en jaune et constant en bleu. A gauche figure les différentes étapes de recombinaisons génétiques des segments codant les Ig jusqu'à leur expression en protéine.

### 3) Signalisation du BCR

La signalisation du BCR basale ou induite par un antigène constitue un signal central dans la biologie des LB ou signalosome régissant plusieurs voies de signalisations et facteurs de transcriptions similaires à la signalisation lors de l'activation des LT. La signalisation du BCR au niveau transmembranaire est permise par sa liaison aux corécepteurs CD79A et CD79B dont les motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) seront phosphorylés par les kinases SRC membranaires telles que Lyn qui active la signalisation du corécepteur CD19 dont découle l'activation de la voie PI3K-Akt sur laquelle nous reviendrons plus en détail dans la suite de ce travail (Saijo et al., 2003). Le CD79 active la kinase Syk permettant le recrutement et la formation des complexes de BLNK (*B-cell linker protein*) et BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) dont découlent l'activation de la PLC $\gamma$ 2 et la formation des seconds messagers DAG et IP3.

L'IP3 entraîne l'influx de calcium dans la cellule permettant l'activation de la calcineurine entraînant la translocation de NFAT dans le noyau (Ishiai et al., 1999; Winslow et al., 2006). Le DAG active la protéine kinase C  $\beta$  qui induit l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B par la formation du complexe entre les protéines CARMA1, BCL10 et MALT1. Ce complexe active le complexe de kinases IKK induisant la phosphorylation d'I $\kappa$ B, permettant le passage de NF- $\kappa$ B dans le noyau (Shinohara et al., 2007). Le DAG induit également l'activation de Ras dont découle l'activation de la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein*) et la translocation de ERK dans le noyau, responsable de l'activation de plusieurs facteurs de transcription notamment du complexe AP-1 et Ets (Hollenhorst, 2012).

## B. Ontogénèse lymphocytaire B

### 1) Progéniteurs et précurseurs des cellules B

Les LB sont issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse (MO) dans laquelle ils subissent plusieurs stades d'évolution avant de passer dans la circulation périphérique. La signalisation dépendante du récepteur FLT3 exprimé par les CSH permet leur différenciation en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) (Harly et al., 2018). La maturation des PLC en LB dépend du microenvironnement de la MO notamment de la production de cytokines spécifiques par les cellules stromales. La chimiokine CXCL12 permet la formation de niches de différenciation de CSH et de PLC. La signalisation induite par l'IL-7 entraîne des signaux de survie et de prolifération pour les précurseurs de LB (Tokoyoda et al., 2004).

Les stades de maturations des LB sont pre-pro-B (précurseur – progéniteur), pro-B, pre-B, B immatures et B matures. Le stade pre-pro-B se caractérise par l'expression des facteurs de transcription EBF1 et E2A qui induisent l'expression de RAG1 et RAG2 et une première recombinaison  $\mu$  D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>. Ils permettront également l'expression de gènes participants à la co-signalisation du BCR notamment *CD79A*, *CD79B* et *CD19* ainsi que du facteur de transcription *PAX5* (Boller & Grosschedl, 2014). La recombinaison viable d'un segment  $\mu$  D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> désigne le passage au stade pro-B pendant lequel EBF1 E2A et PAX5 bloquent l'expression de gènes impliqués dans d'autres lignées cellulaires. Ces protéines favorisent la recombinaison des segments  $\mu$  V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub> ainsi que l'expression des protéines Vpre-B et  $\lambda$ 5 (Boller & Grosschedl, 2014; Medvedovic et al., 2011). Cette chaîne lourde de type  $\mu$  s'associe à Vpre-B et  $\lambda$ 5 faisant office de substitut de chaîne légère. Tous les 3 sont exprimés à la surface de la cellule en association avec CD79A et CD79B formant ainsi un pre-BCR correspondant au stade pre-B

(Bankovich et al., 2007). Si le pre-BCR exprimé est viable, sa signalisation induit une prolifération de la cellule avec une inhibition de l'expression de RAG1/2 et de l'accès aux allèles codants les chaînes lourdes stoppant ainsi leur recombinaison, un phénomène dit d'exclusion allélique (Galler et al., 2004). Les cellules issues de cette prolifération perdent l'expression de Vpre-B et  $\lambda 5$  et expriment à nouveau RAG1/2 permettant la recombinaison des segments de chaînes légères commençants par les gènes  $\kappa$  puis des gènes  $\lambda$  si la recombinaison des premiers est infructueuse, aboutissant à la formation d'une IgM et d'un BCR complet exprimé à la surface des LB dits immatures (Melchers et al., 2007).

## 2) Tolérance centrale

Au cours de la genèse des LB, plusieurs mécanismes de contrôle dépendants de la fonctionnalité du BCR vont permettre l'élimination des LB ayant une réactivité contre les antigènes du soi. Avant de quitter la MO, les LB immatures sont testés sur leur auto-réactivité grâce aux autoantigènes présents dans l'environnement de différenciation. A ce stade les segments de gènes des chaînes légères restent ouverts et l'expression de RAG1/2 continue de façon à ce que les BCR auto-réactifs subissent un réarrangement et puissent perdre leur auto-réactivité (Tiegs et al., 1993). Dans le cas où l'édition du BCR ne permet pas la génération d'un BCR viable non reconnu comme auto-réactif, la cellule entrera en apoptose, un phénomène dit de sélection négative ou délétion clonale (Nemazee, 2006). On estime que 50 à 70% des LB immatures produits sont auto-réactifs, soulignant le bénéfice du mécanisme de tolérance centrale. Cependant ce processus ne permet pas une élimination totale des LB auto-réactifs (Cashman et al., 2019; Goodnow et al., 1989). Les cellules ne reconnaissant pas d'auto-antigènes perdent l'expression de RAG1/2 et l'accès aux gènes de chaînes légères sous l'effet possible d'un signal basal du BCR (Bannish et al., 2001; Nemazee, 2006). Ces cellules peuvent ensuite quitter la MO et rejoindre la circulation par chimio-attraction dépendante de la sphingosine 1 phosphate (S1P) et de leur expression de son récepteur S1PR, un mécanisme que les cellules lymphoïdes utilisent également pour sortir des OLII et recirculer en périphérie (Allende et al., 2010).

## 3) Tolérance périphérique des LB transitionnels

Une fois dans la circulation, les LB immatures sont considérés comme LB transitionnels possédants une courte durée de vie jusqu'à leur maturation dans les OLII où ils rejoindront les follicules. C'est à ce moment qu'intervient un premier phénomène de tolérance périphérique.

La fréquence des LB auto-réactifs diminue de ~40% à 20% après la sortie de la MO et avant l'entrée dans le pool de cellules LB matures naïves en recirculation (Wardemann & Nussenzweig, 2007). Les LB immatures auto-réactifs dont le BCR produit un fort signal, pouvant être induit particulièrement par des antigènes multivalents, subissent une délétion clonale par induction d'un signal pro-apoptotique (Pillai & Cariappa, 2009; Russell et al., 1991; Yau et al., 2013). A ce stade, la reconnaissance d'un auto-antigène monovalent peut également produire un signal suffisant pour induire l'anergie de la cellule. L'anergie est un état où notamment l'expression et la signalisation du BCR sont altérées, empêchant la cellule auto-réactive de proliférer et de survivre à long terme (Andrews et al., 2013; Fulcher & Basten, 1994; Goodnow et al., 1988; Pillai & Cariappa, 2009). Ce processus découle également en partie d'une altération de la signalisation du récepteur BAFF dans les cellules anergisées, altérant leur capacité de survie (Lesley et al., 2004). Les LB transitionnels comprennent plusieurs sous-types, principalement les T1 et T2 pouvant tous deux évoluer en LB matures naïfs. Le stade T1 est le stade de LB circulants le plus précoce avec des cellules sensibles à l'apoptose; le stade T2 est plus mature et retrouvé principalement dans les follicules de la rate. Un stade T3 a été décrit dans la rate comme similaire au T2 et correspondant potentiellement à des cellules anergisées mais pas encore éliminées (Merrell et al., 2006). La génération de LB matures naïfs sera conditionnée par une faible signalisation du BCR ainsi que des signaux de survie provenant du facteur BAFF exprimé par les cellules dendritiques folliculaires. Le passage au stade de LB matures se distingue par une diminution d'expression d'IgM et d'une IgD de surface (Loder et al., 1999; Schiemann et al., 2001).

## C. Maturation et activation périphérique des LB

### 1) Différentes populations de LB matures

La principale population de LB qui réside dans les OLII est celle des LB dits folliculaires. Au niveau de la jonction entre les pulpes blanche et rouge de la rate, les LB de la zone marginale (MZ) se distinguent spatialement des LB folliculaires. La génération des LB de la zone marginale a lieu au stade immature avec une signalisation dépendante du récepteur Notch2 (Descatoire et al., 2014; Pillai & Cariappa, 2009; Wen et al., 2005). Bien que leur fonction soit encore mal définie chez l'Homme, plusieurs études suggèrent que ces LB MZ sont impliqués dans la production d'anticorps IgM dans la réponse indépendante des LT (thymo-indépendante) aux antigènes d'origine sanguine notamment de bactéries encapsulées (Amlot

& Hayes, 1985; Mebius et al., 2004). Ces cellules peuvent transiter entre la zone marginale et folliculaire par un mécanisme dépendant de l'expression de S1P (figure 8), permettant le transport et la transmission de complexes immuns aux cellules dendritiques folliculaires (Arnon et al., 2013; Cinamon et al., 2008; Stein & Nombela-Arrieta, 2005). Les lymphocytes B1 sont un dernier type de LB qui a largement été décrit chez la souris bien que leur équivalent humain soit mal défini (Descatoire et al., 2011). Ces cellules identifiées chez la souris par leur expression de CD5 ont une origine fœtale. Elles sont présentes principalement dans les cavités pleurale et péritonéale, et sont considérées comme participant à la réponse immunitaire innée à l'instar des LB de la zone marginale, en sécrétant des anticorps IgM dits naturels pouvant être générés en l'absence d'activation du BCR et dirigés notamment contre des antigènes bactériens et des antigènes du système ABO (Baumgarth, 2011; Haas et al., 2005).

## 2) Activation des lymphocytes B

### a) Antigène thymo-indépendant

Certains antigènes dits « thymo-indépendants » sont à même d'induire l'activation et la différenciation efficace de LB sans signaux additionnels des LT. Ces antigènes comme évoqués dans la section précédente sont liés aux réponses antibactériennes et autres agents infectieux comprenant des antigènes de grande taille de type polysaccharides et protéines polymériques. On distingue 2 types d'antigènes thymo-indépendants T1 et T2 (Möller, 2001). Les antigènes T1 tels que les lipopolysaccharides (LPS), qui sont en forte concentration, peuvent induire une activation et une prolifération polyclonale, c'est-à-dire de nombreux clones différents de LB. Cette activation est indépendante de la reconnaissance et de la signalisation du BCR et est induite par les TLR reconnaissant les motifs des antigènes responsables (Möller, 2001; Ruprecht & Lanzavecchia, 2006). Les antigènes T2 sont reconnus principalement par les LB de la zone marginale et B1. Ils comprennent les structures polysaccharidiques de grande taille et à motifs hautement répétitifs tels que les bactéries encapsulées (Mond et al., 1995). Plusieurs exemplaires du BCR peuvent se lier à ces motifs répétés auxquels se fixent également les récepteurs TLR des cellules myéloïdes notamment des DC présentes dans l'environnement et qui fournissent des signaux additionnels via les facteurs BAFF, APRIL ou TACI importants pour la génération et la survie des cellules plasmablastes induites lors de cette réponse thymo-indépendante (Balázs et al., 2002; Mond et al., 1995).



## b) Antigène thymo-dépendant

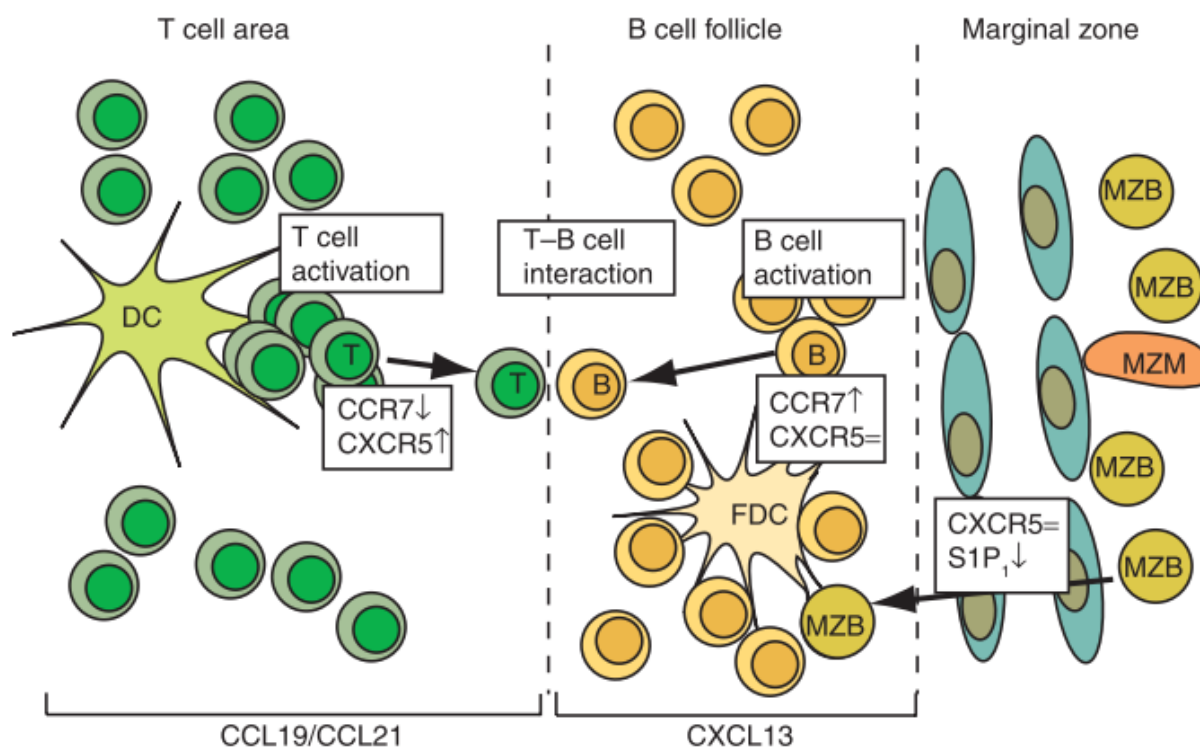


Figure 8 : follicule de la rate avec circulation des cellules selon l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs. D'après (Stein & Nombela-Arrieta, 2005) ; MZM= macrophages de la zone marginales, MZB= LB de la zone marginale.

Dans les OLII, les LB matures naïfs folliculaires sont attirés au niveau des zones corticales dans les follicules grâce à l'expression de CXCR5 en réponse à la chimiokine CXCL13 sécrétée par les DC folliculaires (FDC) (figure 8) (Stein & Nombela-Arrieta, 2005; Stranford & Ruddle, 2012). La reconnaissance par le BCR d'un antigène spécifique présenté par les FDC constitue un premier signal d'activation du LB. Ce signal induit l'expression de plusieurs gènes et de molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86. Il induit également l'internalisation de l'antigène par le LB et sa présentation une fois traité au niveau intracellulaire par le CMH de classe II (Hoogeboom & Tolar, 2015). Ce signal induit également une augmentation de l'expression de CCR7, permettant le déplacement de la cellule à la marge du follicule et de la zone T en réponse à CCL19 et CCL21 (Stein & Nombela-Arrieta, 2005). Ce positionnement est également favorisé par l'expression du récepteur EB12 (Kelly et al., 2011). Ce signal est toutefois insuffisant pour induire une réponse complète et entraîne la mort prématurée des LB sans l'apport de signaux additionnels (Akkaya et al., 2018). Ces signaux sont apportés par les LT helpers CD4<sup>+</sup> dont l'activation par un antigène similaire par les DC de la zone T entraîne une diminution de l'expression de CCR7 et une augmentation de celle du CXCR5 permettant aussi



son déplacement à la marge des zones T et B en réponse à CXCL13 (figure 8) (Stein & Nombela-Arrieta, 2005).

La rencontre d'un LB et d'un LT activés par le même antigène dans cette zone permet la liaison du TCR et du CD4 du LT au CMH II du LB présentant l'antigène ainsi que la liaison entre le CD40 exprimé le LB au CD40L (CD154) exprimé par le LT. Le CD40 est indispensable à la différenciation des LB pour lequel il induit, par une signalisation dépendante des protéines TRAF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*), des signaux de prolifération et de survie en activant la voie canonique et alternative de NF- $\kappa$ B et l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telles que Mcl-1 et Bcl-xl (Elgueta et al., 2009). Les LT sécrètent également de l'IL-21 dont la liaison à son récepteur (IL21R, CD360) au niveau des LB induit l'activation de STAT1 et STAT3 au niveau intracellulaire et une cascade de signalisation nécessaire à la prolifération des LB et à leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Kuchen et al., 2007). La costimulation du BCR, du CD40 et de l'IL-21R dans les LB induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps incluant Bcl-6, BLIMP-1 et AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Ettinger et al., 2005). L'interaction entre CD86 et CD28 exprimés par les LT ainsi qu'entre ICOSL exprimé par les LB et son récepteur ICOS exprimé par les LT induit l'activation de ces derniers et l'expression de facteurs de transcriptions tels que Bcl-6 et c-Maf nécessaires à leur différenciation en Lymphocytes T<sub>FH</sub> (*follicular helper*) (Bauquet et al., 2009; Choi et al., 2011). L'ensemble de ces signaux entraîne dans les LB une diminution d'expression de CCR7 et une migration d'une partie des LB activés à la périphérie des follicules, migration permise par la signalisation du récepteur EB12 (Gatto et al., 2011). Dans cette zone, les LB se différencient en plasmablastes qui continuent de proliférer pendant une courte période. Ces cellules productrices d'anticorps constituent la première phase de production d'anticorps dans la réponse humorale avec une absence de mutation dans les régions variables de leurs Ig et une courte durée de vie (MacLennan et al., 2003; Sze et al., 2000). Dans le même temps une autre partie des LB activés et de leurs T<sub>FH</sub> associés migrent à l'intérieur des follicules où ils continuent de proliférer et formeront un centre germinatif (GC) ou follicule secondaire.

### 3) Commutation de classe

Le processus de commutation de classe permet le changement d'isotype des régions constante des chaînes lourdes d'Ig exprimées par le LB. Comme le processus de mutation

hypersomatique, la commutation de classe est permise par l'enzyme AID exprimée dans les B activés de façon indépendante ou dépendante des LT (Muramatsu, Kinoshita, et al., 2000). La première classe d'anticorps produite est les IgM mais après recombinaison les LB pourront produire des IgE, des IgA ou des IgG. Ce processus n'a lieu qu'après la rencontre avec l'antigène par recombinaison de segments d'ADN guidés par des séquences répétitives dites de commutation ou « S » présentes au niveau des introns entre les régions  $J_H$  et  $C_\mu$  et à des positions similaires pour les autres isotypes à l'exception de  $C_\delta$  (Stavnezer et al., 2008). Durant leur transcription les résidus de cytosines au niveau de  $S_\mu$  et  $S_X$  sont désaminés par AID les convertissant en uracile, aboutissant à des cassures doubles brins de l'ADN de ces régions (Stavnezer & Schrader, 2006). Ces régions sont ensuite recombinaison de façon non-homologue par une machinerie enzymatique également impliquée dans les recombinaison V(D)J (Costantini et al., 2007). La commutation de classe peut avoir lieu dans les centres germinatifs mais celle-ci a principalement lieu hors de ces zones (Roco et al., 2019).

L'adaptation d'un isotype particulier de région constante lors de la commutation de classe dépend de l'environnement d'activation du LB. Les cytokines favorisent des changements de classe particuliers en induisant la transcription préférentielle de certaines régions constantes incluant les séquences de commutations qui les précèdent (Stavnezer et al., 2008). Lors de l'activation des LB, l'IL-21 produite par les LT CD4 favorise la commutation IgG1 et IgG3 ( $C_{\gamma 1}$  et  $C_{\gamma 3}$ ) (Avery et al., 2008). L'IFN- $\gamma$  induit l'adoption de chaînes IgG2a et IgG3 ( $C_{\gamma 2a}$  et  $C_{\gamma 3}$ ) (Collins & Dunnick, 1999). Le TGF- $\beta$  induit la commutation en IgG2b et IgA ( $C_{\gamma 2b}$  et  $C_\alpha$ ) (Park et al., 2005). L'IL-4 induit la transcription des régions IgG1 et IgE ( $C_{\gamma 1}$  et  $C_\epsilon$ ) et l'IL-5 favorise la transcription des régions IgA et IgG1 ( $C_\alpha$  et  $C_{\gamma 1}$ ) (Avery et al., 2008; R. Matsumoto et al., 1989; Messner et al., 1997).

#### 4) Centres germinatifs et mutation hypersomatique

Les GC sont une zone dans les follicules primaires composée majoritairement de LB en prolifération ainsi que de FDC et de  $T_{FH}$  nécessaires à leur différenciation. Les GC sont composés d'une zone dite sombre (*dark zone*), proche de la zone T, contenant des LB en prolifération avec une forte expression de CXCR4 dits centroblastes dont l'organisation est possible par les cellules stromales sécrétant la chimiokine CXCL12, et d'une zone claire (*light zone*) distante de la zone T comprenant des LB dits centrocytes au contact de  $T_{FH}$  et de FDC

sécrétant la chimiokine CXCL13 attirant les LB exprimant CXCR5 (Allen et al., 2004; Bannard et al., 2013; Stein & Nombela-Arrieta, 2005) (figure 9).

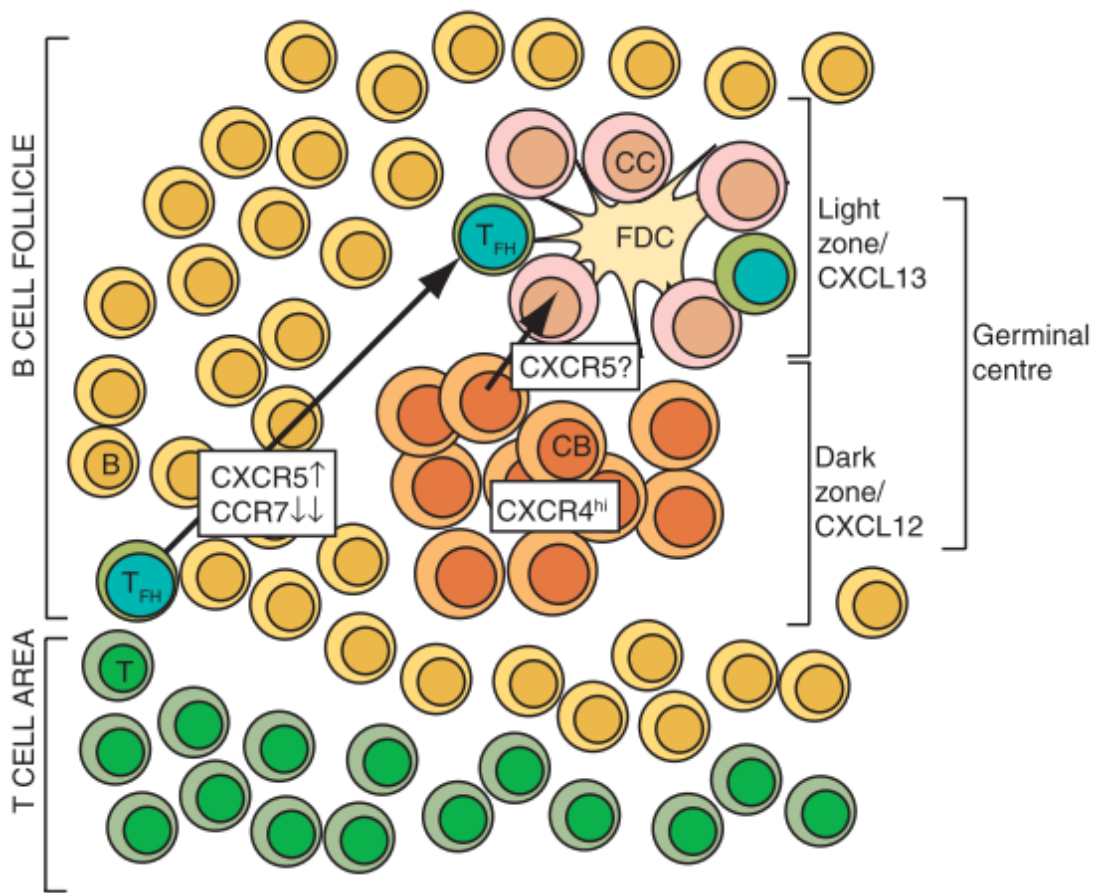


Figure 9 : représentation d'un centre germinatif avec circulation des cellules selon l'expression de chimiokines et de leur récepteurs (figure issue de (Stein & Nombela-Arrieta, 2005)) ; CC= centrocytes, CB= centroblastes.

Durant cours de la prolifération des centroblastes, les segments de gènes codant pour les domaines variables des chaînes légères et lourdes sont ciblés par l'enzyme AID exprimée dans les LB activés. Pendant la phase de transcription de l'ADN, de la même façon que pour le processus de commutation de classe, AID induit la désamination des cytosines et leur conversion en uracile. Cette transformation active différents procédés de réparation de l'ADN et entraîne la génération de mutations dans les zones ciblées par AID, un mécanisme dit de mutation hypersomatique (SHM) (Di Noia & Neuberger, 2007). Les mutations des régions variables et particulièrement celles ciblant les CDR induisent une variation d'affinité de la nouvelle Ig produite pour son antigène, positive ou négative. A l'issue de sa phase de prolifération, le centroblaste passe au stade de centrocyte et migre vers la zone claire où se trouvent les FDC (Allen et al., 2007; Bannard et al., 2013). Les centrocytes dont le BCR présente la plus grande affinité pour l'antigène reçoivent un signal de survie et une capacité accrue

d'internalisation et de présentation de l'antigène via le CMH II. Les T<sub>FH</sub> de la zone claire interagissent alors préférentiellement avec les centrocytes présentant un haut degré de CMH II auxquels ils fournissent un signal de survie permis par le CD40 et l'expression de ICOSL (Basso et al., 2004; D. Liu et al., 2015). Les centrocytes sélectionnés positivement par les T<sub>FH</sub> peuvent subir un nouveau cycle de maturation du BCR et ceux ne possédant pas un BCR viable ou suffisamment afin pour l'antigène sont éliminés par apoptose (Bannard et al., 2013; Gitlin et al., 2015; Victora et al., 2012).

## 5) Plasmocytes

A l'issue de leur maturation, une partie des LB se différencient en plasmocytes ou LB mémoires. Les cellules plasmocytaires productrices d'anticorps diffèrent des LB activés d'un point de vue morphologique et phénotypique notamment de par une répression d'expression de leur BCR et du CMH de classe II (Shapiro-Shelef & Calame, 2005). Leur génération dépend d'un ensemble de facteurs de transcription mutuellement réprimés et exprimés. L'évolution des LB dès leur génération est dépendante de l'expression de PAX5 qui régit notamment celle d'AID pendant l'activation des LB et dans les GC et inhibe celle du facteur de transcription XBP-1 (Gonda et al., 2003; Shapiro-Shelef et al., 2003). La formation des GC est également dépendante de l'expression de Bcl-6 qui agit aussi comme répresseur de l'expression de BLIMP1 (Dent et al., 1997). Pendant la maturation des LB, une diminution d'expression de Bcl-6 induite par l'activation du BCR et de CD40 permet l'expression de BLIMP1 nécessaire à la différenciation irréversible en plasmocytes et à leur sécrétion en anticorps (Allman et al., 1996). BLIMP1 réprime l'expression de PAX5 et Bcl-6 induisant un arrêt de la prolifération et la production d'anticorps (Lin et al., 2002; Shaffer et al., 2002). La production d'anticorps est induite notamment par le facteur de transcription IRF4 impliqué aussi dans l'expression de BLIMP1, dans l'expression des chaînes légères d'Ig et par XBP1 impliqué dans l'activation de l'activité sécrétrice des Ig mise en place au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Eisenbeis et al., 1995; Ochiai et al., 2013; Shaffer et al., 2004). Les plasmocytes présents en périphérie disparaîtront dans les semaines suivant leur génération et migreront dans la MO où ils deviendront des plasmocytes à longue durée de vie (Slifka et al., 1995). Cette localisation est permise par BLIMP1 induisant un profil chimiotactique particulier permettant leur migration et leur maintien dans la MO incluant l'expression de CXCR4 répondant au CCL12 produit par les cellules stromales et de l'intégrine- $\alpha_4\beta_1$  qui se liera à la protéine VCAM1

exprimée à la surface des cellules épithéliales de la MO (Kunkel & Butcher, 2003). Leur persistante est permise par des facteurs favorisant leur survie (incluant BAFF, l'IL-5, CXCL12 et le TNF- $\alpha$ ) et qui sont produits par les cellules de la MO (Cassese et al., 2003; O'Connor et al., 2004).

## 6) LB mémoires

Une autre partie des LB activés se différencie en LB mémoires définis comme des LB au repos ayant rencontré leur antigène, présentant une longue durée de vie et capables d'être réactivés en LB effecteurs en cas de rencontre avec le même antigène. Les LB mémoires sont hétérogènes et peuvent être générés après rencontre de leur antigène spécifique dans une réponse T-indépendante (Obukhanych & Nussenzweig, 2006), ou T-dépendante avec ou sans commutation de classe (Kurosaki et al., 2015). Dans le cas d'une réponse T-dépendante, une partie des LB peut se différencier tôt avant la formation de GC en cellules mémoires de faible affinité, avec l'apparition plus tardive de LB mémoires dérivés des GC, de plus forte affinité pour l'antigène et majoritairement commutés (Taylor et al., 2012). Il a été observé dans la zone claire des GC que les LB avec un BCR de plus faible affinité étaient préférentiellement et rapidement orientés vers une différenciation en LB mémoires, différenciation favorisée par une plus faible interaction avec les T<sub>FH</sub> et l'expression du facteur de transcription Bach2 (Kometani et al., 2013; Shinnakasu et al., 2016). Après leur génération, les LB mémoires persistent dans la circulation, dans la MO et au niveau des OLI dans l'espace sub-capsulaire au contact des macrophages et des LT<sub>FH</sub> mémoires (Moran et al., 2018). Leur persistance est permise par un signal basal du BCR dépendant de la PLC $\gamma$ 2 et ne nécessitant pas la stimulation de l'antigène (Hikida et al., 2009; Maruyama et al., 2000). En cas de rencontre avec leur antigène, les LB mémoires se différencient rapidement en plasmocytes ou peuvent entrer à nouveau en phase de maturation dans les GC (Good & Tangye, 2007). À l'exception de réponses antivirales, les LB spécifiques d'antigènes monomériques nécessitent l'aide de LT<sub>FH</sub> mémoires pour leur réactivation (Kurosaki et al., 2015; Onodera et al., 2016). Il a été démontré en transplantation rénale, chez les patients hautement sensibilisés, une fréquence accrue de LB mémoires HLA spécifiques associés au développement et à la sévérité de rejets humoraux. Avant transplantation et au cours de rejet humoraux, ces LB mémoires HLA spécifiques peuvent être détectés en l'absence de leurs DSA associés, soulignant la pertinence de leur évaluation pré-transplantation (Lúcia et al., 2015; Luque et al., 2019).

## D. Diversité phénotypique des LB

### 1) Marqueurs extracellulaires des principales populations de LB périphériques

Comme décrit au cours de ce manuscrit, les différents stades de maturation des LB, à l'instar des autres cellules immunitaires, se distinguent par l'expression différentielle de marqueurs mesurables au niveau protéique notamment par cytométrie, incluant l'expression de CD19 et CD20 comme marqueurs caractéristiques des LB (Carsetti et al., 2022; Kaminski et al., 2012; Velounias & Tull, 2022).

Tableau 2 : expression des marqueurs extracellulaires classiquement utilisés pour la distinction des principales populations de LB présentes en périphérie. Adapté de (Carsetti et al., 2022).

	Transitionnels	Mature-Naïfs	Mémoires	Plasmablastes/Plasmocytes
CD20	+	+	+	-
CD24	+++/>++	+	+	-
CD38	+++/>++	+	+	+++
CD21	+/>++	++	++	+
CD27	-	-	+	++
CD138	-	-	-	-/>+
Ig	IgM <sup>high</sup> /IgD <sup>+</sup>	IgD <sup>high</sup> /IgM <sup>+</sup>	IgM <sup>+</sup> /IgD <sup>+</sup> IgM <sup>high</sup> /IgD <sup>low</sup> IgG <sup>+</sup> IgA <sup>+</sup> IgE <sup>+</sup>	Extracellulaire/Intracellulaire

A la sortie de la MO les LB transitionnels IgM<sup>high</sup> IgD<sup>+</sup> sont caractérisés par une forte expression de CD24 et CD38 particulièrement au stade T1 et déclinant au cours de leur maturation. Ils acquièrent également l'expression de CD21, le récepteur 2 du complément pouvant participer au signalosome du BCR et à l'activation des LB au même titre que CD19 (Bemark, 2015; Anu Cherukuri et al., 2001). Les LB matures naïfs représentent la majorité des LB circulants, de l'ordre de 60 à 70% (Palanichamy et al., 2009; Weill et al., 2009). Ils sont caractérisés par une forte expression d'IgD et l'expression d'IgM et de CD21 (Carsetti et al., 2022; Kaminski et al., 2012; Velounias & Tull, 2022). Les LB mémoires et les LB naïfs représentent la majeure partie des LB circulants et constituent un compartiment particulièrement hétérogène. Ils sont

notamment caractérisés par l'expression de CD27, un récepteur de la famille des TNF (TNFRS7) (Loenen et al., 1992). On distingue en premier lieu les LB mémoires n'ayant pas subi de commutation de classe également dits « unswitch », pouvant être  $IgM^+ IgD^+$  ou  $IgM^{high} IgD^{low}$ , et souvent identifiés comme des LB de la zone marginale impliqués dans la réponse T-indépendante (Velounias & Tull, 2022; Weller & Descatoire, 2015). On observe également les LB mémoires « switch » ayant commuté de classe qui seront  $IgM^- IgD^-$  et pourront exprimer les isotypes d'Ig IgG, IgA ou IgE (Carsetti et al., 2022; Kaminski et al., 2012; Velounias & Tull, 2022). Enfin les cellules productrices d'anticorps, plasmablastes et plasmocytes, sont caractérisées par une expression de CD19 et une perte de l'expression de CD20, associées à une forte expression de CD38 et CD27 (Kaminski et al., 2012). Cette perte d'expression de CD20 explique l'échec relatif des traitements avec des anticorps anti-CD20 (Rituximab) pour traiter les rejets chroniques médiés par les anticorps (Cooper, 2020). Les plasmablastes se différencient des plasmocytes par le fait que ce sont des cellules prolifératives et part une expression plus élevée de BCR et HLA-DR. Les plasmocytes sont également caractérisés par l'expression de CD138 (syndecan-1) et une perte d'expression de HLA-DR. Leur expression d'Ig est également perdue au niveau extracellulaire mais détectée en intracellulaire (Caraux et al., 2010; González-García et al., 2006; Odendahl et al., 2005).

Nous avons jusqu'ici décrit le rôle des LB dans la réponse allo-immune comprenant principalement la production d'anticorps ainsi que la présentation d'antigène. Certaines sous-populations de LB particuliers ont été décrites comme associées à un environnement pro-inflammatoire dans plusieurs pathologies.

## 2) Lymphocytes B atypiques

L'origine et le rôle des LB atypiques restent mal connus mais ils ont été largement décrits ces dernières années comme associés à des pathologies inflammatoires chroniques incluant les maladies auto-immunes et les infections (Gao & Cockburn, 2022; Karnell et al., 2017). Les LB atypiques sont un sous-type de LB mémoires qui contrairement aux LB mémoires classiques présentent une expression réduite de CD21 et une perte d'expression de CD27. C'est pourquoi ils peuvent également être décrits comme des LB double négatifs (DN)  $IgD^- CD27^-$  (Jenks et al., 2018; Rincon-Arevalo et al., 2021). Les marqueurs les plus souvent utilisés pour les caractériser sont l'expression des marqueurs CD11c, FCRL4, FCRL5 et l'expression du facteur de transcription T-Bet (Holla et al., 2021; King et al., 2021; Sutton et al., 2021). Certaines études

montrent un niveau comparable de mutations hypersomatique par rapport aux LB mémoires classiques suggérant un stade-post GC pour ces LB double négatifs (Holla et al., 2021; King et al., 2021; Sutton et al., 2021). Cependant d'autres études ont montré que les LB atypiques CD11c<sup>+</sup> pouvaient être générés indépendamment de la formation de GC (Song et al., 2022). Des études suggèrent que les LB atypiques pourraient être des cellules en anergie car réagissant faiblement aux stimulations classiques du BCR et du CD40, avec une plus faible capacité à se différencier en plasmocytes (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rubtsov et al., 2011; S. Wang et al., 2018). Cette hypothèse est également appuyée par l'expression dans ces cellules de plusieurs récepteurs inhibant l'activation des LB ; CD22, CD32, CD85, CD72, PDL1 (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rincon-Arevalo et al., 2021; S. Wang et al., 2018). Ces études ont montré également dans ces cellules une expression accrue du récepteur Fas (CD95) et une propension plus forte à entrer en apoptose en réponse au Fas-L et spontanément, un trait évocateur d'un phénotype anergique (Austin et al., 2019). Toutefois il a été montré que ces LB atypiques pouvaient être activés en présence d'IL-21 et par stimulation du TLR7 et TLR9 (Jenks et al., 2018; Rubtsov et al., 2011; S. Wang et al., 2018). De plus, une étude a observé que ces cellules avaient une expression accrue des gènes codants pour IRF4 et BLIMP1 et étaient des précurseurs de cellules productrices d'auto-anticorps (Jenks et al., 2018). Une autre étude a également montré que ces LB atypiques étaient enrichis en clones auto-réactifs (S. Wang et al., 2018). Une étude récente a également montré que des patients transplantés rénaux ayant eu des épisodes de rejet humoral, en présence de DSA dans les 24 premiers mois de la transplantation, présentaient une population plus grande de LB atypiques T-bet<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (K. Louis et al., 2021). Ainsi, le phénotype des LB atypiques évoque des cellules mémoires anergiques mais capables de se différencier en cellules productrices d'anticorps impliquées dans la physiopathologie des maladies auto-immunes.

A l'inverse des LB atypiques, d'autres populations de LB peuvent acquérir des phénotypes particuliers avec l'expression de marqueurs et de cytokines leur conférant des propriétés immunomodulatrices de la réponse immunitaire. Ces LB sont définis comme des LB régulateurs (Breg) présentant différents phénotypes et impliqués dans diverses situations y compris en transplantation rénale chez les patients tolérants opérationnels (Oleinika et al., 2019).



### 3) Tolérance opérationnelle et lymphocytes B

Comme évoqué précédemment, plusieurs particularités associées au compartiment des LB ont été identifiées chez les patients tolérants (TOL). Plusieurs études ont notamment identifié une augmentation de la fréquence et de la valeurs absolue des LB dans le sang des TOL (S. Louis et al., 2006; K. A. Newell et al., 2015; Kenneth A. Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Ces études soulignent également l'augmentation de populations de LB précoces notamment de LB naïfs (CD19<sup>+</sup>; CD20<sup>+</sup>; CD27<sup>-</sup>; IgM<sup>+</sup>; IgD<sup>+</sup>; CD24<sup>+</sup>; CD38<sup>+</sup>) et transitionnels (CD19<sup>+</sup>; CD20<sup>+</sup>; CD27<sup>-</sup>; IgM<sup>+</sup>; IgD<sup>+</sup>; CD24<sup>high</sup>; CD38<sup>high</sup>) (M. Chesneau et al., 2014; K. A. Newell et al., 2015; Kenneth A. Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Silva et al., 2012). Associé à une diminution de la fréquence de plasmocytes (CD19<sup>+</sup>; CD38<sup>+</sup>; CD138<sup>+</sup>) dans le sang des TOL par rapport aux patients stables sous IS (STA), un défaut de différenciation de LB naïfs des TOL est observé après 6 jours de différenciation *in vitro* et à une réduction de l'expression des gènes codants pour *IRF4*, *XBP1* et *BLIMP1* par rapport aux LB des patients STA (M. Chesneau et al., 2014). Cette étude a également montré qu'après 6 jours de différenciation, les LB des TOL avaient un caractère pro-apoptotique avec une expression accrue de la caspase-3 et une sous expression de gènes anti-apoptotiques par rapport aux LB des patients STA (M. Chesneau et al., 2014). Ce phénotype pro-apoptotique a été confirmé dans une autre étude montrant une expression forte d'annexine V à J0 dans les LB des TOL par rapport à ceux de volontaires sains (HV) (Le Berre et al., 2021).

Par ailleurs, notre équipe a montré l'augmentation d'une population de LB aux propriétés régulatrices exprimant GZMB chez les TOL (Mélanie Chesneau et al., 2015b; Sailliet et al., 2023). Cette population de Breg possède un phénotype de LB différencié avec une génération dépendante de l'IL-21 et des propriétés suppressives sur la prolifération des LT par un mécanisme contact dépendant et dépendant du GZMB (Mélanie Chesneau et al., 2015b, 2020; Sailliet et al., 2023). L'analyse en *single Cell RNA sequencing* des interactions ligands/récepteurs de LB GZMB<sup>+</sup> mis en co-culture avec des LT activés a montré plusieurs ligands potentiels validés au niveau protéique, exprimés par les LB GZMB<sup>+</sup> et interagissant avec le LT. Ceux-ci incluent la lymphotoxine  $\alpha$  (LTA) (Sailliet et al., 2023). *In vitro*, l'inhibition de la LTA dans les LB GZMB<sup>+</sup> est associée à une diminution de l'expression de GZMB et de leur activité suppressive sur les LT activés, suggérant le contrôle de la production de GZMB par les LTA (Sailliet et al., 2023).

Les TOL présentent par ailleurs une fréquence et une valeur absolue plus fortes de LB CD1d<sup>+</sup> et de LB CD5<sup>+</sup> par rapport aux patients STA et en rejet chronique (Pallier et al., 2010). Dans un modèle murin de colite, l'équipe de Bhan a été la première à montrer l'implication d'une population de LB exprimant un niveau élevé de CD1d et capable de réguler l'inflammation médiée par la réponse Th2 par le biais de la production d'IL-10 (Mizoguchi et al., 2002). Dans un modèle murin, une autre étude a mis en évidence la capacité d'une petite population splénique de LB CD1d<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup> à inhiber la réponse d'hypersensibilité par la production d'IL-10. Ces Breg spléniques CD1d<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup> producteurs d'IL-10 ont été nommés « B10 » murins (Yanaba et al., 2008). Les LB CD1d<sup>+</sup> et CD5<sup>+</sup> identifiés par Pallier *et al.* dans le sang des TOL présentent un phénotype similaire à celui des B10 murins. Cependant, l'analyse du niveau d'expression de l'IL-10 dans les LB humains des TOL n'a pas été retrouvé différent entre les différents groupes de patients après stimulation CD40L, CD40L et CpG ou CD40L et anti-Ig (Pallier et al., 2010).

Blair *et al.* ont montré que les LB transitionnels immatures CD19<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> dans le sang périphérique de HV présentaient une plus grande capacité à produire de l'IL-10 après stimulation et étaient capables d'inhiber en co-culture la prolifération des LT de manière dépendante de l'IL-10 (Blair et al., 2010), ce qui a été confirmé dans d'autres études (Das et al., 2012; Flores-Borja et al., 2013). Cette population de LB immatures correspond à la population décrite dans plusieurs études comme étant augmentée dans le sang des TOL (M. Chesneau et al., 2014; K. A. Newell et al., 2015; Kenneth A. Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Silva et al., 2012). Également, ils ont constaté que 71% des LB CD1d<sup>high</sup> CD5<sup>+</sup> étaient compris dans la population de LB CD19<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>, indiquant qu'il s'agirait de la même population Breg (Blair et al., 2010; Pallier et al., 2010). Dans le but d'étudier le rôle de ces Breg dans la tolérance, Newell *et al.* ont montré après stimulation une expression supérieure d'IL-10 par les LB transitionnels T1 et T2 chez les TOL par rapport par rapport aux HV et patients STA (Kenneth A. Newell et al., 2010). Chesneau *et al.* ont aussi constaté après 4 jours de culture de LB totaux une augmentation significative de la production d'IL-10 chez les TOL par rapport aux STA et HV (M. Chesneau et al., 2014). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Blair *et al.* (Blair et al., 2010), et ont été appuyés par Cherukuri *et al.* qui montre que les LB transitionnels présentent un ratio IL-10/TNF $\alpha$  réduit chez les receveurs avec un rejet de leur greffon (Cherukuri et al., 2014, 2021). La diminution de la fréquence des LB transitionnels chez

des patients présentant un rejet ABMR avec DSA est aussi cohérent avec leur caractère régulateur chez les patients transplantés rénaux (K. Louis et al., 2022). De façon intéressante, Nova-Lamperti *et al.* ont montré une signalisation du BCR altérée dans les LB des TOL par rapport aux HV, avec une réduction de la phosphorylation d'ERK, l'effecteur final de la voie des MAP-kinases, associé à une réduction du niveau d'IgG1 dans le sérum des TOL, indiquant un défaut de différenciation de leur LB, cohérent avec l'étude de Chesneau *et al.* (M. Chesneau et al., 2014; Nova-Lamperti et al., 2017). Leur étude souligne également que la stimulation du CD40 induit la production d'IL-10 dans les LB transitionnels des TOL et des HV, alors que la double stimulation BCR et CD40 entraîne une baisse de la production d'IL-10 chez les HV mais pas chez les TOL, indiquant que la signalisation altérée du BCR chez les TOL favorise l'expression d'IL-10 par les LB transitionnels (Nova-Lamperti et al., 2017).

L'ensemble de ces études s'accordent pour montrer un nombre de LB totaux augmenté, particulièrement avec un phénotype précoce, pro-apoptotique, une capacité diminuée de différenciation et l'émergence de populations régulatrices via la production d'IL-10 et de GZMB. De nombreux travaux ont cherché à déterminer une signature biologique de la tolérance dans le but de comprendre les mécanismes de tolérance et possiblement de l'induire. Ces travaux se sont concentrés sur les cellules du sang périphérique (PBMC= *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) des TOL du fait de l'absence de biopsies disponibles pour ces patients. Plusieurs groupes ont identifiés des signatures transcriptionnelles de la tolérance avec en commun l'expression de plusieurs marqueurs liés aux LB en cohérence avec l'augmentation de leur nombre chez les TOL (Braud et al., 2008; Sophie Brouard et al., 2007; Danger et al., 2012, 2017; Kenneth A. Newell et al., 2010; Roedder et al., 2015; Sagoo et al., 2010). Parmi les transcrits liés aux LB retrouvés de façon récurrente dans les signatures transcriptionnelles de la tolérance figure *TCL1A*.

### III. TCL1A

#### A. L'expression de TCL1A comme marqueur de la bonne fonction du greffon

Le gène *TCL1A* (*T cell leukemia lymphoma protein 1A*) a été identifié pour la première fois comme un biomarqueur potentiel de la tolérance en transplantation rénale en étant 1,80 fois plus exprimé dans les PBMC de TOL par rapport par rapport aux HV (Sophie Brouard et al., 2007). En 2010, Newell *et al.* ont montré que le gène *TCL1A* était en moyenne 2 fois plus

exprimé chez les TOL par rapport aux STA (Kenneth A. Newell et al., 2010). Sagoo *et al.* ont également trouvé une augmentation significative de *TCL1A* chez les TOL par rapport aux STA et aux patients en rejet chronique (CR) et qu'il était le deuxième gène parmi les 170 gènes les plus différentiellement exprimés entre les groupes de patients (Sagoo et al., 2010). Logiquement, *TCL1A* figure parmi une signature de tolérance de 20 biomarqueurs, permettant de discriminer les TOL des STA avec une précision de 91,7 %, issue d'une méta-analyse regroupant les données transcriptomiques publiées alors (Baron et al., 2015). Cette signature a été restreinte en une signature composite de six gènes, dont *TCL1A* (avec *AKR1C3*, *CD40*, *CTLA4*, *ID3* et *MZB1*) et deux paramètres cliniques, permettant de discriminer des patients TOL et STA (42 TOL ; 189 STA) avec une aire sous la courbe de 0,973 et des valeurs prédictives négatives et positives de 0,989 et de 0,800, respectivement (Danger et al., 2017). Une étude a souligné que les traitements IS (en particulier la prednisone et l'azathioprine) ont un impact sur l'expression des gènes liés aux LB et sur les sous-populations de LB, en particulier les cellules LB transitionnelles (Rebollo-Mesa et al., 2016). Bien qu'il ne soit pas exclu un rôle des LB transitionnels dans le processus de tolérance, cette étude suggère que l'augmentation des LB transitionnels chez les TOL peut être le résultat de l'absence de traitement IS chez ces patients, jouant sur la signature transcriptionnelle de la tolérance (Rebollo-Mesa et al., 2016). Pour répondre à cette question, une étude a tenté d'identifier une signature de la tolérance prenant en compte l'impact de l'immunosuppression à l'aide d'ajustements statistiques et rapportent qu'après correction le niveau d'expression de *TCL1A* peut encore être utilisé pour discriminer les TOL des patients non-TOL (Christakoudi et al., 2020). Outre son association au phénotype de tolérance, l'expression du gène *TCL1A* a également été identifiée comme surexprimé chez des STA durant les 6 premiers mois de greffe par rapports aux patients subissant un épisode de rejet (Viklicky et al., 2013). De même, une autre étude a rapporté une augmentation de l'expression du gène *TCL1A* dans les PBMC et les LB isolés pendant la période post-transplantation chez les STA, mais profondément réduite chez les patients en rejet aigu. Ils montrent également que l'expression de *TCL1A* possède une forte capacité de discrimination pour prédire l'épisode de rejet aigu (AUC = 0,86 ; P < 0,001) (Heidt et al., 2015). De façon similaire, une étude récente au sien de notre équipe a montré que l'expression de *TCL1A* était diminuée chez des patients en état de rejet subclinique humoral, et que celle permettait l'identification de ces patients intégrée dans un score regroupant 2 gènes et 4 paramètres cliniques (Danger et al., 2023). L'expression de *TCL1A* semble donc être un fort

marqueur prédictif de la tolérance immunitaire et des épisodes de rejet après une allogreffe qui suggère son implication dans l'homéostasie de la réponse allo-immune. Cependant, la manière dont *TCL1A* pourrait être impliqué dans la régulation des LB et le maintien de la tolérance reste à déterminer.

## B. La protéine TCL1A

### 1) Structure et interactions de la protéine TCL1A

Chez l'Homme, *TCL1A* est une protéine de 14 kDa, de 114 acides aminés partageant 50% d'homologie avec la protéine *TCL1A* murine (Hoh et al., 1998; Künstle et al., 2002; Petock et al., 2001). Il s'agit d'une petite protéine intracellulaire non enzymatique agissant comme co-activateur de la protéine kinase B ou Akt, une sérine thréonine kinase centrale dans la signalisation des LB avec des effets multiples sur leur prolifération, leur croissance et leur survie (Laine et al., 2000; Y. Pekarsky, 2000). *TCL1A* est composé d'un noyau hydrophobe entouré de deux feuillets  $\beta$  à 4 brins. Un feuillet est composé de brins plus courts ( $\beta$ A- $\beta$ B et  $\beta$ E- $\beta$ F) et l'autre de brins plus longs ( $\beta$ C- $\beta$ D et  $\beta$ G- $\beta$ H). Les deux feuillets sont reliés par une boucle longue et flexible entre les brins  $\beta$ D et  $\beta$ E, avec une organisation globale de type  $\beta$ -barrel (Petock et al., 2001).

*TCL1A* contient un domaine d'homodimérisation dans ses brins  $\beta$ C, qui est nécessaire pour la coactivation d'Akt. Une fois dimérisé, *TCL1A* peut lier les trois isoformes d'Akt grâce à une interaction entre les brins  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ E et  $\beta$ F et deux domaines PH d'Akt (Auguin et al., 2004; Laine et al., 2002; Petock et al., 2001). Dans les LB, la voie de signalisation d'Akt est déclenchée par l'activation des récepteurs à tyrosine kinase, en particulier le BCR qui induit une cascade de phosphorylation impliquant plusieurs agents. Cette signalisation aboutie au recrutement d'Akt à la membrane plasmique par la PI3K, et termine d'être complètement activé par la protéine 3-phosphoinositide-dépendante kinase 1 (PDK1), le complexe mTORC2 et d'autres kinases (figure 10) (Jacinto et al., 2006; Walker et al., 1998; Werner et al., 2010). Une fois activée, Akt se détache de la membrane et active plusieurs voies en aval. Sous forme d'hétérodimère *TCL1A*-Akt, *TCL1A* ne phosphoryle pas directement Akt mais facilite les interactions et la phosphorylation d'Akt à la membrane, bloquant son inactivation et favorisant sa translocation vers le noyau (figure 10) (Laine et al., 2000, 2002; Y. Pekarsky, 2000; Petock et al., 2001).

De plus, TCL1A interagit et régule de nombreuses voies de signalisation indépendamment d'Akt (Paduano et al., 2018). Les partenaires d'interaction de TCL1A connus comprennent l'ADN méthyltransférase A (DNMT3A) et DNMT3B (Palamarchuk et al., 2012), le récepteur *tyrosine kinase-like orphan receptor 1* (ROR1) (Widhopf et al., 2014), et la *heat shock protein 70* (Hsp70) (Gaudio et al., 2013). Ces interactions indépendantes d'Akt ont un impact sur l'oncogenèse induite par TCL1A, mais elles sont également impliquées dans d'autres processus.

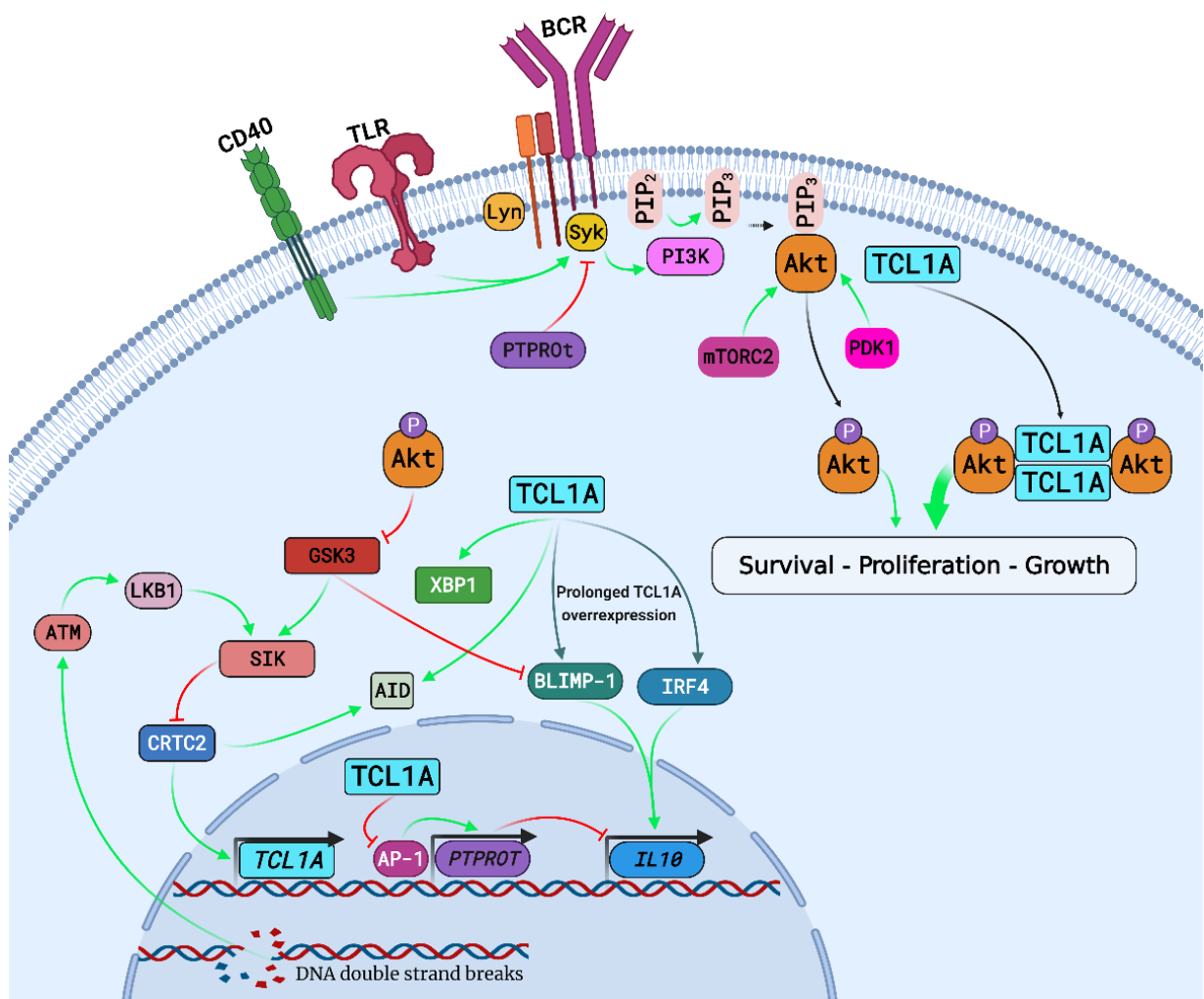


Figure 10 : schéma de la signalisation intracellulaire impliquant la protéine TCL1A dans les lymphocytes B. D'après (Brinas et al., 2021). Les récepteurs tyrosines kinase induisent une cascade de phosphorylation impliquant notamment les enzymes Lyn et Syk conduisant à l'activation de PI3K. PI3K convertit PIP2 en PIP3 permettant le recrutement d'Akt à la membrane et son activation complète par mTORC2 et PDK1. Une fois phosphorylée, Akt active des cibles en aval, ce qui entraîne la survie, la croissance et la prolifération des cellules B. Les homodimères de TCL1A se complexent avec Akt pour augmenter ses effets. Au cours de la maturation des LB dans les GC, AID génère des cassures doubles de l'ADN induisant l'inactivation de CRTC2 par SIK via ATM et LKB1 inhibant l'expression de TCL1A. La surexpression de TCL1A pourrait conduire à l'augmentation de XBP-1 et AID et à long terme de BLIMP-1 et IRF4, deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LB et l'expression de l'IL-10. TCL1A altère aussi l'expression de PTPROT via l'inhibition d'AP-1. L'inhibition d'expression de PTPROT induit

## 2) Expression de TCL1A

### a) Physiologique et pathologique

TCL1A a été identifié pour la première fois comme un oncogène impliqué dans les LT de leucémie (Russo et al., 1989; Virgilio et al., 1993, 1994). Le gène *TCL1A* a été découvert dans les thymocytes lors d'anomalies de réarrangements chromosomiques avec inversion ou translocation du gène de *TCL1A* avec le locus des chaînes  $\alpha/\delta$  ou  $\beta$  du TCR. Ces réarrangements induisent sa surexpression par l'intermédiaire de l'expression constitutive du TCR et le développement de la leucémie (Narducci et al., 1997; Russo et al., 1989). Chez l'Homme, le gène codant pour *TCL1A* est situé sur le chromosome 14q32.1 et appartient à une famille composée de cinq gènes, *TCL1A*, *TCL1B*, *TNG1*, *TNG2* et *MTCP1* (Hallas et al., 1999; Yuri Pekarsky et al., 1999). Le gène *TCL1A* est exprimé au niveau foetal dans le foie, la rate, les reins, et au cours de la vie dans les amygdales, les testicules et les lymphocytes du sang périphérique (Hallas et al., 1999; Narducci et al., 2002; Yuri Pekarsky et al., 1999). Dans des conditions physiologiques, *TCL1A* est impliqué dans l'embryogenèse et la lymphopoïèse (Narducci et al., 2002). Seules les LT double positifs  $CD4^+CD8^+$  au stade de thymocytes expriment *TCL1A*, qui est ensuite réprimé dans les LT matures (Virgilio et al., 1994). Dans les LB, l'expression de *TCL1A* est amorcée dans les cellules pro-B avec un pic d'intensité dans les cellules pré-B et persiste dans les LB naïves. Elle est également exprimée dans les LB des follicules primaires, mais fortement diminuée dans les LB de la zone marginale et dans les centre germinatifs et complètement réprimée dans les LB mémoires et les plasmocytes post-CG (Narducci et al., 2000; Said et al., 2001; Virgilio et al., 1994), même si de faibles niveaux d'expression peuvent être détectés dans des plasmocytes différenciées in vitro (Said et al., 2001). L'expression de *TCL1A* est également détectée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Herling et al., 2003).

Le blocage de *TCL1A* dans des modèles d'animaux empêche le développement de l'embryon jusqu'au stade de la morula (Narducci et al., 2002). Cela entraîne également l'altération de la lymphopoïèse par une sensibilité accrue à l'apoptose des cellules immatures soumises à la sélection clonale positive et négative, soulignant le rôle majeur de *TCL1A* dans le développement des lymphocytes (Narducci et al., 2000). A l'inverse, la surexpression de *TCL1A* est associée au développement de tumeurs malignes de lymphocytes T et B. Des anomalies

d'expression de *TCL1A* peuvent également se produire dans les LB et conduire à de multiples types de lymphomes survenant aux stades pré-GC de différenciation (Aggarwal et al., 2009; Herling et al., 2007). Différents modèles murins ont été créés pour étudier le rôle de *TCL1A* dans l'oncogenèse des LB. Les souris transgéniques E $\mu$ -*TCL1A*, dans lesquelles le gène *TCL1A* est contrôlé par un promoteur VH-IgH-E $\mu$  et développant une augmentation de l'expression de *TCL1A* dans les LB immatures et matures, servent de modèle de leucémie lymphocytaire chronique B (B-CLL). Ces souris présentent une expansion polyclonale de LB CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> dans les tissus lymphoïdes primaires et secondaires à l'âge d'environ 4 et 8 mois (Bichi et al., 2002; Dilillo et al., 2010; Kriss et al., 2012).

#### b) Eléments régulant l'expression de *TCL1A*

Les modalités d'expression anormale de *TCL1A* responsables de lymphomes et de sa répression physiologique dans les LB différenciés ne sont pas totalement comprises. L'étendu de ces mécanismes a récemment été revu par Stachelscheid *et al.* (Stachelscheid et al., 2021). La régulation physiologique et la surexpression pathologique de l'expression de *TCL1A* dans les LB pourraient avoir lieu au niveau transcriptionnel (Narducci et al., 2000; Virgilio et al., 1994). Le facteur de transcription Nur77 peut réguler l'expression de *TCL1A* par l'intermédiaire de l'élément de réponse au NGF (*nervous growth factor*) avec un rétro-contrôle négatif qui dépend de la phosphorylation de Nur77 par Akt (Hiromura et al., 2006). Des sites de liaison au facteur de transcription Sp1 ont été identifiés dans la région promotrice de *TCL1A* et ont montré l'implication de ce facteur de transcription dans l'expression de *TCL1A in vivo* (French et al., 2003). D'autres mécanismes de régulation de *TCL1A* ont été proposés, comme la régulation par les microARN miR-29 et miR-181 (Efanov et al., 2010; Yuri Pekarsky et al., 2006) ou des modifications épigénétiques (Kuraishy et al., 2007; Yuille et al., 2001), mais l'ensemble de ces mécanismes ne suffit pas à expliquer complètement la répression physiologique de *TCL1A* ou sa surexpression pathologique.

#### c) Le facteur de transcription CRTC2

L'équipe de Kuraishy *et al.* a également identifié un élément de réponse au facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) dans la région promotrice de *TCL1A*. L'activation de CREB est médiée par l'AMPc et par l'activation de la PKA (Mayr & Montminy, 2001). Dans les cellules HEK293, l'expression de *TCL1A* est dépendante de l'AMPc. La surexpression de CREB par un transgène induit 3 fois plus de *TCL1A*. Ceci n'est pas observé



dans les cellules présentant une mutation de l'élément de réponse à CREB (Kuraishy et al., 2007). Ce mode d'expression de TCL1A dépend de la coopération entre CREB et la protéine CRTC2 (*transducer of regulated CREB protein 2*) (Conkright et al., 2003). L'AICAR (un analogue de l'AMPc) induit la phosphorylation et l'inactivation de CRTC2, entraînant une répression dose-dépendante de l'expression de TCL1A, indiquant une collaboration entre CREB et CRTC2 pour induire l'expression de la TCL1A. L'utilisation d'un siRNA ciblant CRTC2 induit une répression de 40 % de l'expression de TCL1A dans des cellules Nalm6. CRTC2 pourrait donc être impliqué dans la régulation physiologique et pathologique de TCL1A dans les LB (Kuraishy et al., 2007). Il est intéressant de noter que la stimulation du BCR et de CD40 induit la rétention cytoplasmique de CRTC2 et la répression de l'expression de TCL1A entraînant l'apoptose des cellules Ramos, alors que l'AMPc permet la translocation de CRTC2 vers le noyau, restaure l'expression de TCL1A et prévient l'apoptose de ces mêmes cellules (Kuraishy et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'expression de TCL1A dépend largement de la stimulation du BCR et du CD40. Sa répression induite dans les CG est dépendante dans une certaine mesure de la phosphorylation de CRTC2, avec une signalisation qui implique l'AMPc.

## C. Le rôle de TCL1A dans la survie des lymphocytes B

### 1) PI3K-Akt dans la survie des LB

La voie de signalisation PI3K-Akt a de nombreuses fonctions dans les LB, notamment de favoriser leur survie par le biais de plusieurs facteurs de transcription. Akt assure d'abord la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, inhibant sa liaison et l'inactivation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, induisant un signal de survie (Dijkers et al., 2000). Akt agit également directement sur la survie en régulant l'activité des facteurs de transcription de la famille Forkhead, FOXO1, FOXO3a et FOXO4 (Brunet et al., 1999; Burgering & Kops, 2002; Kane et al., 1999). Ces facteurs sont impliqués au niveau des cellules hématopoïétiques dans les signaux pro-apoptotiques en induisant l'expression des protéines Bim et Fas-L. Leur phosphorylation directe par Akt conduit à leur rétention cytoplasmique et à leur inactivation (Brunet et al., 1999; Burgering & Kops, 2002; Paik et al., 2007). Akt agit également sur la voie NF- $\kappa$ B en phosphorylant la kinase I $\kappa$ B, ce qui entraîne l'activation et la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau (Kane et al., 1999; Ozes et al., 1999; Romashkova & Makarov, 1999) et la transcription de facteurs anti-apoptotiques, notamment des protéines A-1 et Bcl-xl de la famille Bcl-2 (Dolcet et al., 2005). Les multiples voies de signalisation pro-

survie et la coactivation de TCL1A sur Akt peuvent expliquer en partie l'impact de la surexpression de TCL1A dans l'oncogenèse des LB (Fulda, 2014; Virgilio et al., 1994; Yuille et al., 2001). Enfin Akt a été caractérisé comme induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 après stimulation par l'IL-3, par une transcription dépendante de CREB (Du & Montminy, 1998; J.-M. Wang et al., 1999), et en inhibant la dégradation de Mcl-1 par l'inhibition de la *Glycogen Synthase Kinase-3* (GSK-3), une enzyme également impliquée dans le métabolisme du glucose et le cycle cellulaire (Maurer et al., 2006).

## 2) TCL1A permet l'expression de Mcl-1 et la survie des LB naïfs par une signalisation BCR dépendante

L'équipe de Tabrizi *et al.* s'est intéressée au rôle de la signalisation du BCR dans l'apoptose des LB naïfs et mémoires. Après 2 jours de culture sans stimulation, les deux populations se dirigent vers une apoptose spontanée. La stimulation du BCR sauve les LB naïfs mais accroît l'apoptose des LB mémoires. Après stimulation du BCR des LB naïfs, ils détectent une augmentation du niveau d'ARNm de TCL1A et de Mcl-1 qui restent inchangés dans les LB mémoires. Au contraire, dans les LB mémoires, la stimulation du BCR induit l'expression de la galectine-1 qui induit l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim en inhibant Akt. L'expression de *TCL1A* dans les LB mémoires à l'aide d'un transgène permet l'expression de Mcl-1 et la protection des LB mémoires vis-à-vis de l'apoptose (Tabrizi et al., 2009). Ce résultat indique que la survie des LB naïfs permise par Mcl-1 est dépendante de l'expression de la protéine TCL1A et nécessite une stimulation du BCR. Ce rôle de TCL1A sur la survie des LB naïfs est cohérent avec leur proportion accrue chez les TOL. Les cibles communes des voies PI3K et PLC $\gamma$ 2 comme p85-p70 S6 kinase et p65 NF- $\kappa$ B sont activées de manière similaire dans les deux populations de LB, mais le flux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et la phosphorylation des MAP kinases ERK et JNK est plus prononcés dans les LB mémoires (Tabrizi et al., 2009). Ce résultat indique une signalisation distincte du BCR, réduite dans les LB naïfs par rapport aux LB mémoires, conduisant à l'expression de TCL1A et à la survie pour les premières et celle de la galectine-1 et à l'apoptose pour les secondes. Ces résultats font également écho à ceux de Nova-Lamperti *et al.* avec une signalisation du BCR et une phosphorylation d'ERK réduite dans les LB des TOL (Nova-Lamperti et al., 2017).

### 3) Renforcement de l'effet anti-apoptotique de la voie NF- $\kappa$ B

L'équipe de Perkarsky *et al.* a été la première à caractériser l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par TCL1A indépendamment d'Akt (Yuri Pekarsky et al., 2008). En effet, TCL1A interagit avec I $\kappa$ B $\alpha$ , participant au complexe I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B et permettant la séquestration et l'inactivation de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme (Hayden & Ghosh, 2008; Ropars et al., 2009). TCL1A interagit également avec ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), une protéine kinase activée lors de la génération de cassures d'ADN (Kastan & Bartek, 2004). Dans un modèle murin E $\mu$ -TCL1A, la surexpression de TCL1A entraîne une augmentation d'expression d'ATM, une protéine connue comme suppresseur de tumeur. Pendant la maturation des LB dans les GC, ATM est impliquée dans la suppression de l'expression de TCL1A lors du processus de réparation de l'ADN (Gaudio et al., 2012; M. H. Sherman et al., 2010). Dans les souris E $\mu$ -TCL1A, la hausse d'ATM est également associée à la diminution d'I $\kappa$ B, ce qui pourrait résulter de la phosphorylation d'I $\kappa$ B par ATM (Gaudio et al., 2012). ATM inhibe également l'apoptose dans la leucémie myéloïde aigue et le syndrome myélodysplasique en augmentant la dégradation d'I $\kappa$ B, favorisant ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B (Grosjean-Raillard et al., 2009). L'interaction de TCL1A avec I $\kappa$ B $\alpha$  et ATM pourrait augmenter la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  médiée par ATM, ce qui pourrait expliquer en partie l'activation de NF- $\kappa$ B indépendamment d'Akt, ce qui renforce encore son impact sur la survie des LB (Gaudio et al., 2012).

## D. TCL1A dans la différenciation des lymphocytes B

### 1) Implication de TCL1A dans l'expression de facteurs de différenciation plasmocytaires

L'expression d'AID est essentielle pour la commutation de classe (CSR) et l'hypermutation somatique (SHM) des Ig dans les LB (Muramatsu, Kazuo, et al., 2000). IRF4 et BLIMP1, sont deux protéines majeures impliquées dans la différenciation des LB en plasmablastes et en plasmocytes, qui régulent toutes deux l'expression de XBP-1, une autre protéine impliquée dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique et dans la sécrétion d'Ig par les LB (Klein et al., 2003; Minnich et al., 2016; Shaffer et al., 2004). XBP-1 est aussi impliqué dans la signalisation du BCR et peut induire l'expression d'AID (Hu et al., 2009). Une forte activation de la voie PI3K-Akt dans les LB favorise leur différenciation précoce en cellules sécrétrices d'anticorps sans commutation de classe (Omori et al., 2006; Setz et al., 2018). Cette différenciation est influencée par l'activation d'Akt, qui induit l'expression de BLIMP1, agissant

comme un répresseur d'AID (Omori et al., 2006; Setz et al., 2018). Akt agit également en inactivant FOXO1, un facteur de transcription d'AID (Omori et al., 2006), et en induisant l'inhibition de la protéine ID2 qui inactive à son tour le facteur de transcription d'AID PAX5 (Belletti et al., 2001; Gonda et al., 2003; Medvedovic et al., 2011). En utilisant le modèle de souris transgénique E $\mu$ -TCL1A et une stimulation au LPS de 3 jours, Kriss *et al.* ont montré que les cellules CD5<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> de souris âgées de 2 mois surexprimant TCL1A augmentent leur expression de XBP-1, PAX5 et AID (Kriss et al., 2012). Cette augmentation est en accord avec l'augmentation de l'expression du gène *Aicda*, codant pour la protéine AID précédemment identifiée dans les souris E $\mu$ -TCL1A (Shen et al., 2006). A 2 mois ces souris présentent une expression réduite d'IRF4 et de BLIMP-1 par rapport aux souris contrôles sauvages (ou wild Type (WT)). Après 8 mois, ces souris développent un phénotype oncogène de cellules B CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> avec une expression ectopique de PAX5 et une augmentation importante de l'expression d'IRF4 et de BLIM-1 par rapport aux souris WT. Cependant, malgré ce profil d'expression, ces souris n'acquièrent pas un phénotype de LB CD138<sup>+</sup>, suggérant un défaut tardif de leur différenciation. Ces cellules présentent en outre une expression accrue de XBP-1 et d'AID par rapport aux cellules B CD5<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>. De façon surprenante, après 8 mois, ces cellules B CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> présentent une réduction substantielle de l'expression d'Akt, avec une signalisation altérée du BCR devenant constitutivement actif, avec une phosphorylation de CD79A sans stimulation du BCR (Kriss et al., 2012). Ce dérèglement du BCR est cohérent avec les mécanismes d'oncogenèse médiés par TCL1A (Herling et al., 2009; Yan et al., 2006). Ce résultat peut être lié à la surexpression de XBP-1, puisque l'absence de XBP-1 est associée à un défaut de signalisation du BCR avec une réduction de la phosphorylation de CD79A, CD79B et Syk (Hu et al., 2009). En plus d'augmenter l'expression de XBP-1, TCL1A pourrait interagir directement avec XBP-1 renforçant son rôle dans le développement de B-CLL (Kriss et al., 2012). Ainsi le développement de B-CLL médié par TCL1A commence par une augmentation de l'expression de XBP-1 et d'AID, évoluant à 8 mois vers des cellules malignes avec une augmentation de l'expression d'IRF4 et de BLIMP1, associée à une réduction de l'expression d'Akt, ce qui peut indiquer d'autres voies pour TCL1A que la coactivation d'Akt dans l'oncogenèse (figure 10) (Kriss et al., 2012).

## 2) Rôle de TCL1A dans les centres germinatifs

Dans les GC, AID favorise la CSR et la SHM en générant des cassures d'ADN dans les cellules soumises à des taux élevés de prolifération (Muramatsu, Kazuo, et al., 2000). Les cassures double brin d'ADN réduisent l'association du facteur de transcription CRTC2 avec le promoteur de TCL1A et répriment l'expression de TCL1A (Kuraishy et al., 2007; M. H. Sherman et al., 2010). Ce processus repose sur l'activation par ATM de LKB1, une kinase médiant l'activation des protéines kinases activées par l'AMPc, y compris la kinase SIK, connue pour phosphoryler et inactiver CRTC2 (figure 10) (Kuraishy et al., 2007). CRTC2 induit l'expression de plusieurs gènes dans les GC, réprimés dans les LB post-GC, comprenant MYC et AID (Shaffer et al., 2004; M. H. Sherman et al., 2010), deux protéines surexprimées dans les souris TCL1A transgéniques (Kriss et al., 2012; Shen et al., 2006). L'inactivation de CRTC2 est nécessaire à la différenciation des plasmocytes CRTC2 car il inhibe l'expression de BLIMP-1 et favorise l'expression de facteurs de prolifération des LB tels que BCL6 (M. H. Sherman et al., 2010). Un effet similaire sur l'expression de BLIMP-1 a été identifié chez des souris  $E\mu$ -TCL1A CD5<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> de 2 mois (Kriss et al., 2012). Ces résultats confirment l'implication de TCL1A dans la prolifération des LB et soulignent la nécessité de sa répression pour permettre la différenciation des LB dans les GC.

## E. Lien entre TCL1A et l'IL-10

### 1) La voie PI3K-Akt impliquée dans l'expression d'IL-10

Dans les LB naïfs, la production d'IL-10 est initiée par la stimulation des TLR permettant ensuite une production robuste d'IL-10 par la stimulation du BCR et du CD40 (Lampropoulou et al., 2008; M. Matsumoto et al., 2011; Yanaba et al., 2009). L'expression d'IL-10 par stimulation du TLR4 nécessite la présence du BCR et de Syk conduisant notamment à l'activation d'Akt (Schweighoffer et al., 2017). L'ajout de l'inhibiteur de la PI3K LY290042 ou de triciribine qui inhibe Akt réduit significativement la production d'IL-10 dans les LB *in vitro*. Les souris déficientes en PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), un inhibiteur de la voie PI3K-Akt, présentent une proportion accrue de cellules B10 par rapport aux WT, associée à une hypersensibilité de contact significativement réduite et une proportion accrue de cellules T régulatrices dans les organes lymphoïdes (Matsushita et al., 2016). Ces données indiquent que la voie PI3K-Akt participe à l'expression d'IL-10 dans les LB et suggère que l'augmentation de l'expression de TCL1A pourrait favoriser le développement des cellules B10. Les mécanismes

par lesquels la voie PI3K-Akt peut promouvoir l'expression de l'IL-10 ne sont pas bien définis, car cette voie intervient sur de multiples facteurs connus pour moduler l'expression d'IL-10 dans les LB notamment STAT3, IRF4, NFAT ou C-Maf (Jin et al., 2013; M. Liu et al., 2018; M. Matsumoto et al., 2011, 2014). La kinase GSK3 inhibée directement par la voie PI3K-Akt (Maurer et al., 2006), a été identifiée comme impliquée dans le développement de phénotypes régulateurs dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques (Cheng et al., 2020; Hill et al., 2015). L'activité enzymatique de la GGTase est nécessaire pour une production d'IL-10 dépendante du TLR9 dans plusieurs populations de LB (Bibby et al., 2020). Cette signalisation du TLR9 est dépendante de la protéine Ras et implique la voie PI3K-Akt. L'inhibition de la GGTase réduit l'expression d'IL-10 et augmente l'activation de la GSK3, tandis que l'inhibition directe de GSK3 restaure l'expression d'IL-10 dans les LB. L'inhibition de la GSK3 diminue l'expression de BLIMP-1, identifié comme un facteur de transcription important de l'IL-10 dans les cellules B10 activées (figure 10) (Y. H. Wang et al., 2019). Il est intéressant de noter que le complexe CREB/CRTC2 impliqué dans l'expression de TCL1A dans les LB participe également à l'expression de l'IL-10 dans les cellules dendritiques en réponse au zymosan et à la production autocrine de prostaglandine E2 (Alvarez et al., 2009). CRTC3 a également été identifié comme un facteur de transcription de l'IL-10 dans les macrophages (Clark et al., 2012; MacKenzie et al., 2013).

## 2) La surexpression de TCL1A associée aux cellules B10

Dilillo *et al.* ont montré sur les échantillons de 52 patients atteints de B-CLL, que l'expression de TCL1A était positivement corrélée à celle de l'IL-10. En outre, l'expression de TCL1A est significativement plus élevée dans les cellules B-CLL IL-10<sup>+</sup> que dans les cellules B-CLL IL-10<sup>-</sup> des mêmes patients. La surexpression de TCL1A pourrait ainsi jouer un rôle dans l'expression d'IL-10 dans ces cellules (Dilillo et al., 2010). Ces mêmes auteurs ont étudié la production d'IL-10 dans les cellules B-CLL obtenues à partir de souris E $\mu$ -TCL1A. La majorité de ces cellules (50-90%) provenant de souris âgées de plus de 12 mois produisent de l'IL-10, alors que la proportion de LB IL-10<sup>+</sup> chez les souris WT au même âge n'augmente pas. *In vitro* ces cellules B-CLL ont des propriétés régulatrices, elles inhibent la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages en co-culture (Dilillo et al., 2010). Cependant, certaines souris E $\mu$ -TCL1A conservent en vieillissant des fréquences et un nombre absolu de LB IL-10<sup>+</sup> comparables aux WT, indiquant que l'expression de TCL1A seule n'est pas suffisante pour induire ce phénotype

B10 (Dilillo et al., 2010). Ces résultats indiquent qu'une expression persistante de TCL1A peut favoriser l'orientation des LB vers un phénotype régulateur par l'expression d'IL-10. Kriss *et al.* ont montré que les cellules CD5<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> de souris Eμ-TCL1A âgées de 2 mois et n'ayant pas encore développé un phénotype malin présentaient une expression réduite d'IRF4 et de BLIMP-1 par rapport à celles de souris WT après 3 jours de stimulation au LPS. En revanche, avec la même stimulation, les cellules CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> de souris âgées de 8 mois, correspondant au développement du phénotype B10 (Dilillo et al., 2010), présentent une expression accrue de ces deux facteurs de transcription par rapport aux souris WT, ce qui semble confirmer leur rôle dans l'expression d'IL-10. De manière surprenante, cette expression d'IL-10 pourrait être liée à la signalisation altérée du BCR constitutivement active et la diminution d'expression d'Akt. L'expression prolongée de TCL1A chez la souris est associée à une augmentation de l'expression d'IRF4, de BLIMP-1 et d'IL-10, selon un mécanisme qui ne nécessite pas nécessairement Akt (Kriss et al., 2012).

### 3) Rôle de l'inhibition de PTPROt par TCL1A sur l'expression d'IL-10

TCL1A interagit physiquement avec plusieurs facteurs du complexe transcriptionnel AP-1, notamment c-Jun et c-Fos, et agit comme un inhibiteur du complexe AP-1 (Yuri Pekarsky et al., 2008). Par ce mécanisme, TCL1A inhibe aussi l'expression de la protéine PTPROt (*truncated receptor-type protein tyrosine phosphatase*), une phosphatase exprimée dans les LB naïfs et agissant comme suppresseur de tumeur dans les souris Eμ-TCL1A en régulant le signalisation du BCR par modulation de l'activité des kinases associées au BCR, Lyn, Syk et ZAP70 (Aguilar et al., 1999; Chen et al., 2006; Motiwala et al., 2010, 2011) (figure 10). Une équipe a étudié l'effet de l'inhibition de PTPROt dans les LB des souris Eμ-TCL1A en inactivant un seul allèle de PTPROt (knock-out hétérozygote [HET]) ou deux (knock-out homozygote [ROKO]) chez des souris WT et Eμ-TCL1A (Wakim et al., 2017). De façon surprenante, la production d'IL-10 est accrue dans les LB des souris HET/Eμ-TCL1A et encore plus élevée chez les souris ROKO/Eμ-TCL1A par rapport aux souris WT/Eμ-TCL1A, suggérant que PTPROt inhibe l'expression d'IL-10. Dans les cellules tumorales, une expression plus élevée d'IL-10R1 a été observée chez les souris HET et ROKO/Eμ-TCL1A, ce qui est cohérent avec une phosphorylation plus élevée de STAT3 activé par le récepteur de l'IL-10 (Wakim et al., 2017). De plus amples études sont nécessaires pour comprendre comment l'expression de PTPROt peut influencer celle de l'IL-

10, mais elle peut avoir un lien avec l'expression accrue d'IL-10 trouvée chez les souris Eμ-TCL1A qui pourrait en partie résulter de la répression de PTPROt par TCL1A (Dilillo et al., 2010).

Ainsi nous constatons que TCL1A pourrait participer à l'augmentation de la proportion de LB immatures observée chez les patients TOL, compte tenu de ses effets sur la survie, la prolifération et la croissance des LB. Dans les LB immatures des patients TOL, TCL1A pourrait favoriser l'émergence d'un phénotype régulateur par l'expression d'IL-10, par un mécanisme qui reste à déterminer, mais cohérent avec l'augmentation de LB immatures producteurs d'IL-10 chez ces patients. Toutefois, la surexpression de TCL1A dans les LB des patients TOL peut également résulter d'une augmentation indépendante des LB immatures et naïfs, connus pour exprimer cette protéine.

## IV. Objectifs

La compréhension des mécanismes immunologiques après transplantation a permis des avancées dans les traitements et la prise en charge des patients transplantés, résultant en une amélioration de la survie des greffons à court terme. Cependant, le besoin de réduire l'exposition aux IS des patients à plus long terme et la survenue de rejets chronique humoraux sans traitements permettant de les prévenir impliquent le besoin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la stabilité des greffons à long terme, notamment pour les patients sous IS (LTT) et sans IS (TOL). Ainsi, ces travaux permettraient de mettre au point des biomarqueurs afin d'identifier les patients transplantés qui pourraient bénéficier d'un arrêt des traitements IS et assurer un meilleur suivi des LTT. L'objectif de ce travail est donc une amélioration de la compréhension des mécanismes allo-immuns chez les patients transplantés à long terme incluant les patients TOL.

Dans ce sens, nous avons vu que les patients tolérants présentaient un profil spécifique de LB associé à une expression augmentée du gène *TCL1A*. Son profil d'expression chez les patients transplantés rénaux suggère l'implication de TCL1A dans leur réponse allo-immune et nous savons également que TCL1A est un acteur moléculaire majeur dans l'homéostasie des LB. Par un phénotypage exhaustif par cytométrie spectrale des PBMC de patients tolérants et de patients transplantés sous traitements IS présentant également une longue période de stabilité de leur greffon, nous allons déterminer si l'expression de TCL1A dans les LB des patients tolérants représente un facteur nécessaire à l'acquisition de la tolérance et de ses



propriétés. Nous étudierons également les caractéristiques du système immunitaire associées à une stabilité du greffon à long terme et l'influence des traitements IS dans ce contexte, qui pourrait permettre l'identification de biomarqueurs associés à un faible risque de rejet et à une stabilité du greffon à long terme.

## V. Références

- Aarbakke, J., Janka-Schaub, G., & Eliou, G. B. (1997). Thiopurine biology and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, *18*(1), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(96\)01007-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(96)01007-3)
- Aggarwal, M., Villuendas, R., Gomez, G., Rodriguez-Pinilla, S. M., Sanchez-Beato, M., Alvarez, D., Martinez, N., Rodriguez, A., Castillo, M. E., Camacho, F. I., Montes-Moreno, S., Garcia-Marco, J. A., Kimby, E., Pisano, D. G., & Piris, M. A. (2009). TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Modern Pathology*, *22*(2), 206–215. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.148>
- Aguiar, R. C. T., Yakushijin, Y., Kharbanda, S., Tiwari, S., Freeman, G. J., & Shipp, M. A. (1999). PTPROT: An alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood*, *94*(7), 2403–2413. [https://doi.org/10.1182/blood.v94.7.2403.419k39\\_2403\\_2413](https://doi.org/10.1182/blood.v94.7.2403.419k39_2403_2413)
- Akkaya, M., Traba, J., Roesler, A. S., Miozzo, P., Akkaya, B., Theall, B. P., Sohn, H., Pena, M., Smelkinson, M., Kabat, J., Dahlstrom, E., Dorward, D. W., Skinner, J., Sack, M. N., & Pierce, S. K. (2018). Second signals rescue B-cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nature Immunology*, *19*(8), 871–884. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0156-5>
- Al-Lamki, R. S., Wang, J., Skepper, J. N., Thiru, S., Pober, J. S., & Bradley, J. R. (2001). Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Laboratory Investigation*, *81*(11), 1503–1515. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780364>
- Al Najjar, A., Etienne, I., Le Pogamp, P., Bridoux, F., Le Meur, Y., Toupance, O., Mousson, C., Caillard, S., de Ligny, B. H., Marlière, J. F., & Lebranchu, Y. (2006). Long-Term Results of Monoclonal Anti-IL2-Receptor Antibody Versus Polyclonal Antilymphocyte Antibodies as Induction Therapy in Renal Transplantation. *Transplantation Proceedings*, *38*(7), 2298–2299. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.06.133>
- Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., & Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology*, *5*(9), 943–952. <https://doi.org/10.1038/ni1100>
- Allen, C. D. C., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, *27*(2), 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>
- Allende, M. L., Tuymetova, G., Lee, B. G., Bonifacio, E., Wu, Y. P., & Proia, R. L. (2010). S1P1 receptor directs the release of immature B-cells from bone marrow into blood. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(5), 1113–1124. <https://doi.org/10.1084/jem.20092210>
- Allison, A. C. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*, *14*(SUPPL. 1), 2–8. <https://doi.org/10.1177/096120330501400102>
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R. R., Selvaggi, T., Kehry, M. R., & Staudt, L. M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood*, *87*(12), 5257–5268. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.12.5257.bloodjournal87125257>
- Althaf, M. M., Kossi, M. El, Jin, J. K., Sharma, A., & Halawa, A. M. (2017). Human leukocyte antigen typing and crossmatch: A comprehensive review. *World Journal of Transplantation World J Transplant*, *7*(6), 339–348.
- Alvarez, Y., Municio, C., Alonso, S., Sánchez Crespo, M., & Fernández, N. (2009). The Induction of IL-10 by Zymosan in Dendritic

- Cells Depends on CREB Activation by the Coactivators CREB-Binding Protein and TORC2 and Autocrine PGE 2 . *The Journal of Immunology*, 183(2), 1471–1479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900312>
- Amlot, P. L., & Hayes, A. E. (1985). Impaired human antibody response to the thymus-independent antigen, DNP-Ficoll, after splenectomy. Implications for post-splenectomy infections. *Lancet (London, England)*, 1(8436), 1008–1011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)91613-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)91613-7)
- Andrews, S. F., Zhang, Q., Lim, S., Li, L., Lee, J. H., Zheng, N. Y., Huang, M., Taylor, W. M., Farris, A. D., Ni, D., Meng, W., Luning Prak, E. T., & Wilson, P. C. (2013). Global analysis of B-cell selection using an immunoglobulin light chain-mediated model of autoreactivity. *Journal of Experimental Medicine*, 210(1), 125–142. <https://doi.org/10.1084/jem.20120525>
- Anglicheau, D., Tinel, C., Canaud, G., Loupy, A., Zuber, J., Delville, M., Rabaté, C., Scemla, A., Snanoudj, R., Sberro-Soussan, R., Mamzer-Bruneel, M. F., Bererhi, L., Martinez, F., Timsit, M. O., Rabant, M., Correas, J. M., Bienaimé, F., Duong, J. P., Hélénon, O., ... Legendre, C. (2019). Renal transplantation: Procedure and early follow-up. *Nephrologie et Thérapeutique*, 15(6), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2019.09.001>
- Anstey, A., & Lear, J. T. (1998). Azathioprine: Clinical pharmacology and current indications in autoimmune disorders. *BioDrugs*, 9(1), 33–47. <https://doi.org/10.2165/00063030-199809010-00004>
- Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L., & Cyster, J. G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature*, 493(7434), 684–688. <https://doi.org/10.1038/nature11738>
- Auguin, D., Barthe, P., Royer, C., Stern, M. H., Noguchi, M., Arold, S. T., & Roumestand, C. (2004). Structural basis for the co-activation of protein kinase B by T-cell leukemia-1 (TCL1) family proto-oncoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35890–35902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400364200>
- Austin, J. W., Buckner, C. M., Kardava, L., Wang, W., Zhang, X., Melson, V. A., Swanson, R. G., Martins, A. J., Zhou, J. Q., Hoehn, K. B., Nicholas Fisk, J., Dimopoulos, Y., Chasiakos, A., O'Dell, S., Smelkinson, M. G., Seamon, C. A., Kwan, R. W., Sneller, M. C., Pittaluga, S., ... Moir, S. (2019). Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B-cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Science Translational Medicine*, 11(520), 10–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax0904>
- Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., & Tangye, S. G. (2008). IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B-cells Is Differentially Regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*, 181(3), 1767–1779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1767>
- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., & Kearney, J. F. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B-cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, 17(3), 341–352. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00389-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00389-8)
- Ballet, C., Roussey-Kesler, G., Aubin, J. T., Brouard, S., Giral, M., Miqueu, P., Louis, S., Van Der Werf, S., & Souillou, J. P. (2006). Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *American Journal of Transplantation*, 6(11), 2796–2801. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01533.x>
- Bankovich, A. J., Raunser, S., Juo, Z. S., Walz, T., Davis, M. M., & Garcia, K. C. (2007). Structural insight into pre-B-cell receptor function. *Science*, 316(5822), 291–294. <https://doi.org/10.1126/science.1139412>
- Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D. C., An, J., Nagasawa, T., & Cyster, J. G. (2013). Germinal center centroblasts transition

- to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity*, 39(5), 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.038>
- Bannish, G., Fuentes-Pananá, E. M., Cambier, J. C., Pear, W. S., & Monroe, J. G. (2001). Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, 194(11), 1583–1596. <https://doi.org/10.1084/jem.194.11.1583>
- Baron, D., Ramstein, G., Chesneau, M., Echasseriau, Y., Pallier, A., Paul, C., Degauque, N., Hernandez-Fuentes, M. P., Sanchez-Fueyo, A., Newell, K. A., Giral, M., Souillou, J. P., Houlgatte, R., & Brouard, S. (2015). A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney International*, 87(5), 984–995. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.395>
- Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G. A., Tu, Y., Califano, A., Cattoretti, G., & Dalla-Favera, R. (2004). Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*, 104(13), 4088–4096. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4291>
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 11(1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/nri2901>
- Bauquet, A. T., Jin, H., Paterson, A. M., Mitsdoerffer, M., Ho, I. C., Sharpe, A. H., & Kuchroo, V. K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature Immunology*, 10(2), 167–175. <https://doi.org/10.1038/ni.1690>
- Belletti, B., Prisco, M., Morrione, A., Valentini, B., Navarro, M., & Baserga, R. (2001). Regulation of Id2 Gene Expression by the Insulin-like Growth Factor I Receptor Requires Signaling by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13867–13874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010509200>
- Bemark, M. (2015). Translating transitions - How to decipher peripheral human B-cell development. *Journal of Biomedical Research*, 29(4), 264–284. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20150035>
- Benítez, C., Londoño, M. C., Miquel, R., Manzia, T. M., Abrales, J. G., Lozano, J. J., Martínez-Llordella, M., López, M., Angelico, R., Bohne, F., Sese, P., Daoud, F., Larcier, P., Roelen, D. L., Claas, F., Whitehouse, G., Lerut, J., Pirenne, J., Rimola, A., ... Sánchez-Fueyo, A. (2013). Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*, 58(5), 1824–1835. <https://doi.org/10.1002/hep.26426>
- Benzaquen, L. R., Nicholson-Weller, A., & Halperin, J. A. (1994). Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 179(3), 985–992. <https://doi.org/10.1084/jem.179.3.985>
- Bestard, O., Meneghini, M., Crespo, E., Bemelman, F., Koch, M., Volk, H. D., Viklicky, O., Giral, M., Banas, B., Ruiz, J. C., Melilli, E., Hu, L., van Duivenvoorden, R., Nashan, B., Thaïss, F., Otto, N. M., Bold, G., Stein, M., Sefrin, A., ... Grinyó, J. M. (2021). Preformed T cell alloimmunity and HLA eplet mismatch to guide immunosuppression minimization with tacrolimus monotherapy in kidney transplantation: Results of the CELLIMIN trial. *American Journal of Transplantation*, 21(8), 2833–2845. <https://doi.org/10.1111/ajt.16563>
- Bestard, O., Thauinat, O., Bellini, M. I., Böhmig, G. A., Budde, K., Claas, F., Couzi, L., Furian, L., Heemann, U., Mamode, N., Oberbauer, R., Pengel, L., Schneeberger, S., & Naesens, M. (2022). Alloimmune Risk Stratification for Kidney Transplant Rejection. *Transplant International*, 35(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/ti.2022.10138>

- Beverley, P. C. L. (2008). Primer: Making sense of T-cell memory. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4(1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0671>
- Bhaskaran, M. C., Heidt, S., & Muthukumar, T. (2022). Principles of Virtual Crossmatch Testing for Kidney Transplantation. *Kidney International Reports*, 7(6), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.03.006>
- Bibby, J. A., Purvis, H. A., Hayday, T., Chandra, A., Okkenhaug, K., Rosenzweig, S., Aksentijevich, I., Wood, M., Lachmann, H. J., Kemper, C., Cope, A. P., & Perucha, E. (2020). Cholesterol metabolism drives regulatory B-cell IL-10 through provision of geranylgeranyl pyrophosphate. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17179-4>
- Bichi, R., Shinton, S. A., Martin, E. S., Koval, A., Calin, G. A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R. R., & Croce, C. M. (2002). Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6955–6960. <https://doi.org/10.1073/pnas.102181599>
- Billingham, R. E., Brent, L., & Medawar, P. B. (1953). Actively acquired immunological tolerance of foreign cells. *Nature*, 172(4379), 603–606.
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B-cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, 32(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Böhmig, G. A., Wahrmann, M., Eskandary, F., & Rostaing, L. (2018). Novel Approaches to Block Complement. *Transplantation*, 102(11), 1837–1843. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002267>
- Boller, S., & Grosschedl, R. (2014). The regulatory network of B-cell differentiation: A focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunological Reviews*, 261(1), 102–115. <https://doi.org/10.1111/imr.12206>
- Bonsib, S. M., Abul-Ezz, S. R., Ahmad, I., Young, S. M., Ellis, E. N., Schneider, D. L., & Walker, P. D. (2000). Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney International*, 58(5), 2206–2214. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00395.x>
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., & Stähelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents and Actions*, 6(4), 468–475. <https://doi.org/10.1007/BF01973261>
- Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L., & Crabtree, G. R. (1993). Identification of the Immunophilins Capable of Mediating Inhibition of Signal Transduction by Cyclosporin A and FK506: Roles of Calcineurin Binding and Cellular Location. *Molecular and Cellular Biology*, 13(8), 4760–4769. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.8.4760-4769.1993>
- Branco, J. C., Morbey, A., Martins, A., & Barroso, E. (2018). Tolerance After Liver Transplantation: Where Are We? *Liver Transplantation*, 24(9), 1303–1304. <https://doi.org/10.1002/lt.25294>
- Brar, J. E., & Nader, N. D. (2014). Immune minimization strategies in renal transplantation. *Immunological Investigations*, 43(8), 807–818. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.937492>
- Braud, C., Baeten, D., Giral, M., Pallier, A., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Chevalier, C., Lebars, A., Léger, J., Moreau, A., Pechkova, E., Nicolini, C., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), 1681–1692. <https://doi.org/10.1002/jcb.21574>
- Braudeau, C., Ashton-Chess, J., Giral, M., Dugast, E., Louis, S., Pallier, A., Braud, C., Moreau, A., Renaudin, K., Souillou, J. P., &

- Brouard, S. (2008). Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*, *86*(1), 130–136. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31817b8dc5>
- Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2007). Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant International*, *20*(10), 845–855. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x>
- Braza, F., Dugast, E., Panov, I., Paul, C., Vogt, K., Pallier, A., Chesneau, M., Baron, D., Guerif, P., Lei, H., Laplaud, D. A., Volk, H. D., Degauque, N., Giral, M., Souillou, J. P., Sawitzki, B., & Brouard, S. (2015). Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(8), 1795–1805. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014050480>
- Brinas, F., Danger, R., & Brouard, S. (2021). Tcl1a, B-cell regulation and tolerance in renal transplantation. *Cells*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/cells10061367>
- Brouard, S., Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A., Guillot-Guegen, C., Ashton-Chess, J., Le Roux, S., Harb, J., Roussey, G., Subra, J. F., Villemain, F., Legendre, C., Bemelman, F. J., Orlando, G., Garnier, A., Jambon, H., ... Giral, M. (2012). The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *American Journal of Transplantation*, *12*(12), 3296–3307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04249.x>
- Brouard, Sophie, Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S. C., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., Dupont, A., Pallier, A., Moreau, A., Louis, S., Ruiz, C., Salvatierra, O., Souillou, J. P., & Sarwal, M. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(39), 15448–15453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705834104>
- Brown, K., Sacks, S. H., & Wong, W. (2011). Coexpression of donor peptide/recipient MHC complex and intact donor MHC: Evidence for a link between the direct and indirect pathways. *American Journal of Transplantation*, *11*(4), 826–831. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03437.x>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, *96*(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Buchman, A. L. (2001). Side effects of corticosteroid therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *33*(4), 289–294. <https://doi.org/10.1097/00004836-200110000-00006>
- Bunnapradist, S., & Takemoto, S. K. (2005). Multivariate analysis of antibody induction therapy and their associated outcomes in deceased donor transplants. *Transplantation Proceedings*, *37*(2), 889–891. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.12.080>
- Burgering, B. M. T., & Kops, G. J. P. L. (2002). Cell cycle and death control: Long live Forkheads. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(7), 352–360. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02113-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02113-8)
- Cai, J., & Terasaki, P. I. (2010). Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: An analysis of United Network for organ sharing registry data. *Transplantation*, *90*(12), 1511–1515.

<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fecfcb>

- Canaud, G., Audard, V., Kofman, T., Lang, P., Legendre, C., & Grimbert, P. (2012). Recurrence from primary and secondary glomerulopathy after renal transplant. *Transplant International*, *25*(8), 812–824. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2012.01483.x>
- Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G. M., Bos, N. A., Johnsen, H. E., & Orfao, A. (2010). Circulating human b and plasma cells. age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica*, *95*(6), 1016–1020. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.018689>
- Carsetti, R., Terreri, S., Conti, M. G., Fernandez Salinas, A., Corrente, F., Capponi, C., Albano, C., & Piano Mortari, E. (2022). Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. *Cytometry Part A*, *101*(2), 131–139. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24507>
- Cashman, K. S., Jenks, S. A., Woodruff, M. C., Tomar, D., Tipton, C. M., Scharer, C. D., Eun-Hyung Lee, F., Boss, J. M., & Sanz, I. (2019). Understanding and measuring human B-cell tolerance and its breakdown in autoimmune disease. *Immunological Reviews*, *292*(1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12820>
- Cassese, G., Arce, S., Hauser, A. E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., & Manz, R. A. (2003). Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *The Journal of Immunology*, *171*(4), 1684–1690. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1684>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The major histocompatibility complex and its functions. In G. Science (Ed.), *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/books/NBK27156/>
- Charmetant, X., Chen, C. C., Hamada, S., Goncalves, D., Saison, C., Rabeyrin, M., Rabant, M., van Huyen, J. P. D., Koenig, A., Mathias, V., Barba, T., Lacaille, F., le Pavec, J., Brugière, O., Taupin, J. L., Chalabreysse, L., Mornex, J. F., Couzi, L., Graff-Dubois, S., ... Thauinat, O. (2022). Inverted direct allorecognition triggers early donor-specific antibody responses after transplantation. *Science Translational Medicine*, *14*(663). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg1046>
- Charpentier, B., Medina Pestana, J. O., Del, M., Rostaing, L., Grinyó, J., Vanrenterghem, Y., Matas, A., Zhang, R., Mühlbacher, F., Pupim, L., & Florman, S. (2013). Long-term exposure to belatacept in recipients of extended criteria donor kidneys. *American Journal of Transplantation*, *13*(11), 2884–2891. <https://doi.org/10.1111/ajt.12459>
- Chen, L., Juszczynski, P., Takeyama, K., Aguiar, R. C. T., & Shipp, M. A. (2006). Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood*, *108*(10), 3428–3433. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-013821>
- Cheng, H., Wang, L., Yang, B., Li, D., Wang, X., Liu, X., Tian, N., Huang, Q., Feng, R., Wang, Z., Liang, R., Dai, S.-M., Lv, L., Wu, J., Zang, Y.-S., & Li, B. (2020). Cutting Edge: Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity Induces the Generation and Enhanced Suppressive Function of Human IL-10 + FOXP3 + –Induced Regulatory T Cells . *The Journal of Immunology*, *205*(6), 1497–1502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000136>
- Chenouard, A., Chesneau, M., Bui Nguyen, L., Le Bot, S., Cadoux, M., Dugast, E., Paul, C., Malard-Castagnet, S., Ville, S., Guérif, P., Soullillou, J. P., Degauque, N., Danger, R., Giral, M., & Brouard, S. (2017). Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B-cell Help. *American Journal of Transplantation*, *17*(6), 1490–1501. <https://doi.org/10.1111/ajt.14142>

- Cherukuri, Anu, Cheng, P. C., & Pierce, S. K. (2001). The Role of the CD19/CD21 Complex in B-cell Processing and Presentation of Complement-Tagged Antigens. *The Journal of Immunology*, 167(1), 163–172. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.163>
- Cherukuri, Aravind, Mehta, R., Sharma, A., Sood, P., Zeevi, A., Tevar, A. D., Rothstein, D. M., & Hariharan, S. (2019). Post-transplant donor specific antibody is associated with poor kidney transplant outcomes only when combined with both T-cell-mediated rejection and non-adherence. *Kidney International*, 96(1), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.01.033>
- Cherukuri, Aravind, Rothstein, D. M., Clark, B., Carter, C. R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., Hewitt, E., Salama, A. D., & Baker, R. J. (2014). Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- $\alpha$  expression ratio in regulatory B-cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1575–1585. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080837>
- Cherukuri, Aravind, Salama, A. D., Mehta, R., Mohib, K., Zheng, L., Magee, C., Harber, M., Stauss, H., Baker, R. J., Tevar, A., Landsittel, D., Lakkis, F. G., Hariharan, S., & Rothstein, D. M. (2021). Transitional B-cell cytokines predict renal allograft outcomes. *Science Translational Medicine*, 13(582). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe4929>
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D. A., Degauque, N., Soullillou, J. P., Tarte, K., & Brouard, S. (2014). Unique B-cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 14(1), 144–155. <https://doi.org/10.1111/ajt.12508>
- Chesneau, Mélanie, Mai, H. Le, Danger, R., Le Bot, S., Nguyen, T.-V.-H., Bernard, J., Poullaouec, C., Guerrif, P., Conchon, S., Giral, M., Charreau, B., Degauque, N., & Brouard, S. (2020). Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B-cells with Potent Regulatory Properties. *The Journal of Immunology*, 205(9), 2391–2401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000335>
- Chesneau, Mélanie, Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A., Soullillou, J.-P., Giral, M., Degauque, N., Chiffolleau, E., & Brouard, S. (2015). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B-cells with Regulatory Properties. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(10), 2588–2598. <https://doi.org/10.1681/asn.2014040404>
- Chevallier, E., Jouve, T., Rostaing, L., Malvezzi, P., & Noble, J. (2021). pre-existing diabetes and PTDM in kidney transplant recipients: how to handle immunosuppression. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 14(1), 55–66. <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1851596>
- Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Johnston, R. J., Monticelli, L., Lao, C., & Crotty, S. (2011). ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity*, 34(6), 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.023>
- Christakoudi, S., Runglall, M., Mobillo, P., Rebollo-Mesa, I., Tsui, T. L., Nova-Lamperti, E., Taube, C., Norris, S., Kamra, Y., Hilton, R., Augustine, T., Bhandari, S., Baker, R., Berglund, D., Carr, S., Game, D., Griffin, S., Kalra, P. A., Lewis, R., ... Hernandez-Fuentes, M. P. (2020). Development and validation of the first consensus gene-expression signature of operational tolerance in kidney transplantation, incorporating adjustment for immunosuppressive drug therapy. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102899>



- Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., & Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B-cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology*, *9*(1), 54–62. <https://doi.org/10.1038/ni1542>
- Cippà, P. E., Schiesser, M., Ekberg, H., van Gelder, T., Mueller, N. J., Cao, C. A., Fehr, T., & Bernasconi, C. (2015). Risk stratification for rejection and infection after kidney transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(12), 2213–2220. <https://doi.org/10.2215/CJN.01790215>
- Clark, K., MacKenzie, K. F., Petkevicius, K., Kristariyanto, Y., Zhang, J., Choi, H. G., Peggie, M., Plater, L., Pedrioli, P. G. A., McIver, E., Gray, N. S., Arthur, J. S. C., & Cohen, P. (2012). Phosphorylation of CRT3 by the salt-inducible kinases controls the interconversion of classically activated and regulatory macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(42), 16986–16991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215450109>
- Clavien, P. A., Muller, X., de Oliveira, M. L., Dutkowski, P., & Sanchez-Fueyo, A. (2017). Can immunosuppression be stopped after liver transplantation? *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, *2*(7), 531–537. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30208-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30208-4)
- Clayton, P. A., McDonald, S. P., Chapman, J. R., & Chadban, S. J. (2012). Mycophenolate versus azathioprine for kidney transplantation: A 15-year follow-up of a randomized trial. *Transplantation*, *94*(2), 152–158. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31825475a3>
- Cockfield, S. M., Wilson, S., Campbell, P. M., Cantarovich, M., Gangji, A., Houde, I., Jevnikar, A. M., Keough-Ryan, T. M., Monroy-Cuadros, F. M., Nickerson, P. W., Pâquet, M. R., Ramesh Prasad, G. V., Sénécal, L., Shoker, A., Wolff, J. L., Howell, J., Schwartz, J. J., & Rush, D. N. (2019). Comparison of the effects of standard vs low-dose prolonged-release tacrolimus with or without ACEi/ARB on the histology and function of renal allografts. *American Journal of Transplantation*, *19*(6), 1730–1744. <https://doi.org/10.1111/ajt.15225>
- Coemans, M., Süsal, C., Döhler, B., Anglicheau, D., Giral, M., Bestard, O., Legendre, C., Emonds, M. P., Kuypers, D., Molenberghs, G., Verbeke, G., & Naesens, M. (2018). Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney International*, *94*(5), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.05.018>
- Collins, J. T., & Dunnick, W. A. (1999). Cutting edge: IFN-gamma regulated germline transcripts are expressed from gamma2a transgenes independently of the heavy chain 3' enhancers. *Journal of Immunology*, *163*(11), 5758–5762.
- Colvin, R. B., & Smith, R. N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews Immunology*, *5*(10), 807–817. <https://doi.org/10.1038/nri1702>
- Conkright, M. D., Canettieri, G., Sreaton, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J. B., & Montminy, M. (2003). TORCs: Transducers of regulated CREB activity. *Molecular Cell*, *12*(2), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.013>
- Cooper, J. E. (2020). Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *15*(3), 430–438. <https://doi.org/10.2215/CJN.11991019>
- Cornell, L. D., Smith, R. N., & Colvin, R. B. (2008). Kidney transplantation: Mechanisms of rejection and acceptance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *3*, 189–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508>
- Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P. A., & Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA

- ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair*, 6(6), 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.007>
- Crespo, E., Roedder, S., Sigdel, T., Hsieh, S. C., Luque, S., Cruzado, J. M., Tran, T. Q., Grinyó, J. M., Sarwal, M. M., & Bestard, O. (2017). Molecular & functional noninvasive immune monitoring in the ESCAPE study for prediction of subclinical renal allograft rejection. *Transplantation*, 101(6), 1400–1409. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001287>
- Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K., & Mescher, M. F. (1999). Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 162(6), 3256–3262. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.6.3256>
- Danger, R., Chesneau, M., Paul, C., Guérif, P., Durand, M., Newell, K. A., Kanaparthi, S., Turka, L. A., Souillou, J. P., Houlgatte, R., Giral, M., Ramstein, G., & Brouard, S. (2017). A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney International*, 91(6), 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.020>
- Danger, R., Le Berre, L., Cadoux, M., Kerleau, C., Papuchon, E., Mai, H. Le, Nguyen, T. V. H., Guérif, P., Morelon, E., Thauinat, O., Legendre, C., Anglicheau, D., Lefaucheur, C., Couzi, L., Del Bello, A., Kamar, N., Le Quintrec, M., Goutaudier, V., Renaudin, K., ... Zuber, J. (2023). Subclinical rejection-free diagnostic after kidney transplantation using blood gene expression. *Kidney International*, 103(6), 1167–1179. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.03.019>
- Danger, R., Pallier, A., Giral, M., Martínez-Llordella, M., Lozano, J. J., Degauque, N., Sanchez-Fueyo, A., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2012). Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(4), 597–606. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011060543>
- Dantal, J., & Souillou, J.-P. (2005). Immunosuppressive Drugs and the Risk of Cancer after Organ Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 352(13), 1371–1373. <https://doi.org/10.1056/nejme058018>
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A. R., Khanna, P., Peppas, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., Kennedy, P. T., Brunetto, M., Lampertico, P., Mauri, C., & Maini, M. K. (2012). IL-10–Producing Regulatory B-cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 189(8), 3925–3935. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103139>
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., & Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine Reviews*, 24(4), 488–522. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0006>
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., & Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, 276(5312), 589–592. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.589>
- Descatoire, M., Weill, J. C., Reynaud, C. A., & Weller, S. (2011). A human equivalent of mouse B-1 cells? *Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2563–2564. <https://doi.org/10.1084/jem.20112232>
- Descatoire, M., Weller, S., Irtan, S., Feuillard, J., Storck, S., Guiochon-Mantel, A., Bouligand, J., Morali, A., Cohen, J., Jacquemin, E., Iascone, M., Bole-Feysot, C., Cagnard, N., Weill, J. C., & Reynaud, C. A. (2014). Identification of a human splenic marginal zone B-cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *Journal of Experimental Medicine*, 211(5), 987–1000. <https://doi.org/10.1084/jem.20132203>

- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W. J., Koenderman, L., & Coffey, P. J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology*, *10*(19), 1201–1204. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00728-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00728-4)
- Dilillo, D. J., Matsushita, T., & Tedder, T. F. (2010). B10 cells and regulatory B-cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1183*(Table 1), 38–57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05137.x>
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, *446*(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
- Dragun, D., Catar, R., & Philippe, A. (2016). Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney International*, *90*(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.019>
- Du, K., & Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 32377–32379. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32377>
- Dudreuilh, C., Jarvis, P., Beadle, N., Pilecka, I., Shaw, O., Gardner, L., Scottà, C., Mamode, N., Game, D., Sanchez-Fueyo, A., Lombardi, G., Learoyd, A., Douiri, A., & Dorling, A. (2023). Can regulatory T cells improve outcomes of sensitised patients after HLA-Ab incompatible renal transplantation: study protocol for the Phase IIa GAMECHANgER-1 trial. *BMC Nephrology*, *24*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12882-023-03157-7>
- Dugast, E., Souillou, J. P., Foucher, Y., Papuchon, E., Guerif, P., Paul, C., Riochet, D., Chesneau, M., Cesbron, A., Renaudin, K., Dantal, J., Giral, M., & Brouard, S. (2016). Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, *16*(11), 3255–3261. <https://doi.org/10.1111/ajt.13946>
- Dugast, Emilie, David, G., Oger, R., Danger, R., Judor, J. P., Gagne, K., Chesneau, M., Degauque, N., Paul, P., Picard, C., Guerif, P., Conchon, S., Giral, M., Gervois, N., Retière, C., & Brouard, S. (2017). Broad impairment of natural killer cells from operationally tolerant kidney transplanted patients. *Frontiers in Immunology*, *8*(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01721>
- Duquesnoy, R. J. (2006). A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level. *Human Immunology*, *67*(11), 847–862. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.08.001>
- Durand, M., Dubois, F., Dejou, C., Durand, E., Danger, R., Chesneau, M., Brosseau, C., Guerif, P., Souillou, J. P., Degauque, N., Eliaou, J. F., Giral, M., Bonnefoy, N., & Brouard, S. (2018). Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance. *Kidney International*, *93*(5), 1154–1164. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.004>
- Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, *2*(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>
- Efanov, A., Zanesi, N., Nazaryan, N., Santanam, U., Palamarchuk, A., Croce, C. M., & Pekarsky, Y. (2010). CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCL1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation. *Leukemia*,

24(5), 970–975. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.46>

- Eid, L., Tuchman, S., & Moudgil, A. (2014). Late acute rejection: Incidence, risk factors, and effect on graft survival and function. *Pediatric Transplantation, 18*(2), 155–162. <https://doi.org/10.1111/petr.12203>
- Eisenbeis, C. F., Singh, H., & Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes and Development, 9*(11), 1377–1387. <https://doi.org/10.1101/gad.9.11.1377>
- Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, Š., Nashan, B., Gürkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyó, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloz, P., & Halloran, P. F. (2007). Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine, 357*(25), 2562–2575. <https://doi.org/10.1056/nejmoa067411>
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews, 229*(1), 152–172. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>
- Elhanati, Y., Sethna, Z., Marcou, Q., Callan, C. G., Mora, T., & Walczak, A. M. (2015). Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 370*(1676). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0243>
- Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A., Sing, Y., Spolski, R., Warren, J., Lipsky, P. E., Robbins, R., & Leonard, W. J. (2005). IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B-cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology, 175*(12), 7867–7879. <https://doi.org/doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7867> Related
- Fantus, D., Rogers, N. M., Grahmmer, F., Huber, T. B., & Thomson, A. W. (2016). Roles of mTOR complexes in the kidney: Implications for renal disease and transplantation. *Nature Reviews Nephrology, 12*(10), 587–609. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.108>
- Feucht, H. E., Schneeberger, H., Hillebrand, G., Burkhardt, K., Weiss, M., Riethmuller, G., Land, W., & Albert, E. (1993). Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney International, 43*(6), 1333–1338. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.187>
- Flechner, S. M., Glyda, M., Cockfield, S., Grinyó, J., Legendre, C., Russ, G., Steinberg, S., Wissing, K. M., & Tai, S. S. (2011). The ORION study: Comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *American Journal of Transplantation, 11*(8), 1633–1644. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03573.x>
- Fleming, G. M. (2011). Renal replacement therapy review: Past, present and future. *Organogenesis, 7*(1), 2–12. <https://doi.org/10.4161/org.7.1.13997>
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B-cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science Translational Medicine, 5*(173). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>
- French, S. W., Malone, C. S., Shen, R. R., Renard, M., Henson, S. E., Miner, M. D., Wall, R., & Teitell, M. A. (2003). Sp1 transactivation of the TCL1 oncogene. *Journal of Biological Chemistry, 278*(2), 948–955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207166200>
- Fulcher, D. A., & Basten, A. (1994). Reduced life span of anergic self-reactive B-cells in a double-transgenic model. *Journal of*

- Experimental Medicine*, 179(1), 125–134. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.125>
- Fulda, S. (2014). Synthetic lethality by co-targeting mitochondrial apoptosis and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Mitochondrion*, 19(Part A), 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.04.011>
- Galler, G. R., Mundt, C., Parker, M., Pelanda, R., Mårtensson, I. L., & Winkler, T. H. (2004). Surface  $\mu$  heavy chain signals down-regulation of the V(D)J-recombinase machinery in the absence of surrogate light chain components. *Journal of Experimental Medicine*, 199(11), 1523–1532. <https://doi.org/10.1084/jem.20031523>
- Gao, X., & Cockburn, I. A. (2022). The development and function of CD11c+ atypical B-cells - insights from single cell analysis. *Frontiers in Immunology*, 13(August), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.979060>
- Gatto, D., Wood, K., & Brink, R. (2011). EB12 Operates Independently of but in Cooperation with CXCR5 and CCR7 To Direct B-cell Migration and Organization in Follicles and the Germinal Center. *The Journal of Immunology*, 187(9), 4621–4628. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101542>
- Gaudio, E., Paduano, F., Ngankeu, A., Lovat, F., Fabbri, M., Sun, H. L., Gasparini, P., Efanov, A., Peng, Y., Zanesi, N., Shuaib, M. A., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Li, C., Aqeilan, R. I., Lesinski, G. B., Trapasso, F., & Croce, C. M. (2013). Heat shock protein 70 regulates Tcl1 expression in leukemia and lymphomas. *Blood*, 121(2), 351–359. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457374>
- Gaudio, E., Spizzo, R., Paduano, F., Luo, Z., Efanov, A., Palamarchuk, A., Leber, A. S., Kaou, M., Zanesi, N., Bottoni, A., Costinean, S., Rassenti, L. Z., Nakamura, T., Kipps, T. J., Aqeilan, R. I., Pekarsky, Y., Trapasso, F., & Croce, C. M. (2012). Tcl1 interacts with Atm and enhances NF- $\kappa$ B activation in hematologic malignancies. *Blood*, 119(1), 180–187. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374561>
- George, A. J. T. (2000). The Antibody Molecule. In *Methods in molecular medicine* (Vol. 40, pp. 1–21). Methods Mol Med. <https://doi.org/10.1385/1-59259-076-4:1>
- Gitlin, A. D., Mayer, C. T., Oliveira, T. Y., Shulman, Z., Jones, M. J. K., Koren, A., & Nussenzweig, M. C. (2015). T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B-cells. *Science*, 349(6248), 643–646. <https://doi.org/10.1126/science.aac4919>
- Golding, H., & Singer, A. (1984). Role of accessory cell processing and presentation of shed H-2 alloantigens in allospecific cytotoxic T lymphocyte responses. *The Journal of Immunology*, 133(2), 597–605. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.133.2.597>
- Gómez Román, V. R., Murray, J. C., & Weiner, L. M. (2014). Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394802-1.00001-7>
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K. J., Yokota, Y., & Shimizu, A. (2003). The Balance Between Pax5 and Id2 Activities Is the Key to AID Gene Expression. *Journal of Experimental Medicine*, 198(9), 1427–1437. <https://doi.org/10.1084/jem.20030802>
- Gondos, A., Dohler, B., Brenner, H., & Opelz, G. (2013). Kidney graft survival in europe and the united states: Strikingly different long-Term outcomes. *Transplantation*, 95(2), 267–274. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182708ea8>
- González-García, I., Ocaña, E., Jiménez-Gómez, G., Campos-Caro, A., & Brieva, J. A. (2006). Immunization-Induced Perturbation of Human Blood Plasma Cell Pool: Progressive Maturation, IL-6 Responsiveness, and High PRDI-

- BF1/BLIMP1 Expression Are Critical Distinctions between Antigen-Specific and Nonspecific Plasma Cells. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4042–4050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4042>
- Good, K. L., & Tangye, S. G. (2007). Decreased expression of Krüppel-like factors in memory B-cells induces the rapid response typical of secondary antibody responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13420–13425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703872104>
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., Trent, R. J., & Basten, A. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184), 676–682. <https://doi.org/10.1038/334676a0>
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Jorgensen, H., Brink, R. A., & Basten, A. (1989). Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature*, 342(6248), 385–391. <https://doi.org/10.1038/342385a0>
- Grosjean-Raillard, J., Tailler, M., Adès, L., Perfettini, J. L., Fabre, C., Braun, T., De Botton, S., Fenaux, P., & Kroemer, G. (2009). ATM mediates constitutive NF- $\kappa$ B activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 28(8), 1099–1109. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.457>
- Gueutin, V., Deray, G., & Isnard-Bagnis, C. (2012). Physiologie rénale. *Bulletin Du Cancer*, 99(3), 237–249. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1482>
- Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2005). B-1a and B-1B-cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 23(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011>
- Hallas, C., Pekarsky, Y., Itoyama, T., Varnum, J., Bichi, R., Rothstein, J. L., & Croce, C. M. (1999). Genomic analysis of human and mouse TCL1 loci reveals a complex of tightly clustered genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), 14418–14423. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14418>
- Halle, S., Halle, O., & Förster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in Immunology*, 38(6), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>
- Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 351(26), 2715–2729. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000161309.14422.01>
- Halloran, P., Mathew, T., Tomlanovich, S., Groth, C., Hooftman, L., & Barker, C. (1997). Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation*, 63(1), 39–47. <https://doi.org/10.1097/00007890-199701150-00008>
- Hanaway, M. J., Woodle, E. S., Mulgaonkar, S., Peddi, V. R., Kaufman, D. B., First, M. R., Croy, R., & Holman, J. (2011). Alemtuzumab Induction in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 364(20), 1909–1919. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1009546>
- Hardinger, K. L. (2006). Rabbit antithymocyte globulin induction therapy in adult renal transplantation. *Pharmacotherapy*, 26(12), 1771–1783. <https://doi.org/10.1592/phco.26.12.1771>
- Harly, C., Cam, M., Kaye, J., & Bhandoola, A. (2018). Development and differentiation of early innate lymphoid progenitors. *Journal of Experimental Medicine*, 215(1), 249–262. <https://doi.org/10.1084/jem.20170832>

- Harper, S. J. F., Ali, J. M., Wlodek, E., Negus, M. C., Harper, I. G., Chhabra, M., Qureshi, M. S., Mallik, M., Bolton, E., Bradley, J. A., & Pettigrew, G. J. (2015). CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(41), 12788–12793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513533112>
- Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Wilk, A. R., Castro, S., Robinson, A., Wainright, J. L., Snyder, J. J., Kasiske, B. L., & Israni, A. K. (2019). OPTN/SRTR 2017 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*, *19*(S2), 19–123. <https://doi.org/10.1111/AJT.15274>
- Hashmi, M. F., Benjamin, O., & Lappin, S. L. (2023). *End-Stage Renal Disease*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499861/>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, *132*(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Heidt, S., Vergunst, M., Anholts, J. D. H., Reinders, M. E. J., De Fijter, J. W., Eikmans, M., & Claas, F. H. J. (2015). B-cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function. *Transplantation*, *99*(5), 1058–1064. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000465>
- Herling, M., Patel, K. A., Hsi, E. D., Chang, K. C., Rassidakis, G. Z., Ford, R., & Jones, D. (2007). TCL1 in B-cell tumors retains its normal B-cell pattern of regulation and is a marker of differentiation stage. *American Journal of Surgical Pathology*, *31*(7), 1123–1129. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31802e2201>
- Herling, M., Patel, K. A., Weit, N., Lilienthal, N., Hallek, M., Keating, M. J., & Jones, D. (2009). High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *114*(21), 4675–4686. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208256>
- Herling, M., Teitell, M. A., Shen, R. R., Medeiros, L. J., & Jones, D. (2003). TCL1 expression in plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and the related CD4<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> blastic tumors of skin. *Blood*, *101*(12), 5007–5009. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3297>
- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K., & Kurosaki, T. (2009). PLC- $\gamma$  2 is essential for formation and maintenance of memory B-cells. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(3), 681–689. <https://doi.org/10.1084/jem.20082100>
- Hill, E. V., Ng, T. H. S., Burton, B. R., Oakley, C. M., Malik, K., & Wraith, D. C. (2015). Glycogen synthase kinase-3 controls IL-10 expression in CD4<sup>+</sup> effector T-cell subsets through epigenetic modification of the IL-10 promoter. *European Journal of Immunology*, *45*(4), 1103–1115. <https://doi.org/10.1002/eji.201444661>
- Hiramura, M., Suizu, F., Narita, M., Kinowaki, K., & Noguchi, M. (2006). Identification of nerve growth factor-responsive element of the TCL1 promoter as a novel negative regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(38), 27753–27764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602420200>
- Hoh, F., Yang, Y. S., Guignard, L., Padilla, A., Stern, M. H., Lhoste, J. M., & Van Tilbeurgh, H. (1998). Crystal structure of p14(TCL1), an oncogene product involved in T-cell prolymphocytic leukemia, reveals a novel  $\beta$ -barrel topology. *Structure*, *6*(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00017-3)
- Holdaas, H., Rostaing, L., Serón, D., Cole, E., Chapman, J., Fellstrøm, B., Strom, E. H., Jardine, A., Midtvedt, K., MacHein, U.,

- Ulbricht, B., Karpov, A., & O'Connell, P. J. (2011). Conversion of long-term kidney transplant recipients from calcineurin inhibitor therapy to everolimus: A randomized, multicenter, 24-month study. *Transplantation*, *92*(4), 410–418. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318224c12d>
- Holla, P., Dizon, B., Ambegaonkar, A. A., Rogel, N., Goldschmidt, E., Boddapati, A. K., Sohn, H., Sturdevant, D., Austin, J. W., Kardava, L., Yuesheng, L., Liu, P., Moir, S., Pierce, S. K., & Madi, A. (2021). Shared transcriptional profiles of atypical B-cells suggest common drivers of expansion and function in malaria, HIV, and autoimmunity. *Science Advances*, *7*(22). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8384>
- Hollenhorst, P. C. (2012). RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites. *Small GTPases*, *3*(3), 154–158. <https://doi.org/10.4161/sgtp.19630>
- Hoogeboom, R., & Tolar, P. (2015). Molecular mechanisms of B-cell antigen gathering and endocytosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *393*, 45–63. [https://doi.org/10.1007/82\\_2015\\_476/COVER](https://doi.org/10.1007/82_2015_476/COVER)
- Hricik, D. E. (2015). Transplant immunology and immunosuppression: Core curriculum 2015. *American Journal of Kidney Diseases*, *65*(6), 956–966. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.01.026>
- Hricik, D. E., Formica, R. N., Nickerson, P., Rush, D., Fairchild, R. L., Poggio, E. D., Gibson, I. W., Wiebe, C., Tinckam, K., Bunnapradist, S., Samaniego-Picota, M., Brennan, D. C., Schröppel, B., Gaber, O., Armstrong, B., Ikle, D., Diop, H., Bridges, N. D., & Heeger, P. S. (2015). Adverse outcomes of tacrolimus withdrawal in immune-quiescent kidney transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology*, *26*(12), 3114–3122. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014121234>
- Hu, C. C. A., Dougan, S. K., McGehee, A. M., Love, J. C., & Ploegh, H. L. (2009). XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B-cells. *EMBO Journal*, *28*(11), 1624–1636. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.117>
- Hwang, J. R., Byeon, Y., Kim, D., & Park, S. G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental and Molecular Medicine*, *52*(5), 750–761. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Imagawa, D. K., Millis, J. M., Seu, P., Olthoff, K., Hart, J., Wasef, E., Dempsey, R. A., Stephens, S., & Busuttil, R. W. (1991). The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. III. evidence that anti-TNF antibody therapy prolongs allograft survival in rats with acute rejection. *Transplantation*, *51*(1), 57–62.
- Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I., Chong, F., Shibata, M., Iwamatsu, A., Chan, A. C., & Kurosaki, T. (1999). BLNK required for coupling syk to PLC $\gamma$ 2 and rac1-JNK in B-cells. *Immunity*, *10*(1), 117–125. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80012-6)
- Isnardi, I., Ng, Y. S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J. H., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2010). Complement receptor 2/CD21- human naive B-cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood*, *115*(24), 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243071>
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J., & Su, B. (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell*, *127*(1), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.033>



- Janeway, C. A. J., Travers, P., & Walport, M. (2001). The generation of diversity in immunoglobulins. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.* (pp. 1–11). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27140/>
- Jansz, T. T., Bonenkamp, A. A., Boereboom, F. T. J., Van Reekum, F. E., Verhaar, M. C., & Van Jaarsveld, B. C. (2018). Health-related quality of life compared between kidney transplantation and nocturnal hemodialysis. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204405>
- Jayne, D., & Tyndall, A. (2004). Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus*, *13*(5), 359–365. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu1027oa>
- Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B-cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, *49*(4), 725–739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>
- Jin, G., Hamaguchi, Y., Matsushita, T., Hasegawa, M., Le Huu, D., Ishiura, N., Naka, K., Hirao, A., Takehara, K., & Fujimoto, M. (2013). B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B-cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(6), 1674–1682.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.044>
- Jordan, S. C., Ammerman, N., Choi, J., Kumar, S., Huang, E., Toyoda, M., Kim, I., Wu, G., & Vo, A. (2020). Interleukin-6: An Important Mediator of Allograft Injury. *Transplantation*, *104*(12), 2497–2506. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003249>
- Jordan, S. C., Toyoda, M., & Vo, A. A. (2009). Intravenous immunoglobulin a natural regulator of immunity and inflammation. *Transplantation*, *88*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a9e89a>
- Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F., & Sanz, I. (2012). Advances in human B-cell phenotypic profiling. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302>
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., & Weiss, A. (1999). Induction of NF- $\kappa$ B by the Akt/PKB kinase. *Current Biology*, *9*(11), 601–604. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80265-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80265-6)
- Kapturczak, M. H., Meier-Kriesche, H. U., & Kaplan, B. (2004). Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplantation Proceedings*, *36*(2 SUPPL.), S25–S32. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.018>
- Karnell, J. L., Kumar, V., Wang, J., Wang, S., Voynova, E., & Ettinger, R. (2017). Role of CD11c+ T-bet+ B-cells in human health and disease. *Cellular Immunology*, *321*(May), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.008>
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, *432*(7015), 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature03097>
- Katabathina, V., Menias, C. O., Pickhardt, P., Lubner, M., & Prasad, S. R. (2016). Complications of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Radiologic Clinics of North America*, *54*(2), 303–319. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2015.09.009>
- Kelly, L. M., Pereira, J. P., Yi, T., Xu, Y., & Cyster, J. G. (2011). EB12 Guides Serial Movements of Activated B-cells and Ligand

- Activity Is Detectable in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues. *The Journal of Immunology*, 187(6), 3026–3032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101262>
- Kim, I. K., Bedi, D. S., Denecke, C., Ge, X., & Tullius, S. G. (2008). Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. *Transplantation*, 86(7), 889–894. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318186ac4a>
- King, H. W., Orban, N., Riches, J. C., Clear, A. J., Warnes, G., Teichmann, S. A., & James, L. K. (2021). Single-cell analysis of human B-cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Science Immunology*, 6(56). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe6291>
- Klaus, S. N., & Pongsomboon, C. (1985). Melanocyte autologous grafting for treatment of leukoderma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 13(6), 968–974. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(85\)70247-2](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(85)70247-2)
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., & Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B-cell germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2639–2644. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437996100>
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., & Kurosaki, T. (2013). Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B-cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity*, 39(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.011>
- Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>
- Krieger, N., Chodoff, L., Leventhal, J. R., Ho, B., Richards, M., Schaumberg, D. A., Laidlaw, D., Ildstad, S. T., & Axelrod, D. A. (2023). Immune tolerance via FCR001 cell therapy compared with maintenance immunosuppression for kidney transplantation: Real-world evidence analysis of safety and efficacy. *Clinical Transplantation*, 37(11), 1–11. <https://doi.org/10.1111/ctr.15074>
- Kriss, C. L., Pinilla-Ibarz, J. A., Mailloux, A. W., Powers, J. J., Tang, C. H. A., Kang, C. W., Zanesi, N., Epling-Burnette, P. K., Sotomayor, E. M., Croce, C. M., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. A. (2012). Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, 120(5), 1027–1038. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394346>
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., & Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B-cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B-cell Collaboration. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5886–5896. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5886>
- Kung, V. L., Sandhu, R., Haas, M., & Huang, E. (2021). Chronic active T cell-mediated rejection is variably responsive to immunosuppressive therapy. *Kidney International*, 100(2), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.03.027>
- Kunkel, E. J., & Butcher, E. C. (2003). Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunology*, 3(10), 822–829. <https://doi.org/10.1038/nri1203>
- Künstle, G., Laine, J., Pierron, G., Kagami, S., Nakajima, H., Hoh, F., Roumestand, C., Stern, M.-H., & Noguchi, M. (2002). Identification of Akt Association and Oligomerization Domains of the Akt Kinase Coactivator TCL1. *Molecular and Cellular Biology*, 22(5), 1513–1525. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.5.1513-1525.2002>
- Kuraishy, A. I., French, S. W., Sherman, M., Herling, M., Jones, D., Wall, R., & Teitell, M. A. (2007). TORC2 regulates germinal

- center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B-cell development and inhibit transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10175–10180. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704170104>
- Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B-cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- Laftavi, M. R., Sharma, R., Feng, L., Said, M., & Pankewycz, O. (2014). Induction therapy in renal transplant recipients: A review. *Immunological Investigations*, 43(8), 790–806. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.914326>
- Laine, J., Küntle, G., Obata, T., & Noguchi, M. (2002). Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3743–3751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107069200>
- Laine, J., Küntle, G., Obata, T., Sha, M., & Noguchi, M. (2000). The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Molecular Cell*, 6(2), 395–407. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00039-3)
- Lamarthée, B., Callemeyn, J., Van Herck, Y., Antoranz, A., Anglicheau, D., Boada, P., Becker, J. U., Debyser, T., De Smet, F., De Vusser, K., Eloudzeri, M., Franken, A., Gwinner, W., Koshy, P., Kuypers, D., Lambrechts, D., Marquet, P., Mathias, V., Rabant, M., ... Naesens, M. (2023). Transcriptional and spatial profiling of the kidney allograft unravels a central role for FcγRIII+ innate immune cells in rejection. *Nature Communications*, 14(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39859-7>
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Gómez, E. C., Sweeney, C. H., Hao, Y., Freitas, A. A., Steinhoff, U., Anderton, S. M., & Fillatreau, S. (2008). TLR-Activated B-cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4763–4773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4763>
- Le Berre, L., Chesneau, M., Danger, R., Dubois, F., Chaussabel, D., Garand, M., & Brouard, S. (2021). Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B-cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 5–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589786>
- Lee, K. W., Park, J. B., Park, H., Kwon, Y., Lee, J. S., Kim, K. S., Chung, Y. J., Rhu, J. S., Choi, S., Kwon, G. Y., Kim, H. J., Kang, E. S., Jung, C. W., Shin, E. C., Kawai, T., Kim, S. J., & Joh, J. W. (2020). Inducing Transient Mixed Chimerism for Allograft Survival Without Maintenance Immunosuppression with Combined Kidney and Bone Marrow Transplantation: Protocol Optimization. *Transplantation*, 104(7), 1472–1482. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003006>
- Lee, R. A., & Gabardi, S. (2012). Current trends in immunosuppressive therapies for renal transplant recipients. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69(22), 1961–1975. <https://doi.org/10.2146/ajhp110624>
- Lefaucheur, C., Viglietti, D., Bentlejewski, C., Van Huyen, J. P. D., Vernerey, D., Aubert, O., Verine, J., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., Loupy, A., & Zeevi, A. (2016). IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(1), 293–304. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111120>
- Lefaucheur, C., Viglietti, D., Bouatou, Y., Philippe, A., Pievani, D., Aubert, O., Duong Van Huyen, J. P., Taupin, J. L., Glotz, D., Legendre, C., Loupy, A., Halloran, P. F., & Dragun, D. (2019). Non-HLA agonistic anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies induce a distinctive phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *Kidney International*, 96(1), 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.01.030>

- Legendre, C, Loupy, A., Rabant, M., Taupin, J., Aubert, O., Amrouche, L., Martinez, F., Bererhi, L., Duong, J., Péraldi, M., Scemla, A., Chavarot, N., Zuber, J., & Anglicheau, D. (2023). Essai de classification des rejets en transplantation rénale. *EMC - Néphrologie*, 35(3), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S1762-0945\(23\)45644-6](https://doi.org/10.1016/S1762-0945(23)45644-6)
- Legendre, Christophe, Canaud, G., & Martinez, F. (2014). Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transplant International*, 27(1), 19–27. <https://doi.org/10.1111/tri.12217>
- Legris, T., Picard, C., Todorova, D., Lyonnet, L., Laporte, C., Dumoulin, C., Nicolino-Brunet, C., Daniel, L., Loundou, A., Morange, S., Bataille, S., Vacher-Coponat, H., Moal, V., Berland, Y., Dignat-George, F., Burtey, S., & Paul, P. (2016). Antibody-dependent NK cell activation is associated with late kidney allograft dysfunction and the complement-independent alloreactive potential of donor-specific antibodies. *Frontiers in Immunology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00288>
- Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S. L., Hess, D. M., Schwab, S. R., Shu, H. B., & Cyster, J. G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B-cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, 20(4), 441–453. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00079-2)
- Leventhal, J. R., & Ildstad, S. T. (2018). Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by facilitating cell-enriched donor stem cell infusion: The importance of durable chimerism. *Human Immunology*, 79(5), 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.01.007>
- Li, H., Borrego, F., Nagata, S., & Tolnay, M. (2016). Fc Receptor–like 5 Expression Distinguishes Two Distinct Subsets of Human Circulating Tissue–like Memory B-cells. *The Journal of Immunology*, 196(10), 4064–4074. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501027>
- Li, Y., Li, Z., & Hu, F. (2021). Double-negative (DN) B-cells: an under-recognized effector memory B-cell subset in autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 205(2), 119–127. <https://doi.org/10.1111/cei.13615>
- Lim, W. H., Shingde, M., & Wong, G. (2019). Recurrent and de novo glomerulonephritis after kidney transplantation. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01944>
- Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C., & Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B-cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4771–4780. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4771-4780.2002>
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., & Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, 517(7533), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature13803>
- Liu, M., Zhao, X., Ma, Y., Zhou, Y., Deng, M., & Ma, Y. (2018). Transcription factor c-Maf is essential for IL-10 gene expression in B-cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 88(3), 1–8. <https://doi.org/10.1111/sji.12701>
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., & Carsetti, R. (1999). B-cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B-cell receptor-derived signals. *Journal of Experimental Medicine*, 190(1), 75–89. <https://doi.org/10.1084/jem.190.1.75>
- Loenen, W. A. M., de Vries, E., Gravestien, L. A., Hintzen, R. Q., Van Lier, R. A. W., & Borst, J. (1992). The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. *European Journal of Immunology*, 22(2), 447–455.

<https://doi.org/10.1002/eji.1830220224>

- Lombardi, Y., & François, H. (2022). Belatacept in Kidney Transplantation: What Are the True Benefits? A Systematic Review. *Frontiers in Medicine*, 9(July). <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.942665>
- Louis, K., Bailly, E., Macedo, C., Lau, L., Ramaswami, B., Chang, A., Chandran, U., Landsittel, D., Gu, X., Chalasani, G., Zeevi, A., Randhawa, P., Singh, H., Lefaucheur, C., & Metes, D. (2021). T-bet+CD27+CD21- B-cells poised for plasma cell differentiation during antibody-mediated rejection of kidney transplants. *JCI Insight*, 6(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148881>
- Louis, K., Fadakar, P., Macedo, C., Yamada, M., Lucas, M., Gu, X., Zeevi, A., Randhawa, P., Lefaucheur, C., & Metes, D. (2022). Concomitant loss of regulatory T and B-cells is a distinguishing immune feature of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Kidney International*, 1, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.12.027>
- Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard, N., Moreau, A., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2006). Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 81(3), 398–407. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000203166.44968.86>
- Lozano, J. J., Pallier, A., Martinez-Llordella, M., Danger, R., López, M., Giral, M., Londoño, M. C., Rimola, A., Souillou, J. P., Brouard, S., & Sánchez-Fueyo, A. (2011). Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *American Journal of Transplantation*, 11(9), 1916–1926. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x>
- Lúcia, M., Luque, S., Crespo, E., Melilli, E., Cruzado, J. M., Martorell, J., Jarque, M., Gil-Vernet, S., Manonelles, A., Grinyó, J. M., & Bestard, O. (2015). Preformed circulating HLA-specific memory B-cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney International*, 88(4), 874–887. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.205>
- Luque, S., Lúcia, M., Melilli, E., Lefaucheur, C., Crespo, M., Loupy, A., Bernal-Casas, D., Gomà, M., Jarque, M., Crespo, E., Montero, N., Manonelles, A., Cruzado, J. M., Gil-Vernet, S., Grinyó, J. M., & Bestard, O. (2019). Value of monitoring circulating donor-reactive memory B-cells to characterize antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 19(2), 368–380. <https://doi.org/10.1111/ajt.15055>
- Mackay, I. R., & Rosen, F. S. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England Journal of Medicine*, 343(15), 1020–1034.
- MacKenzie, K. F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V. A., Nöhren, G., Kristariyanto, Y., van den Bosch, M., Mudaliar, M., McCarthy, P. C., Pattison, M. J., Pedrioli, P. G. A., Barton, G. J., Toth, R., Prescott, A., & Arthur, J. S. C. (2013). PGE 2 Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A–SIK–CRT3 Pathway. *The Journal of Immunology*, 190(2), 565–577. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202462>
- MacLennan, I. C. M., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M. Y., Zúñiga, E., Cook, M. C., & Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews*, 194(1), 8–18. <https://doi.org/10.1034/J.1600-065X.2003.00058.X>
- Maruyama, M., Lam, K. P., & Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*, 407, 636–647. <https://doi.org/10.1038/35053144>
- Massart, A., Pallier, A., Pascual, J., Viklicky, O., Budde, K., Spasovski, G., Klinger, M., Sever, M. S., Sørensen, S. S., Hadaya, K.,

- Oberbauer, R., Dudley, C., De Fijter, J. W., Yussim, A., Hazzan, M., Wekerle, T., Berglund, D., De Biase, C., Pérez-Sáez, M. J., ... Abramowicz, D. (2016). The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *31*(6), 1002–1013. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv437>
- Masset, C., Dantal, J., Souillou, J. P., Walencik, A., Delbos, F., Brouard, S., & Giral, M. (2022). Case Report: Long-term observations from the tacrolimus weaning randomized clinical trial depicts the challenging aspects for determination of low-immunological risk patients. *Frontiers in Immunology*, *13*(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021481>
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S. L., Sakaguchi, S., Takeda, K., Kurosaki, T., & Baba, Y. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*, *41*(6), 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>
- Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T., & Baba, Y. (2011). The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B-cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. *Immunity*, *34*(5), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.016>
- Matsumoto, R., Matsumoto, M., Mita, S., Hitoshi, Y., Ando, M., Araki, S., Yamaguchi, N., Tominaga, A., & Takatsu, K. (1989). Interleukin-5 induces maturation but not class switching of surface IgA-positive B-cells into IgA-secreting cells. *Immunology*, *66*(1), 32–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15493259><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1385116>
- Matsushita, T., Le Huu, D., Kobayashi, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Naka, K., Hirao, A., Muramatsu, M., Takehara, K., & Fujimoto, M. (2016). A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(4), 1170–1182.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1319>
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., & Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, *21*(6), 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.009>
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- Mebius, R. E., Nolte, M. A., & Kraal, G. (2004). Development and function of the splenic marginal zone. *Critical Reviews in Immunology*, *24*(6), 449–464. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.V24.I6.40>
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., & Busslinger, M. (2011). Pax5: A Master Regulator of B-cell Development and Leukemogenesis. In *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 111). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00005-2>
- Melchers, F., Yamagami, T., Rolink, A., & Andersson, J. (2007). Rules for the rearrangement events at the L chain gene loci of the mouse. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *596*, 63–70. [https://doi.org/10.1007/0-387-46530-8\\_6](https://doi.org/10.1007/0-387-46530-8_6)
- Merrell, K. T., Benschop, R. J., Gauld, S. B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L. J., & Cambier, J. C. (2006). Identification of Anergic B-cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity*, *25*(6), 953–962.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.017>

- Messner, B., Stütz, A. M., Albrecht, B., Peiritsch, S., & Woisetschläger, M. (1997). Cooperation of binding sites for STAT6 and NF kappa B/rel in the IL-4-induced up-regulation of the human IgE germline promoter. *Journal of Immunology*, *159*(7), 3330–3337.
- Minnich, M., Tagoh, H., Bönelt, P., Axelsson, E., Fischer, M., Cebolla, B., Tarakhovsky, A., Nutt, S. L., Jaritz, M., & Busslinger, M. (2016). Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nature Immunology*, *17*(3), 331–343. <https://doi.org/10.1038/ni.3349>
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., & Bhan, A. K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B-cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, *16*(2), 219–230. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00274-1)
- Möller, G. (2001). Antigenes: Thymus Independent. *ELS*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000504>
- Mond, J. J., Lees, A., & Snapper, C. M. (1995). T CELL-INDEPENDENT ANTIGENS TYPE 2. *Annual Review of Immunology*, *13*, 655–692.
- Montero, N., Toapanta, N., Pallarès, N., Crespo, M., Diekmann, F., Guirado, L., Esteban, R., Codina, S., Melilli, E., Buxeda, A., Velis, G., Torres, I. B., Revuelta, I., Molina Andujar, A., Facundo, C., Bardají, B., Riera, L., Fiol, M., Cruzado, J. M., ... Bestard, O. (2021). Deciphering transplant outcomes of expanded kidney allografts donated after controlled circulatory death in the current transplant era. A call for caution. *Transplant International*, *34*(12), 2494–2506. <https://doi.org/10.1111/tri.14131>
- Moraes-Vieira, P. M. M., Silva, H. M., Takenaka, M. C. S., Monteiro, S. M., Lemos, F., Saitovitch, D., Kalil, J., & Coelho, V. (2010). Differential monocyte STAT6 activation and CD4+CD25+Foxp3+ T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Human Immunology*, *71*(5), 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.01.022>
- Moran, I., Nguyen, A., Khoo, W. H., Butt, D., Bourne, K., Young, C., Hermes, J. R., Biro, M., Gracie, G., Ma, C. S., Munier, C. M. L., Luciani, F., Zaunders, J., Parker, A., Kelleher, A. D., Tangye, S. G., Croucher, P. I., Brink, R., Read, M. N., & Phan, T. G. (2018). Memory B-cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes. *Nature Communications*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05772-7>
- Moreau, A., Kervella, D., Bouchet-Delbos, L., Braudeau, C., Saiagh, S., Guérif, P., Limou, S., Moreau, A., Bercegeay, S., Streitz, M., Sawitzki, B., James, B., Harden, P. N., Game, D., Tang, Q., Markmann, J. F., Roberts, I. S. D., Geissler, E. K., Dréno, B., ... Devis, A. (2023). A Phase I/IIa study of autologous tolerogenic dendritic cells immunotherapy in kidney transplant recipients. *Kidney International*, *103*(3), 627–637. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.08.037>
- Motiwala, T., Datta, J., Kutay, H., Roy, S., & Jacob, S. T. (2010). Lyn kinase and ZAP70 are substrates of PTPROT in B-cells: Lyn inactivation by PTPROT sensitizes leukemia cells to VEGF-R inhibitor pazopanib. *Journal of Cellular Biochemistry*, *110*(4), 846–856. <https://doi.org/10.1002/jcb.22593>
- Motiwala, T., Zanesi, N., Datta, J., Roy, S., Kutay, H., Checovich, A. M., Kaou, M., Zhong, Y., Johnson, A. J., Lucas, D. M., Heerema, N. A., Hagan, J., Mo, X., Jarjoura, D., Byrd, J. C., Croce, C. M., & Jacob, S. T. (2011). AP-1 elements and TCL1 protein regulate expression of the gene encoding protein tyrosine phosphatase PTPROT in leukemia. *Blood*, *118*(23), 6132–6140. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-323147>

- Muramatsu, M., Kazuo, K., Sidonia, F., Shuichi, Y., Yoichi, S., & Tasuku, H. (2000). Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell*, *102*(5), 553–563.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme Masamichi. *Cell*, *102*(5), 553–563.
- Nankivell, B. J., & Alexander, S. I. (2010). Rejection of the Kidney Allograft. *New England Journal of Medicine*, *363*(15), 1451–1462. <https://doi.org/10.1056/nejmra0902927>
- Narducci, M. G., Fiorenza, M. T., Kang, S. M., Bevilacqua, A., Di Giacomo, M., Remotti, D., Picchio, M. C., Fianza, V., Cooper, M. D., Croce, C. M., Mangia, F., & Russo, G. (2002). TCL1 participates in early embryonic development and is overexpressed in human seminomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18), 11712–11717. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412399>
- Narducci, M. G., Pescarmona, E., Lazzeri, C., Signoretti, S., Lavinia, A. M., Remotti, D., Scala, E., Baroni, C. D., Stoppacciaro, A., Croce, C. M., & Russo, G. (2000). Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Research*, *60*(8), 2095–2100.
- Narducci, M. G., Stoppacciaro, A., Imada, K., Uchiyama, T., Virgilio, L., Lazzeri, C., Croce, C. M., & Russo, G. (1997). TCL1 is overexpressed in patients affected by adult T-cell leukemias. *Cancer Research*, *57*(24), 5452–5456.
- Nashan, B., Moore, R., Amlot, P., Schmidt, A. G., Abeywickrama, K., & Souillou, J. P. (1997). Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet*, *350*(9086), 1193–1198. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)09278-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)09278-7)
- Necela, B. M., & Cidlowski, J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *1*(3), 239–246. <https://doi.org/10.1513/pats.200402-005MS>
- Nelson, J., Alvey, N., Bowman, L., Schulte, J., Segovia, M. C., McDermott, J., Te, H. S., Kapila, N., Levine, D. J., Gottlieb, R. L., Oberholzer, J., & Campara, M. (2022). Consensus recommendations for use of maintenance immunosuppression in solid organ transplantation: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy, American Society of Transplantation, and the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Pharmacotherapy*, *42*(8), 599–633. <https://doi.org/10.1002/phar.2716>
- Nemazee, D. (2006). Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, *6*(10), 728–740. <https://doi.org/10.1038/nri1939>
- Newell, K. A., Asare, A., Sanz, I., Wei, C., Rosenberg, A., Gao, Z., Kanaparathi, S., Asare, S., Lim, N., Stahly, M., Howell, M., Knechtle, S., Kirk, A., Marks, W. H., Kawai, T., Spitzer, T., Tolkoff-Rubin, N., Sykes, M., Sachs, D. H., ... Turka, L. A. (2015). Longitudinal studies of a B-cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, *15*(11), 2908–2920. <https://doi.org/10.1111/ajt.13480>
- Newell, Kenneth A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., Hernandez-Fuentes, M. P., Turka, L. A., & Seyfert-Margolis, V. L. (2010). Identification of a B-cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(6), 1836–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI39933>



- Niemann, M., Lachmann, N., Geneugelijck, K., & Spierings, E. (2021). Computational eurotransplant kidney allocation simulations demonstrate the feasibility and benefit of T-cell epitope matching. *PLoS Computational Biology*, *17*(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009248>
- Noguchi, H., Nakagawa, K., Ueki, K., Tsuchimoto, A., Kaku, K., Okabe, Y., & Nakamura, M. (2020). Response to Treatment for Chronic-active T Cell-mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Report of 3 Cases. *Transplantation Direct*, *6*(12), E628. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001079>
- Nova-Lamperti, E., Chana, P., Mobillo, P., Runglall, M., Kamra, Y., McGregor, R., Lord, G. M., Lechler, R. I., Lombardi, G., & Hernandez-Fuentes, M. P. (2017). Increased CD40 ligation and reduced bcr signalling leads to higher il-10 production in B-cells from tolerant kidney transplant patients. *Transplantation*, *101*(3), 541–547. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001341>
- O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., Lin, L. L., Mantchev, G. T., Bram, R. J., & Noelle, R. J. (2004). BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(1), 91–97. <https://doi.org/10.1084/jem.20031330>
- Obukhanych, T. V., & Nussenzweig, M. C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B-cells. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(2), 305–310. <https://doi.org/10.1084/jem.20052036>
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A. S., Klein, U., Dinner, A. R., Singh, H., & Sciammas, R. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity*, *38*(5), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B. F., Jacobi, A. M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A., & Dörner, T. (2005). Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*, *105*(4), 1614–1621. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2507>
- Oleinika, K., Mauri, C., & Salama, A. D. (2019). Effector and regulatory B-cells in immune-mediated kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0074-7>
- Omori, S. A., Cato, M. H., Anzelon-Mills, A., Puri, K. D., Shapiro-Shelef, M., Calame, K., & Rickert, R. C. (2006). Regulation of Class-Switch Recombination and Plasma Cell Differentiation by Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Immunity*, *25*(4), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.015>
- Onodera, T., Hosono, A., Odagiri, T., Tashiro, M., Kaminogawa, S., Okuno, Y., Kurosaki, T., Ato, M., Kobayashi, K., & Takahashi, Y. (2016). Whole-Virion Influenza Vaccine Recalls an Early Burst of High-Affinity Memory B-cell Response through TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, *196*(10), 4172–4184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600046>
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires tie Akt serine- threonine kinase. *Nature*, *401*(6748), 82–85. <https://doi.org/10.1038/43466>
- Paduano, F., Gaudio, E., Mensah, A. A., Pinton, S., Bertoni, F., & Trapasso, F. (2018). T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 (TCL1): An oncogene regulating multiple signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, *8*(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00317>
- Paik, J. H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H., & DePinho, R. A. (2007). FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor

- Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell*, 128(2), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.029>
- Palamarchuk, A., Yan, P. S., Zanesi, N., Wang, L., Rodrigues, B., Murphy, M., Balatti, V., Bottoni, A., Nazaryan, N., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T. J., Freitas, M., Croce, C. M., & Pekarsky, Y. (2012). Tc1 protein functions as an inhibitor of de novo DNA methylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2555–2560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200003109>
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R. J., Sanz, I., & Anolik, J. H. (2009). Novel Human Transitional B-cell Populations Revealed by B-cell Depletion Therapy. *The Journal of Immunology*, 182(10), 5982–5993. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J. J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B-cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 78(5), 503–513. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.162>
- Park, S. R., Seo, G. Y., Choi, A. J., Stavnezer, J., & Kim, P. H. (2005). Analysis of transforming growth factor- $\beta$ 1-induced Ig germ-line  $\gamma$ 2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *European Journal of Immunology*, 35(3), 946–956. <https://doi.org/10.1002/eji.200425848>
- Pascual, J., Diekmann, F., Fernández-Rivera, C., Gómez-Marqués, G., Gutiérrez-Dalmau, A., Pérez-Sáez, M. J., Sancho-Calabuig, A., & Oppenheimer, F. (2017). Recommendations for the use of everolimus in de novo kidney transplantation: False beliefs, myths and realities. *Nefrología*, 37(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.04.016>
- Patel, R., & Terasaki, P. I. (1969). Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 280(14), 735–739. <https://doi.org/10.1056/nejm196904032801401>
- Pekarsky, Y. (2000). Tc1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3028–3033. <https://doi.org/10.1073/pnas.040557697>
- Pekarsky, Yuri, Hallas, C., Isobe, M., Russo, G., & Croce, C. M. (1999). Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2949–2951. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2949>
- Pekarsky, Yuri, Palamarchuk, A., Maximov, V., Efanov, A., Nazaryan, N., Santanam, U., Rassenti, L., Kipps, T., & Croce, C. M. (2008). Tc1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19643–19648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810965105>
- Pekarsky, Yuri, Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C. G., Rassenti, L., Calin, G. A., Hagan, J. P., Kipps, T., & Croce, C. M. (2006). Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Research*, 66(24), 11590–11593. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3613>
- Petock, J. M., Torshin, I. Y., Wang, Y. F., Du Bois, G. C., Croce, C. M., Harrison, R. W., & Weber, I. T. (2001). Structure of murine Tc1 at 2.5 Å resolution and implications for the TCL oncogene family. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(11), 1545–1551. <https://doi.org/10.1107/S090744490101352X>

- Pilat, N., & Wekerle, T. (2010). Transplantation tolerance through mixed chimerism. *Nature Reviews Nephrology*, 6(10), 594–605. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.110>
- Pillai, S., & Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 767–777. <https://doi.org/10.1038/nri2656>
- Podestà, M. A., Cucchiari, D., Ciceri, P., Messa, P., Torregrosa, J. V., & Cozzolino, M. (2022). Cardiovascular calcifications in kidney transplant recipients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37(11), 2063–2071. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab053>
- Pollizzi, K. N., & Powell, J. D. (2014). Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 435–446. <https://doi.org/10.1038/nri3701>
- Pollizzi, K. N., & Powell, J. D. (2015). Regulation of T cells by mTOR: The known knowns and the known unknowns. *Trends in Immunology*, 36(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.005>
- Que, W., & Li, X. K. (2021). Regulatory T Cells for the Induction of Transplantation Tolerance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1278, 289–302. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6407-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6407-9_15)
- Rao, A., Luo, C., & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annual Review of Immunology*, 15, 707–747. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>
- Rastogi, I., Jeon, D., Moseman, J. E., Muralidhar, A., Potluri, H. K., & McNeel, D. G. (2022). Role of B-cells as antigen presenting cells. *Frontiers in Immunology*, 13(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954936>
- Rebollo-Mesa, I., Nova-Lamperti, E., Mobillo, P., Runglall, M., Christakoudi, S., Norris, S., Smallcombe, N., Kamra, Y., Hilton, R., Bhandari, S., Baker, R., Berglund, D., Carr, S., Game, D., Griffin, S., Kalra, P. A., Lewis, R., Mark, P. B., Marks, S., ... Hernandez-Fuentes, M. P. (2016). Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *American Journal of Transplantation*, 16(12), 3443–3457. <https://doi.org/10.1111/ajt.13932>
- Rincon-Arevalo, H., Wiedemann, A., Stefanski, A. L., Lettau, M., Szelinski, F., Fuchs, S., Frei, A. P., Steinberg, M., Kam-Thong, T., Hatje, K., Keller, B., Warnatz, K., Radbruch, A., Lino, A. C., Schrezenmeier, E., & Dörner, T. (2021). Deep Phenotyping of CD11c<sup>+</sup> B-cells in Systemic Autoimmunity and Controls. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635615>
- Roco, J. A., Mesin, L., Binder, S. C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P. F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P. A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C. R., Schiepers, A., Corcoran, L. M., Toellner, K. M., Polo, J. M., Meyer-Hermann, M., Victora, G. D., & Vinuesa, C. G. (2019). Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity*, 51(2), 337–350.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>
- Roedder, S., Li, L., Alonso, M. N., Hsieh, S. C., Vu, M. T., Dai, H., Sigdel, T. K., Bostock, I., Macedo, C., Metes, D., Zeevi, A., Shapiro, R., Salvatierra, O., Scandling, J., Alberu, J., Engleman, E., & Sarwal, M. M. (2015). A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(8), 2042–2053. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013111239>
- Romashkova, J. a, & Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling [see comments]. *Nature*, 401(6748), 86–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin->

post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0010485711

- Ropars, V., Despouy, G., Stern, M. H., Benichou, S., Roumestand, C., & Arold, S. T. (2009). The TCL1A oncoprotein interacts directly with the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B. *PLoS ONE*, *4*(8), 3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006567>
- Rostaing, L., Hertig, A., Albano, L., Anglicheau, D., Durrbach, A., Vuiblet, V., Moulin, B., Merville, P., Hazzan, M., Lang, P., Touchard, G., Hurault Deligny, B., Quéré, S., Di Giambattista, F., Dubois, Y. C., & Rondeau, E. (2015). Fibrosis progression according to epithelial-mesenchymal transition profile: A randomized trial of everolimus versus CsA. *American Journal of Transplantation*, *15*(5), 1303–1312. <https://doi.org/10.1111/ajt.13132>
- Rostaing, L., Vincenti, F., Grinyó, J., Rice, K. M., Bresnahan, B., Steinberg, S., Gang, S., Gaithe, L. E., Moal, M. C., Mondragón-Ramirez, G. A., Kothari, J., Pupim, L., & Larsen, C. P. (2013). Long-term belatacept exposure maintains efficacy and safety at 5 years: Results from the long-term extension of the BENEFIT study. *American Journal of Transplantation*, *13*(11), 2875–2883. <https://doi.org/10.1111/ajt.12460>
- Roufosse, C., Simmonds, N., Clahsen-Van Groningen, M., Haas, M., Henriksen, K. J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasińska, A., Rabant, M., Racusen, L. C., Solez, K., & Becker, J. U. (2018). A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*, *102*(11), 1795–1814. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366>
- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J. F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S., & Souillou, J. P. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, *6*(4), 736–746. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01280.x>
- Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R. T., Gillis, J. Z., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c<sup>+</sup> B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, *118*(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>
- Ruprecht, C. R., & Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B-cells. *European Journal of Immunology*, *36*(4), 810–816. <https://doi.org/10.1002/eji.200535744>
- Rush, D. N., & Gibson, I. W. (2019). Subclinical inflammation in renal transplantation. *Transplantation*, *103*(6), E139–E145. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002682>
- Russell, D. M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J. F. A. P., Bűrki, K., & Nemazee, D. (1991). Peripheral deletion of self-reactive B-cells. *Nature*, *354*(6351), 308–311. <https://doi.org/10.1038/354308a0>
- Russo, G., Isobe, M., Gatti, R., Finan, J., Batuman, O., Huebner, K., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1989). Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(2), 602–606. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.602>
- Saadi, S., Holzknacht, R. A., Patte, C. P., Stern, D. M., & Platt, J. L. (1995). Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(6), 1807–1814. <https://doi.org/10.1084/jem.182.6.1807>
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., Rovis, F., Jimenez, E., Ballou, A., Giral, M., Rebollo-Mesa, I., Le Moine, A., Braudeau, C., Hilton, R., Gerstmayr, B., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in

- humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–1861. <https://doi.org/10.1172/JCI39922>
- Said, J. W., Hoyer, K. K., French, S. W., Rosenfelt, L., Garcia-Lloret, M., Koh, P. J., Cheng, T. C., Sulur, G. G., Pinkus, G. S., Kuehl, W. M., Rawlings, D. J., Wall, R., & Teitell, M. A. (2001). TCL 1 oncogene expression in B-cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B-cell lymphoma. *Laboratory Investigation*, 81(4), 555–564. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780264>
- Saijo, K., Schmedt, C., Su, I. Hsin, Karasuyama, H., Lowell, C. A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A., & Tarakhovsky, A. (2003). Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- $\kappa$ B activation during B-cell development. *Nature Immunology*, 4(3), 274–279. <https://doi.org/10.1038/ni893>
- Sailliet, N., Mai, H. Le, Dupuy, A., Tilly, G., Fourgeux, C., Braud, M., Giral, M., Robert, J. M., Degauque, N., Danger, R., Poschmann, J., & Brouard, S. (2023). Human granzyme B regulatory B-cells prevent effector CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism dependent from lymphotoxin alpha. *Frontiers in Immunology*, 14(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1183714>
- Sawinski, D., Trofe-Clark, J., Leas, B., Uhl, S., Tuteja, S., Kaczmarek, J. L., French, B., & Umscheid, C. A. (2016). Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Transplantation*, 16(7), 2117–2138. <https://doi.org/10.1111/ajt.13710>
- Sawitzki, B., Harden, P. N., Reinke, P., Moreau, A., Hutchinson, J. A., Game, D. S., Tang, Q., Guinan, E. C., Battaglia, M., Burlingham, W. J., Roberts, I. S. D., Streitz, M., Josien, R., Böger, C. A., Scottà, C., Markmann, J. F., Hester, J. L., Juerchott, K., Braudeau, C., ... Geissler, E. K. (2020). Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *The Lancet*, 395(10237), 1627–1639. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30167-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30167-7)
- Sayegh, M. H., & Carpenter, C. B. (2004). Transplantation 50 Years Later — Progress, Challenges, and Promises. *New England Journal of Medicine*, 351(26), 2761–2766. <https://doi.org/10.1056/nejmon043418>
- Schatz, D. G., & Swanson, P. C. (2011). V(D)J recombination: Mechanisms of initiation. *Annual Review of Genetics*, 45(D), 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552>
- Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shutga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., & Scott, M. L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B-cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293(5537), 2111–2114. <https://doi.org/10.1126/science.1061964>
- Schold, J. D., & Kaplan, B. (2009). AZA/Tacrolimus is associated with similar outcomes as mmf/tacrolimus among renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 9(9), 2067–2074. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02756.x>
- Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Häberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H. J., Zenke, G., Zerwes, H. G., & Schreier, M. H. (1997). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation*, 64(1), 36–42. <https://doi.org/10.1097/00007890-199707150-00008>
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, 21, 305–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110>
- Schweighoffer, E., Nys, J., Vanes, L., Smithers, N., & Tybulewicz, V. L. J. (2017). TLR4 signals in B lymphocytes are transduced

- via the B-cell antigen receptor and SYK. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1269–1280. <https://doi.org/10.1084/jem.20161117>
- Segerer, S., Cui, Y., Eitner, F., Goodpaster, T., Hudkins, K. L., Mack, M., Cartron, J. P., Colin, Y., Schlondorff, D., & Alpers, C. E. (2001). Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *American Journal of Kidney Diseases*, 37(3), 518–531. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.22076>
- Setz, C. S., Hug, E., Khadour, A., Abdelrasoul, H., Bilal, M., Hobeika, E., & Jumaa, H. (2018). PI3K-Mediated Blimp-1 Activation Controls B-cell Selection and Homeostasis. *Cell Reports*, 24(2), 391–405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.035>
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., & Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B-cell gene expression program. *Immunity*, 17(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00335-7)
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Qian, S. B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B. K., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J. W., Calame, K., Glimcher, L. H., & Staudt, L. M. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21(1), 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>
- Shapiro-Shelef, M., & Calame, K. C. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 230–242. <https://doi.org/10.1038/nri1572>
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., & Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B-cells. *Immunity*, 19(4), 607–620. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00267-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00267-X)
- Shen, R. R., Ferguson, D. O., Renard, M., Hoyer, K. K., Kim, U., Hao, X., Alt, F. W., Roeder, R. G., Morse, H. C., & Teitell, M. A. (2006). Dysregulated TCL1 requires the germinal center and genome instability for mature B-cell transformation. *Blood*, 108(6), 1991–1998. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001354>
- Sherman, L. A., & Chattopadhyay, S. (1993). The molecular basis of allorecognition. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 11, pp. 385–402). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002125>
- Sherman, M. H., Kuraishy, A. I., Deshpande, C., Hong, J. S., Cacalano, N. A., Gatti, R. A., Manis, J. P., Damore, M. A., Pellegrini, M., & Teitell, M. A. (2010). AID-induced genotoxic stress promotes B-cell differentiation in the germinal center via ATM and LKB1 signaling. *Molecular Cell*, 39(6), 873–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.019>
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., & Kurosaki, T. (2016). Regulated selection of germinal-center cells into the memory B-cell compartment. *Nature Immunology*, 17(7), 861–869. <https://doi.org/10.1038/ni.3460>
- Shinohara, H., Maeda, S., Watarai, H., & Kurosaki, T. (2007). I $\kappa$ B kinase  $\beta$ -induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1-Bcl10-MALT1 complex formation in B-cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3285–3293. <https://doi.org/10.1084/jem.20070379>
- Silva, H. M., Takenaka, M. C. S., Moraes-Vieira, P. M. M., Monteiro, S. M., Hernandez, M. O., Chacara, W., Six, A., Avena, F., Sesterheim, P., Barbé-Tuana, F. M., Saitovitch, D., Lemos, F., Kalil, J., & Coelho, V. (2012). Preserving the B-cell

- compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Molecular Medicine*, 18(5), 733–743. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00281>
- Slifka, M. K., Matloubian, M., & Ahmed, R. (1995). Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *Journal of Virology*, 69(3), 1895–1902. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.3.1895-1902.1995>
- Snanoudj, R., Kamar, N., Cassuto, E., Caillard, S., Metzger, M., Merville, P., Thierry, A., Jollet, I., Grimbert, P., Anglicheau, D., Hazzan, M., Choukroun, G., Hurault De Ligny, B., Janbon, B., Vuiblet, V., Devys, A., Le Meur, Y., Delahousse, M., Morelon, E., ... Taupin, J. L. (2019). Epitope load identifies kidney transplant recipients at risk of allosensitization following minimization of immunosuppression. *Kidney International*, 95(6), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.12.029>
- Solez, K., Axelsen, R. A., Benediktsson, H., Burdick, J. F., Cohen, A. H., Colvin, R. B., Croker, B. P., Droz, D., Dunnill, M. S., Halloran, P. F., Häyry, P., Jennette, J. C., Keown, P. A., Marcussen, N., Mihatsch, M. J., Morozumi, K., Myers, B. D., Nast, C. C., Olsen, S., ... Yamaguchi, Y. (1993). International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International*, 44(2), 411–422. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.259>
- Song, W., Antao, O. Q., Condiff, E., Sanchez, G. M., Chernova, I., Zembruski, K., Steach, H., Rubtsova, K., Angeletti, D., Lemenze, A., Laidlaw, B. J., Craft, J., & Weinstein, J. S. (2022). Development of Tbet- and CD11c-expressing B-cells in a viral infection requires T follicular helper cells outside of germinal centers. *Immunity*, 55(2), 290-307.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.01.002>
- Staatz, C. E., & Tett, S. E. (2014). Pharmacology and toxicology of mycophenolate in organ transplant recipients: An update. *Archives of Toxicology*, 88(7), 1351–1389. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1247-1>
- Stachelscheid, J., Jiang, Q., & Herling, M. (2021). The modes of dysregulation of the proto-oncogene T-cell leukemia/lymphoma 1A. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 21, pp. 1–18). <https://doi.org/10.3390/cancers13215455>
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J., & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology*, 26, 261–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Stavnezer, J., & Schrader, C. E. (2006). Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends in Genetics*, 22(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.11.002>
- Stegall, M. D., Gloor, J., Winters, J. L., Moore, S. B., & DeGoey, S. (2006). A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody. *American Journal of Transplantation*, 6(2), 346–351. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01178.x>
- Stein, J. V., & Nombela-Arrieta, C. (2005). Chemokine control of lymphocyte trafficking: A general overview. *Immunology*, 116(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02183.x>
- Stranford, S., & Ruddle, N. H. (2012). Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: Parallels with lymph node stroma. *Frontiers in Immunology*, 3(NOV), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00350>
- Sutton, H. J., Aye, R., Idris, A. H., Vistein, R., Nduati, E., Kai, O., Mwacharo, J., Li, X., Gao, X., Andrews, T. D., Koutsakos, M., Nguyen, T. H. O., Nekrasov, M., Milburn, P., Eltahla, A., Berry, A. A., KC, N., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., ... Cockburn, I.

- A. (2021). Atypical B-cells are part of an alternative lineage of B-cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. *Cell Reports*, 34(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684>
- Sze, D. M. Y., Toellner, K. M., De Vinuesa, C. G., Taylor, D. R., & MacLennan, I. C. M. (2000). Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *Journal of Experimental Medicine*, 192(6), 813–821. <https://doi.org/10.1084/jem.192.6.813>
- Tabrizi, S. J., Niuro, H., Masui, M., Yoshimoto, G., Iino, T., Kikushige, Y., Wakasaki, T., Baba, E., Shimoda, S., Miyamoto, T., Hara, T., & Akashi, K. (2009). T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM+ Memory B-cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1490–1499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1490>
- Taylor, J. J., Pape, K. A., & Jenkins, M. K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B-cells early in the primary response. *Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 597–606. <https://doi.org/10.1084/jem.20111696>
- Thomusch, O., Wiesener, M., Opgenoorth, M., Pascher, A., Woitas, R. P., Witzke, O., Jaenigen, B., Rentsch, M., Wolters, H., Rath, T., Cingöz, T., Benck, U., Banas, B., & Hugo, C. (2016). Rabbit-ATG or basiliximab induction for rapid steroid withdrawal after renal transplantation (Harmony): an open-label, multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*, 388(10063), 3006–3016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32187-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32187-0)
- Tiberio, L., Del Prete, A., Schioppa, T., Sozio, F., Bosisio, D., & Sozzani, S. (2018). Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(4). <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>
- Tiede, I., Fritz, G., Strand, S., Poppe, D., Dvorsky, R., Strand, D., Lehr, H. A., Wirtz, S., Becker, C., Atreya, R., Mudter, J., Hildner, K., Bartsch, B., Holtmann, M., Blumberg, R., Walczak, H., Iven, H., Galle, P. R., Ahmadian, M. R., & Neurath, M. F. (2003). CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 111(8), 1133–1145. <https://doi.org/10.1172/JCI16432>
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., & Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B-cells. *Journal of Experimental Medicine*, 177(4), 1009–1020. <https://doi.org/10.1084/jem.177.4.1009>
- Todd, J. L., & Palmer, S. M. (2017). Danger signals in regulating the immune response to solid organ transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 127(7), 2464–2472. <https://doi.org/10.1172/JCI90594>
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B. II, & Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*, 20(6), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.001>
- Triplett, R. G., & Schow, S. R. (1996). Autologous bone grafts and endosseous implants: Complementary techniques. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 54(4), 486–494. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(96\)90126-3](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(96)90126-3)
- Tsai, E. W., Rianthavorn, P., Gjertson, D. W., Wallace, W. D., Reed, E. F., & Ettenger, R. B. (2006). CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. *Transplantation*, 82(12), 1769–1773. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000250572.46679.45>
- Van Loon, E., Senev, A., Lerut, E., Coemans, M., Callemeyn, J., Van Keer, J. M., Daniëls, L., Kuypers, D., Sprangers, B., Emonds, M. P., & Naesens, M. (2020). Assessing the Complex Causes of Kidney Allograft Loss. *Transplantation*, 104(12), 2557–



2566. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003192>

- Vanrenterghem, Y., Bresnahan, B., Campistol, J., Durrbach, A., Grinyó, J., Neumayer, H. H., Lang, P., Larsen, C. P., Mancilla-Urrea, E., Pestana, J. M., Block, A., Duan, T., Glicklich, A., Gujrathi, S., & Vincenti, F. (2011). Belatacept-based regimens are associated with improved cardiovascular and metabolic risk factors compared with cyclosporine in kidney transplant recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT Studies). *Transplantation*, *91*(9), 976–983. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31820c10eb>
- Velounias, R. L., & Tull, T. J. (2022). Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, *210*(3), 201–216. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac104>
- Victoria, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., & Nussenzweig, M. C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, *120*(11), 2240–2248. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415380>
- Viklicky, O., Krystufkova, E., Brabcova, I., Sekerkova, A., Wohlfahrt, P., Hribova, P., Wohlfahrtova, M., Sawitzki, B., Slatinska, J., Striz, I., Volk, H. D., & Reinke, P. (2013). B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*, *95*(1), 148–154. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182789a24>
- Villa, G., Ricci, Z., & Ronco, C. (2015). Renal Replacement Therapy. *Critical Care Clinics*, *31*(4), 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2015.06.015>
- Virgilio, L., Isobe, M., Narducci, M. G., Carotenuto, P., Camerini, B., Kurosawa, N., Abbas-ar-Rushdi, Croce, C. M., & Russo, G. (1993). Chromosome walkline on the TCL1 locus involved in T-cell neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(20), 9275–9279. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9275>
- Virgilio, L., Narducci, M. G., Isobe, M., Billips, L. G., Cooper, M. D., Croce, C. M., & Russo, G. (1994). Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12530–12534. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12530>
- Wakim, J., Arman, E., Becker-Herman, S., Kramer, M. P., Bakos, E., Shachar, I., & Elson, A. (2017). The PTPROT tyrosine phosphatase functions as an obligate haploinsufficient tumor suppressor in vivo in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, *36*(26), 3686–3694. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.523>
- Waldmann, H. (2002). *A Personal History of the CAMPATH-1H Antibody The Immunobiology of Bone Marrow*. 19.
- Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., & Alessi, D. R. (1998). Activation of protein kinase B  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: Comparison with protein kinase B  $\alpha$ . *Biochemical Journal*, *331*(1), 299–308. <https://doi.org/10.1042/bj3310299>
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, *344*(14), 1058–1066. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>
- Wang, D., Matsumoto, R., You, Y., Che, T., Lin, X.-Y., Gaffen, S. L., & Lin, X. (2004). CD3/CD28 Costimulation-Induced NF- $\kappa$ B Activation Is Mediated by Recruitment of Protein Kinase C- $\theta$ , Bcl10, and I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  to the Immunological Synapse through CARMA1. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(1), 164–171. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.164-171.2003>
- Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J. J.-Y., & Yang-Yen, H.-F. (1999). The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex

- Containing CREB. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6195–6206. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.6195>
- Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J. L., Naiman, B., Gross, P. S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holoweckyj, N., Liu, H., Casey, K., Smith, M., Parker, M., White, N., Riggs, J., Ward, B., Bhat, G., ... Ettinger, R. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c<sup>hi</sup>T-bet<sup>+</sup> B-cells in SLE. *Nature Communications*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>
- Wang, Y. H., Tsai, D. Y., Ko, Y. A., Yang, T. T., Lin, I. Y., Hung, K. H., & Lin, K. I. (2019). Blimp-1 contributes to the development and function of regulatory B-cells. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01909>
- Wardemann, H., & Nussenzweig, M. C. (2007). B-Cell Self-Tolerance in Humans. *Advances in Immunology*, 95(07), 83–110. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)95003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)95003-8)
- Webster, A. C., Woodroffe, R. C., Taylor, R. S., Chapman, J. R., & Craig, J. C. (2005). Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: Meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *British Medical Journal*, 331(7520), 810–814. <https://doi.org/10.1136/bmj.38569.471007.AE>
- Weill, J. C., Weller, S., & Reynaud, C. A. (2009). Human marginal zone B-cells. *Annual Review of Immunology*, 27, 267–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>
- Weller, S., & Descatoire, M. (2015). Les lymphocytes B IgM+IgD+CD27+ chez l'homme Un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries encapsulées. *Médecine/Sciences*, 31(6–7), 647–653.
- Wen, L., Brill-Dashoff, J., Shinton, S. A., Asano, M., Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (2005). Evidence of marginal-zone B-cell-positive selection in spleen. *Immunity*, 23(3), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.007>
- Werner, M., Hobeika, E., & Jumaa, H. (2010). Role of PI3K in the generation and survival of B-cells. *Immunological Reviews*, 237(1), 55–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00934.x>
- Widhopf, G. F., Cui, B., Ghia, E. M., Chen, L., Messer, K., Shen, Z., Briggs, S. P., Croce, C. M., & Kipps, T. J. (2014). ROR1 can interact with TCL1 and enhance leukemogenesis in E $\mu$ -TCL1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), 793–798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308374111>
- Williams, R. C., Opelz, G., McGarvey, C. J., Weil, E. J., & Chakkerla, H. A. (2016). The risk of transplant failure with hla mismatch in first adult kidney allografts from deceased donors. *Transplantation*, 100(5), 1094–1102. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001115>
- Wimmer, C. D., Rentsch, M., Crispin, A., Illner, W. D., Arbogast, H., Graeb, C., Jauch, K. W., & Guba, M. (2007). The janus face of immunosuppression - De novo malignancy after renal transplantation: The experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney International*, 71(12), 1271–1278. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002154>
- Winslow, M. M., Gallo, E. M., Neilson, J. R., & Crabtree, G. R. (2006). The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B-cell responses. *Immunity*, 24(2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.013>
- Wojciechowski, D., & Wiseman, A. (2021). Long-term immunosuppression management opportunities and uncertainties. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16(8), 1264–1271. <https://doi.org/10.2215/CJN.15040920>
- Wood, K. J., Bushell, A., & Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nature Reviews Immunology*, 12(6), 417–430. <https://doi.org/10.1038/nri3227>

- Woodward, R. S., Kutinova, A., Schnitzler, M. A., & Brennan, D. C. (2005). Renal graft survival and calcineurin inhibitor. *Transplantation*, *80*(5), 629–633. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000184842.01686.CA>
- Wu, Q., Wang, X., Nepovimova, E., Wang, Y., Yang, H., & Kuca, K. (2018). Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: Oxidative stress, autophagy, and signalings. *Food and Chemical Toxicology*, *118*(May), 889–907. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.054>
- Yan, X. J., Albesiano, E., Zanesi, N., Yancopoulos, S., Sawyer, A., Romano, E., Petlickovski, A., Efremov, D. G., Croce, C. M., & Chiorazzi, N. (2006). B-cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(31), 11713–11718. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604564103>
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., & Tedder, T. F. (2009). The Development and Function of Regulatory B-cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The Journal of Immunology*, *182*(12), 7459–7472. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900270>
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M., & Tedder, T. F. (2008). A Regulatory B-cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity*, *28*(5), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017>
- Yau, I. W., Cato, M. H., Jellusova, J., Hurtado de Mendoza, T., Brink, R., & Rickert, R. C. (2013). Censoring of Self-Reactive B-cells by Follicular Dendritic Cell-Displayed Self-Antigen. *The Journal of Immunology*, *191*(3), 1082–1090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201569>
- Yuille, M. R., Condie, A., Stone, E. M., Wilsher, J., Bradshaw, P. S., Brooks, L., & Catovsky, D. (2001). TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosomes and Cancer*, *30*(4), 336–341. <https://doi.org/10.1002/gcc.1099>
- Zarkhin, V., Kambham, N., Li, L., Kwok, S., Hsieh, S. C., Salvatierra, O., & Sarwal, M. M. (2008). Characterization of intra-graft B-cells during renal allograft rejection. *Kidney International*, *74*(5), 664–673. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.249>
- Zhang, W., Yi, Z., Keung, K. L., Shang, H., Wei, C., Cravedi, P., Sun, Z., Xi, C., Woytovich, C., Farouk, S., Huang, W., Banu, K., Gallon, L., Magee, C. N., Najafian, N., Samaniego, M., Djamali, A., Alexander, S. I., Rosales, I. A., ... Murphy, B. (2019). A peripheral blood gene expression signature to diagnose subclinical acute rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*, *30*(8), 1481–1494. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018111098>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, *238*(1), 247–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>

## Résultats

- I. Les patients tolérants présentent une augmentation d'une population de lymphocytes B sanguins possédant un phénotype naïf  $TCL1A^{low}$

Tolerant Kidney Transplanted Patients Display an increase of a blood B-cell population with a  $TCL1A^{low}$  Naive phenotype

François Brinas, Nicolas Sailliet, Gaëlle Tilly, Laurence Delbos, Clarisse Kerleau, Magali Giral,  
Nicolas Degauque, Sophie Brouard et Richard Danger

(Article soumis)

## A. Résumé de l'article

Les patients tolérants (TOL) sont des patients transplantés rénaux présentant une fonction stable de leur greffon, en absence d'IS. Les études précédentes ont montré qu'ils présentent une plus grande fréquence et valeur absolue de LB sanguins avec un phénotype pro-apoptotique, une capacité réduite de différenciation et une expression accrue d'IL-10. *TCL1A*, qui a été montrée dans les LB comme inhibant l'apoptose et associées à l'expression de facteur de transcriptions impliquées précocement dans la différenciation des LB, est également surexprimé dans le sang des patients TOL.

Dans cet article, notre objectif a été de déterminer si l'expression de *TCL1A* dans les LB des TOL était associée à une population particulière de LB et dans quelle mesure elle pouvait être impliquée dans l'homéostasie des LB.

A partir d'échantillons de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) d'une cohorte de 8 TOL, 10 receveurs stables à 1 an de greffe (STA), 6 receveurs stables à long terme (>10 ans de greffe) et 10 volontaires sains (HV), nous avons réalisé un phénotypage de leur LB par cytométrie spectrale (32 marqueurs).

Cette analyse nous a permis de confirmer une fréquence et valeur absolue accrue de LB ainsi qu'une fréquence accrue de LB *TCL1A*<sup>+</sup> dans le sang des patients TOL. De plus, le compartiment des LB naïfs pouvait être segmenté sur la base de l'expression de *TCL1A* en 2 populations, *TCL1A*<sup>high</sup> et *TCL1A*<sup>low</sup>, avec une fréquence accrue de LB *TCL1A*<sup>low</sup> chez les TOL par rapport aux STA et LTT. En utilisant les LB de 6 nouveaux HV chez qui la population *TCL1A*<sup>low</sup> était également présente, la caractérisation transcriptionnelle des populations *TCL1A*<sup>low</sup> en comparaison des *TCL1A*<sup>high</sup> a révélé un profil pro-apoptotique, une empreinte de la signalisation d'IL-10, un défaut de différenciation et des capacités migratoire accrues chez les LB naïfs *TCL1A*<sup>low</sup>. L'émergence d'une telle population de LB *TCL1A*<sup>low</sup> est cohérente avec l'environnement tolérogène observé chez les patients TOL et pourrait participer au contrôle de l'homéostasie des cellules B chez ces patients.

## B. Introduction

After kidney transplantation, lifelong immunosuppression (IS) prevents the risk of graft rejection and maintains graft survival (Pascual et al., 2002). Unfortunately, chronic IS is associated with important side effects, including risks of opportunistic infections, cancers and nephrotoxicity (Apel et al., 2013; Gonwa et al., 2001; Rabbani et al., 2023). Concomitantly, the literature reports rare cases of solid organ recipients with long-term graft stability without any IS (Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016; Ramos et al., 1995; Roussey-Kesler et al., 2006), designated as “operationally tolerant” (TOL) (Ballet et al., 2006; Brouard et al., 2012; Roussey-Kesler et al., 2006).

Several studies reported an increase in the frequency of total peripheral B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>) in the blood of TOLs compared to HVs and other transplanted patient groups (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010), which was associated with an increase in the frequency and absolute number of early B-cell phenotypes, including transitional (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) and naive (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>) B-cells, and a decrease in the frequency of plasma cells (CD27<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> CD138<sup>+</sup>) (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Silva et al., 2012). Accordingly, TOLs display more IL-10<sup>+</sup> transitional B-cells (Blair et al., 2010) that express a higher level of IL-10 (Newell et al., 2010) with an increased blood IL-10/TNF $\alpha$  ratio (Cherukuri et al., 2014, 2021). Finally, after in vitro differentiation, naive B-cells from TOLs display higher expression and production of IL-10 than those from HVs and non-TOLs, which is associated with a defect in B-cell differentiation and an increase in the expression of apoptosis markers (Chesneau et al., 2014; Le Berre et al., 2021). Interestingly, this increase in total B-cell frequency in blood from TOLs is also associated with a higher expression of transcripts of TCL1A, a specific B-cell marker (Azim et al., 2023; Baron et al., 2015; Braud et al., 2008; Brouard et al., 2007; Danger et al., 2017; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010), which was also found to be increased in the blood of rejection-free patients compared with patients with acute and subclinical rejection (Danger et al., 2023; Heidt et al., 2015; Viklicky et al., 2013).

TCL1A is an intracellular nonenzymatic protein of 114 amino acids that acts as a coactivator of Akt kinase and is involved in other pathways in the cytoplasm and nucleus (Laine et al., 2000; Paduano et al., 2018; Pekarsky, 2000). Its overexpression in blood from TOLs is consistent with its main expression in early transitional and naive B-cells, where it acts as a hub molecular

actor notably favoring B-cell survival following BCR stimulation (Tabrizi et al., 2009). To date, TCL1A in kidney transplant patients has only been described at the transcriptional level and not at the protein level (Azim et al., 2023; Baron et al., 2015; Brouard et al., 2007; Danger et al., 2017; Heidt et al., 2015; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010; Viklicky et al., 2013). In this article, we performed exhaustive blood B-cell phenotyping to investigate whether TCL1A protein expression may be associated with specific recipients' clinical conditions. We showed that not only its transcript but also the TCL1A protein is overexpressed in B-cells from TOLs. Moreover, we showed that two populations of early B-cells can be discerned based on TCL1A protein expression and that TOLs had an increase in a naive B-cell population with a TCL1A<sup>low</sup> level, which we further characterized.

## C. Patient and Methods

### 1) Study population

This noninterventional research project involved 24 adult kidney transplant recipients followed up in Nantes, Angers, Necker and Saint-Louis Hospital and for whom data were prospectively collected in the multicenter DIVAT database approved by the CNIL (DR-2025-087 N°914184, 15/02/2015; ClinicalTrials.gov recording NCT02900040) and the French Ministry of Higher Education and Research (file 13.334-cohort DIVAT RC12\_0452, www.divat.fr). Written consent was obtained from all patients. The clinical and research activities being reported are consistent with the principles of the declarations of Istanbul and Helsinki and in line with the good practice recommendations of the University Hospital of Nantes. Normal renal function was defined as proteinuria below 0.5 g/24 h and a glomerular filtration rate (Modification of Diet in Renal Disease) over 40 mL/min. DSA monitoring was performed according to the center's standard of care. STAs were defined as patients with normal renal function at 1 year post-transplantation, and LTTs were defined as patients with normal renal function for more than 5 years post-transplantation. TOLs were defined as kidney transplanted patients with normal renal function and no IS for more than 1 year (Roussey-Kesler et al., 2006). HVs from the French Blood Institute were included thanks to the agreement CPDL-PLER-2018 180. All individual group clinical characteristics are listed in Table 1.

## 2) PBMC phenotyping by spectral cytometry

All resources and reagents are listed in Supplementary Table 1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from blood samples collected in EDTA tubes after density centrifugation. PBMCs were frozen in 1 mL of 10% fetal bovine serum in DMSO and stored at -150 °C until experimentation. PBMCs were thawed at room temperature using serum-free thawing solution according to the manufacturer's instructions and incubated in complete RPMI 1640 medium at room temperature for 1 hour. PBMCs were first stained with viability fixable dye (Live/Dead Blue). Extracellular labeling was performed in running buffer (RB): PBS with 5% m/v bovine serum albumin (BSA) and  $2 \times 10^{-3}$  M EDTA. Intracellular labeling was performed in permeabilization buffer (PB): sterile water with 5% PermWash after fixation and permeabilization for 30 minutes using Cytofix. Fluorescence-conjugated antibodies are listed in supplementary Table 2. Following intracellular labeling, cells were analyzed using a Cytex AURORA spectral flow cytometer (configuration: 5L 16UV-16V-14B-10YG-8R).

Data treatment and analyses were performed using OMIQ software (Dotmatics, [www.dotmatics.com](http://www.dotmatics.com)). Following compensation, the same gating strategy was applied for each individual to remove debris, doublets, dead cells, and auto fluorescent cells and to identify each PBMC population (Figure S1). A quality control algorithm named PeacoQC was used, allowing the removal of remaining aberrant events in the dataset (Emmaneel et al., 2022). An internal control was used in each batch of labeling and used to perform a normalization process of the final dataset called CytoNorm, allowing us to correct potential batch effects (Van Gassen et al., 2020). A final cell subsampling using 10,000 cells per sample was performed to ensure good comparability between individuals. The absolute number of PBMC subtypes was obtained as the product of their frequency and leukocyte concentration in Giga/L. We proceeded to perform supervised and unsupervised analyses of B-cells. The latter uses fit-SNE dimensional reduction to allow a two-dimensional representation of B-cell marker expression and the Flow-SOM algorithm to clustered B-cells according to B-cell marker expression.

## 3) TCL1A<sup>high/low</sup> naive B-cell RNA isolation and gene expression

PBMCs were obtained from the "buffy coat" following the same protocol as mentioned above. An enrichment of naive CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> B-cells was performed using negative selection on magnetic columns according to the manufacturer's instructions (B-cell isolation Kit II and CD27



MicroBeads; Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany). The MARIS method was used to recover total RNA following sorting of intracellular labeled cells (Hrvatin et al., 2014). Staining was performed with cell concentrate at 25 million/mL. After viability dye labeling (Fixable Viability Dye eFluor450) and extracellular labeling, fixation and permeabilization were realized using Cytotfix in the presence of 1:100 RNasin Plus RNase Inhibitor (RNasin) and washed using PB 1:25 RNasin, which was also used for intracellular labeling. Cells were then washed using RB 1:100 RNasin and resuspended in RB 1:25 RNasin for sorting. Cells were sorted on a FACS Aria sorter (BD Biosciences) using FACSDiva software. A gating strategy was applied to sort TCL1A/IgD<sup>low</sup> and TCL1A/IgD<sup>high</sup> populations in live early B-cells (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD21<sup>+</sup>) (Figure S6). Cells were collected in tubes that were precoated with SVF and supplemented with 5 mL of RB 1:25 RNasin. Cells were washed and resuspended in 150 µL of Proteinase K buffer for further RNA extraction using the miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany). During this step, we incubated the mix at 56 °C for 3 hours instead of 15' at 56 °C and 15' at 80 °C, as indicated by the manufacturer (Hrvatin et al., 2014). The quantity and quality of total RNA were measured by spectrometry (NanoPhotometer<sup>®</sup> NP80, Implen, Inc.) and electrophoresis (Caliper, Life Sciences, Inc.), respectively.

NanoString Technology (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) was used to measure the expression of the 594 genes provided in the nCounter Human Immunology v2 Panel according to the manufacturer's instructions and using 100 ng of total RNA with an RNA integrity number superior to 5. NanoString nSolver software (v 4.0) was used to normalize gene expression using the geometric mean of stable reference genes and to identify differentially expressed genes between TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cells. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using the Broad Institute's GSEA software to identify enriched gene sets from the "curated gene sets" molecular signature database (MSigDB) (Subramanian et al., 2005).

#### 4) Single-cell transcriptomic analysis of TCL1A<sup>low</sup> B-cells

To characterize the transcriptome of TCL1A<sup>low</sup> B-cells, we analyzed a single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) dataset of PBMCs from 3 STA and 3 TOL kidney transplant patients (accessible at <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>, accession project number PRJEB60962). Using Azimuth v0.4.6 and Seurat v4, we selected B-cells and TCL1A-expressing B-cells in the TOLs and STAs (Figure S10B). TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cells were separated from the latter using an arbitrary cutoff expression of 1.5 (Figure S10C). Differential expression

analysis of each subset between TOLs and STAs was performed using the FindMarkers() function from Seurat with a p value threshold set at 0.05 and a log2-fold fold change (log2FC) threshold set at 0.5.

### 5) Statistical analysis

Group comparisons were performed using nonparametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests with Dunn’s post hoc tests for two and multigroup comparisons, respectively. Frequency and absolute values of cells are analyzed with median and 95% IC. Analyses were performed using GraphPad Prism v.9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Table 1: Individual groups clinical data table. \* p-value significantly different; <sup>A</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was significantly different between STA/LTT and STA/TOL because times post-transplantation was matched between TOL and LTT in a comparability purpose. <sup>B</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was significantly different between HV/LTT and HV/TOL. <sup>C</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was only significantly different between

	Missing information	Healthy Volunteers (HV)		Stable patients at 1 year (STA)		Long term Stable patients >5 years (LTT)		Tolerant patients (TOL)		comparison
		n= 10		n= 10		n= 6		n= 8		p-value
		n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Male/Female recipients</b>	0	5/5	50.00/50.00	5/5	50.00/50.00	3/3	50.00/50.00	5/3	62.50/37.50	0.6179
<b>Allograft rank</b>	0									0.0634
First				10	100.00	6	100.00	6	75.00	
Second				0	0.00	0	0.00	2	25.00	
<b>Initial disease</b>	0									NA
Undetermined etiology				1	10.00	0	0.00	3	37.00	
Chronic glomerulonephritis				3	30.00	2	33.33	2	26.00	
Chronic interstitial nephritis, urinary, and others malformations				6	60.00	2	33.33	3	37.00	
Vascular renal diseases				0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Diabetes				0	0.00	2	33.33	0	0.00	
<b>History of diabetes</b>	0			2	20.00	2	33.33	1	12.5	0.7338
<b>History of cardiovascular disease</b>	0			2	20.00	0	0.00	2	25.00	0.8323
<b>History of malignancy</b>	0			1	10.00	1	16.66	1	12.5	0.8579
<b>Male/Female donor</b>	0			7/3	70.00/30.00	5/1	83.33/16.66	3/5	37.50/62.50	0.1786
<b>Deceased /Live donor</b>	0			7/3	70.00/30.00	6/0	100.00/0.00	5/3	62.50/37.50	0.7845
<b>HLA-A-B-DR mismatches</b>	0									NA

<b>0</b>		0	0.00	0	0.00	3	37.50	
<b>&lt;4</b>		3	30.00	2	33.33	2	25.00	
<b>&gt;3</b>		7	70.00	4	77.77	3	37.50	
<b>Depleting induction</b>	0							0.7137
Non-depleting or none		7	70.00	3	50.00	5	62.50	
Depleting		3	30.00	3	50.00	3	37.50	
<b>Immunosuppression at sampling</b>	0							NA
CNIs		10	100.00	6	100.00	0	0.00	
Cyclosporine A		2	20.00	2	33.33	0	0.00	
Tacrolimus		8	80.00	4	66.66	0	0.00	
mTOR inhibitor		0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Antiproliferative agents		8	80.00	5	83.33	0	0.00	
Steroid		5	50.00	0	0.00	0	0.00	
<b>Reject before prelevement</b>	0	2	20.00	1	16.66	2	25.00	0.8080
<b>Positive DSA during the first year</b>	0	2	20.00	0	0.00	0	0.00	0.1162
<b>Reason for IS withdrawal (medical or non compliance)</b>	0					2/6	25.00/75.00	
<b>Time post-transplant (month)</b>	0	12.00		148.50		228.50		0.0002 <sup>*,A</sup>
<b>Time without immunosuppression (month)</b>	1					145.00		
<b>Recipient Age</b>	0	37.00	48.00	57.50		54.50		0.0105 <sup>*,B</sup>
<b>Cold ischemic time (minutes)</b>	0	803.5		1163.0		1073		0.5122
<b>Donor Age (years)</b>	1	46.00		26.50		20.00		0.0083 <sup>*,C</sup>
<b>eGFR at sampling (MDRD; mL/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>	0	56.30		59.45		64.70		0.6786

## D. Results

### 1) An increased frequency of total B-cells and TCL1A<sup>+</sup> B-cells in TOLs

We performed extensive phenotyping of PBMCs (Figure S1) from HVs (n=10), STAs (n=10), LTTs (n=6), and TOLs (n=8) using spectral cytometry (Table 1). TOLs were compared to STAs representing the main group of immunosuppressed recipients for whom tolerance induction is highly needed, to LTTs with a comparable transplantation period but who were immunosuppressed and to HVs who were not immunosuppressed but had no transplantation. Altogether, we analyzed a total of 54,652,724 cells. We did not find any significant difference in the frequency and absolute number of the main peripheral blood cells, *e.g.*, CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> monocytes, CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> dendritic cells, CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK cells and CD3<sup>+</sup> T cells, between the TOL group and the other groups (Figures 1 and S2). In agreement with previous studies, we found a significant increase in the frequency and absolute number of total CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> B-cells in blood from TOLs compared with STAs and the other groups to a lesser extent (frequency  $p=0.0241$  vs. STAs,  $0.0887$  vs. HVs and  $0.0698$  vs. LTTs) (Figures 1 and S2).

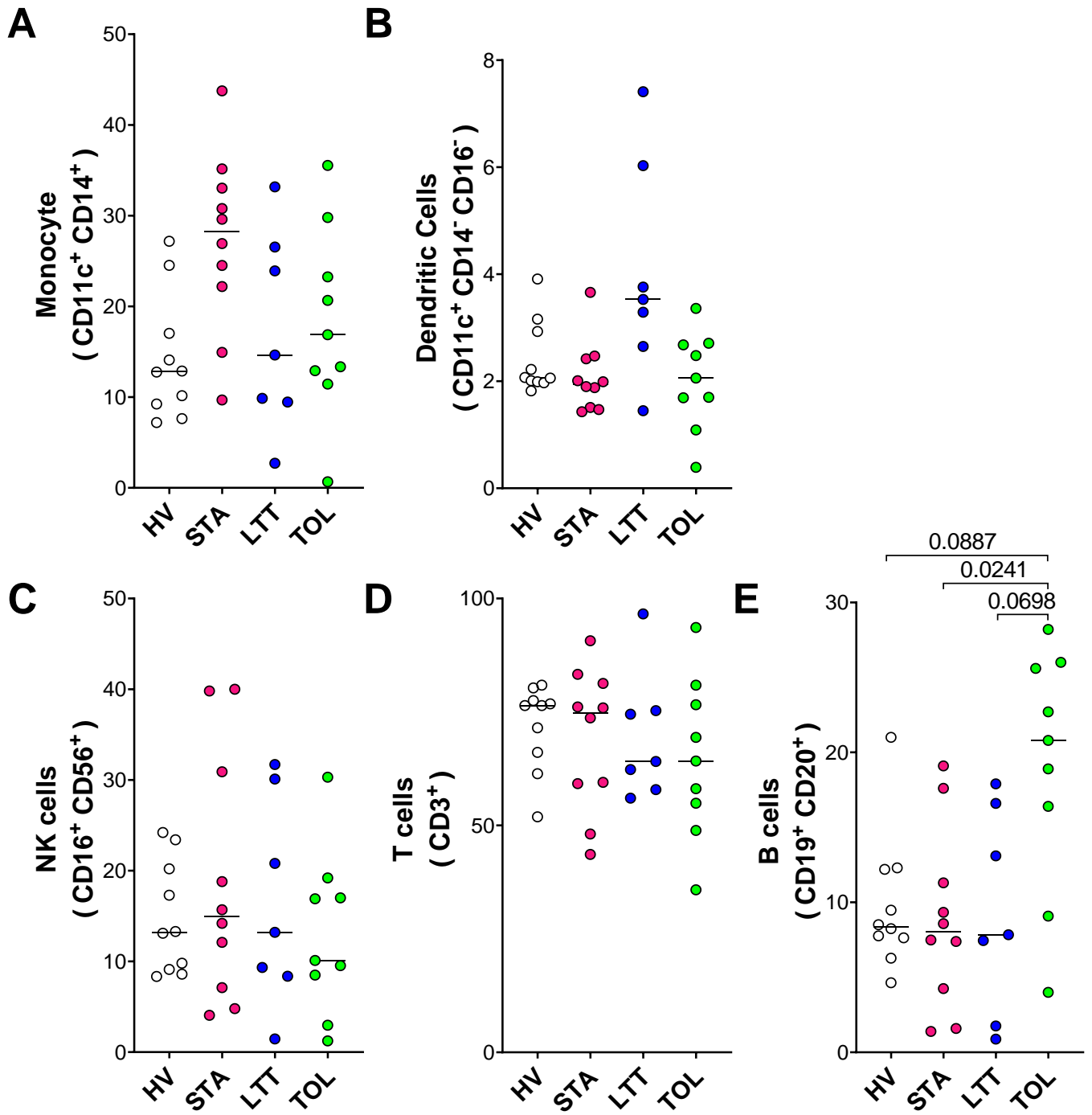


Figure 1: Main PBMCs population frequencies. Frequency median (%) in total PBMCs for each individuals groups of **A** : Monocytes (CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>). **B** : Dendritic cells (CD3<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>). Frequency median (%) in total Lymphoid Cells for each individual groups of **C** : NK cells (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>). **D** : T cells (CD3<sup>+</sup>). **E** : B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>). The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.

Accordingly, we further investigated the B-cell compartment (Figure S3). No significant difference in CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> transitional and IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>/IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> memory B-cell frequency was observed between the TOL group and the other groups (Figure 2A, 2C and 2D). We found an increase in the IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> naive B-cell frequency in TOLs ( $p= 0.0168$ ) (Figure 2B), which was associated with a decrease in the frequency of differentiated B-cells in TOLs compared with LTTs only, for the frequencies of IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> B-cells ( $p= 0.0256$  and  $0.0064$ , respectively) (Figure 2E and 2F). In accordance with previous mRNA results, the higher frequency of naive B-cells in TOLs compared to LTTs was also associated with a significantly higher frequency of B-cells expressing the TCL1A marker in total B-cells from TOLs (median: 60.7%; IC95: [5.95-81.50]) compared to LTTs (17.3%; IC95: [10.70-45.00];  $p= 0.0220$ ), whereas only a trend was found compared with HVs and STAs ( $p= 0.4067$ ;  $>0.9999$ ; respectively) (Figure 2G). Whereas TCL1A<sup>+</sup> B-cells were increased in TOLs, the level of TCL1A expression within the TCL1A<sup>+</sup> B-cells, assessed by MFI, was comparable between the different patient groups (Figure 2H). We then compared the transcriptome of TCL1A<sup>+</sup> B-cells between 3 TOLs and 3 STAs from a scRNAseq PBMC dataset. A total of 169 TCL1A<sup>+</sup> B-cells were analyzed. We did not observe any significantly differentially expressed genes between TOLs and STAs in TCL1A<sup>+</sup> B-cells.

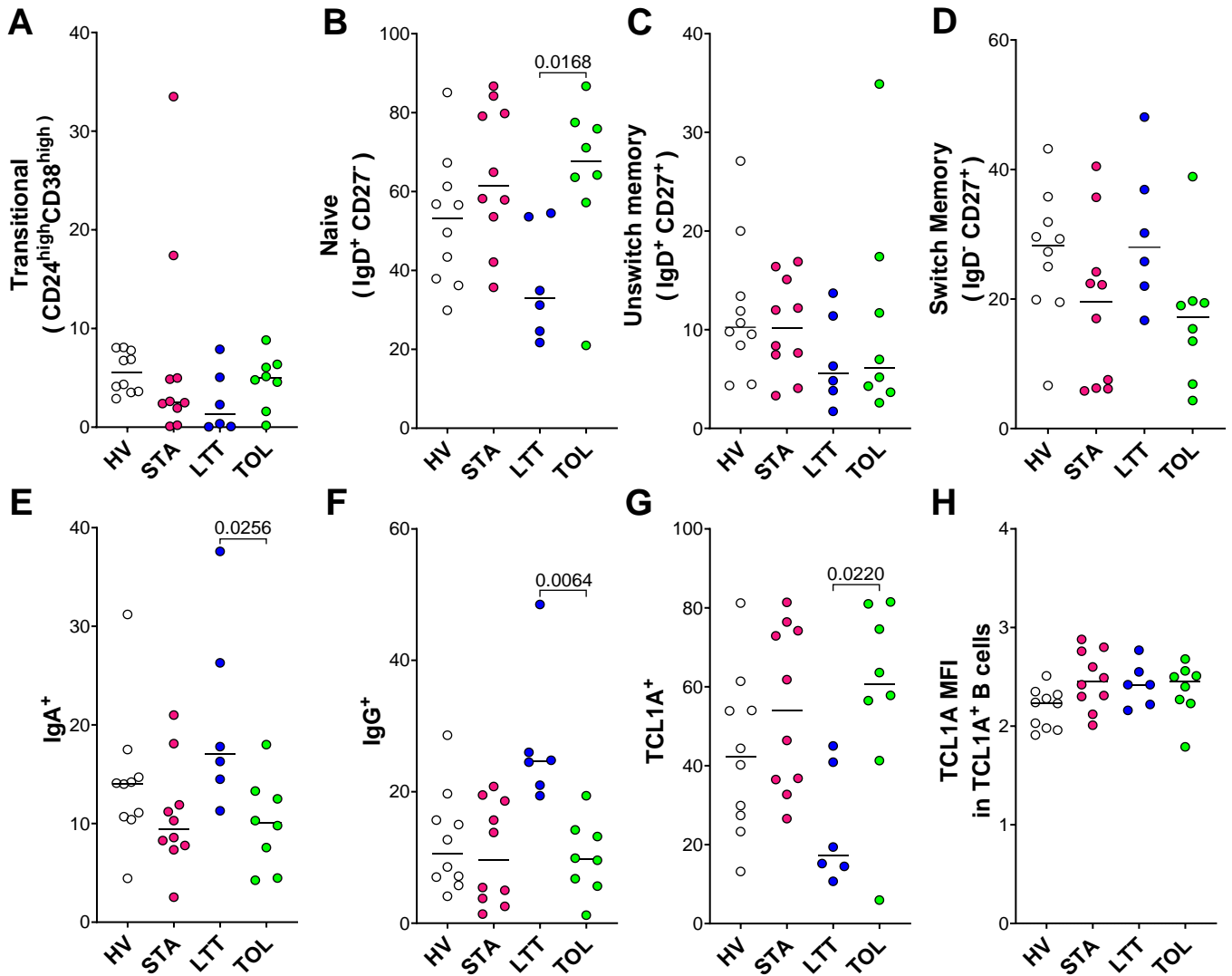


Figure 2 : B-cell subpopulations frequencies. Frequency median (%) in total B-cells for each individuals groups of **A** : Naive B-cell (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), **B** : Transitional B-cell (CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>), **C** : Unswitch memory B-cell (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), **D** : Switch memory B-cell (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), **E** : IgA<sup>+</sup> B-cell, **F** : IgG<sup>+</sup> B-cell, **G** : TCL1A<sup>+</sup> B-cells. **H** : TCL1A fluorescent mean median (%) in TCL1A<sup>+</sup> B-cells for each individuals groups. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.

## 2) A TCL1A<sup>low</sup> naive B-cell population overrepresented in TOLs

Unsupervised clustering of B-cells identified 13 clusters within total B-cells from all individuals (Figure S4) that may be categorized into three IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> early B-cell clusters (Clusters 1-3), 4 IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> unswitched memory B-cell clusters (Clusters 4-7) and 6 IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> switch memory B-cell clusters (Clusters 8-10 IgA<sup>+</sup>; Clusters 11-13 IgG<sup>+</sup>) (Figure S4A). The 3 early B-cell clusters represent all CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> naive B-cells and include CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> transitional B-cells in Cluster 3. TCL1A expression was limited to these 3 early B-cell clusters,



with lower expression of TCL1A in the first cluster, so-called TCL1A<sup>low</sup>, compared to Clusters 2 and 3 (TCL1A<sup>high</sup>) ( $p < 0.05$ ) (Figure 3D). The TCL1A<sup>low</sup> cluster also harbored reduced expression of IgD, CD24, CD38, CD9, CD25 and HLA-DR ( $p < 0.05$ ) compared to the TCL1A<sup>high</sup> subset (Clusters 2+3) (Figure S4D).

Interestingly, a significantly increased proportion of TCL1A<sup>low</sup> naive B-cells (Cluster 1) was found in the total B-cells of TOLs (37.5%) compared to those of STAs (8.47%;  $p = 0.0016$ ) and LTTs (9.09%;  $p = 0.0079$ ) and to a lesser extent of HVs (Figures 3A and S5). Accordingly, a significant decrease in the TCL1A<sup>high</sup> B-cell frequency (Clusters 2 and 3) was observed in the total B-cell population of TOLs (22.64%) compared to STAs (49.05%;  $p = 0.0499$ ) (Figure 3B), leading to a significantly higher TCL1A<sup>low</sup>/TCL1A<sup>high</sup> ratio in TOLs than in STAs ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3C).

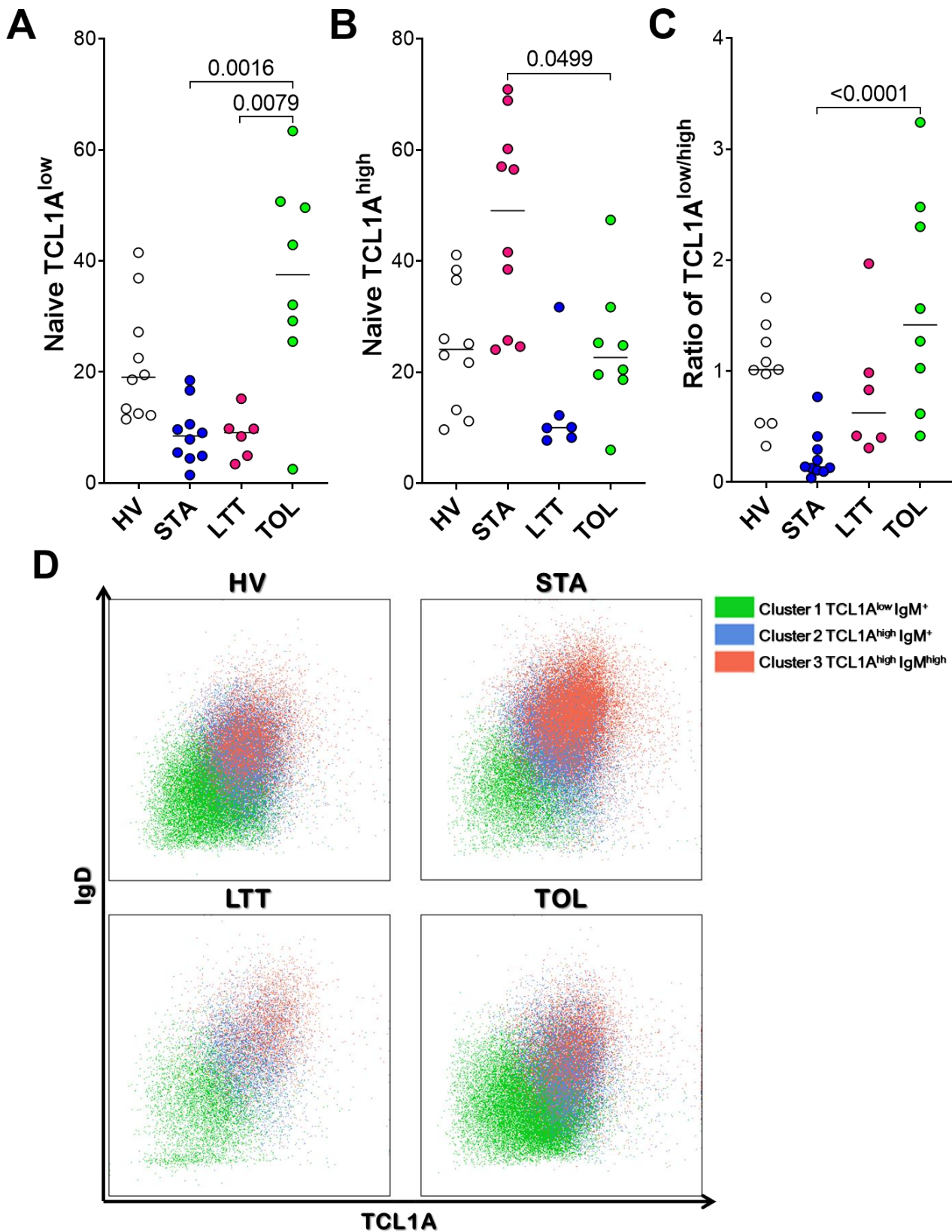


Figure 3 : Distribution of early B-cell populations based on TCL1A expression. Frequency median (%) in total B-cells for each individuals groups of **A** : cluster 1 (TCL1A<sup>low</sup>), **B** : cluster 2+3 (TCL1A<sup>high</sup>). **C** : Ratio of TCL1A<sup>low</sup> vs TCL1A<sup>high</sup> clusters frequency for each individuals groups. **D** : Scatter Plot representation of TCL1A and IgD expression in the early B-cell clusters (1-3) for each individuals groups. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test

### 3) The TCL1A<sup>low</sup> naive B-cell population harbored defective expression of genes involved in B-cell survival and differentiation and an increase in migratory and IL-10-related markers.

To deeply characterize B-cells with a naive TCL1A<sup>low</sup> phenotype, we sorted TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cells from blood from 6 HVs based on TCL1A/IgD expression (Figure S6). Gene expression was analyzed in these two B-cell subtypes with a predefined “immunology panel” of 594 genes using the NanoString hybridization-based method. Of these 594 genes, 270 were expressed among cells. Thirty genes were differentially expressed in the TCL1A<sup>low</sup> population compared with the TCL1A<sup>high</sup> population (adjusted *p* value < 0.10), with 7 upregulated and 23 downregulated genes (Figures 4A, 4B, S7, S8 and S9). We first observed a downregulation of genes involved in the BCR signalosome, *PTPN22* (log<sub>2</sub>-fold change and *p* value: -0.372; 0.0547), *MS4A1* (-0.282; 0.0334), *CD79A* (-0.262; 0.0334), and *PTPRC* (CD45RA) (-0.184; 0.052) and increased expression of *ZAP70* (0.764; 0.0334). Among the top differentially expressed genes, we observed increased expression of *CCR7* (0.528; 0.0167) and *SELL* (0.446; 0.0539) in the TCL1A<sup>low</sup> population, both of which are involved in B-cell migration. The TCL1A<sup>low</sup> population also harbors dual expression of two major antiapoptotic proteins in B-cells: increased expression of *BCL2* (0.479; 0.0334) and reduced expression of *MCL1* (-0.305; 0.0334). Additionally, in the TCL1A<sup>low</sup> population, we observed global downregulation of the NF-κB pathway, which is also involved in B-cell survival, including *CHUK* (-0.332; 0.0334), *NFKB1* (-0.305; 0.0821), *BCL10* (-0.165; 0.0334), and *PSMD7* (-0.164; 0.0838), downregulation of genes involved in antigen processing and presentation (*CTSS* (-0.248; 0.0547) and *HLA-DRA* (-0.139; 0.069)), and downregulation of genes involved in germinal center (GC) formation and B-cell differentiation (*IL21R* (-0.347; 0.0992), *TCF4* (-0.343; 0.0684), *B7RP1* (ICOSL), (-0.286; 0.0821), and *IL16* (-0.206; 0.0447)). According to GSEA, we identified only one gene set significantly enriched in TCL1A<sup>low</sup> compared to TCL1A<sup>high</sup> (nominal *p* value <5%) corresponding to the reactome interleukin 10 signaling gene set (M27605; normalized enrichment score: 1.565; nominal *p* value: 0.022), evoking an imprint of IL-10 signaling in the TCL1A<sup>low</sup> B-cell population (Subramanian et al., 2005).

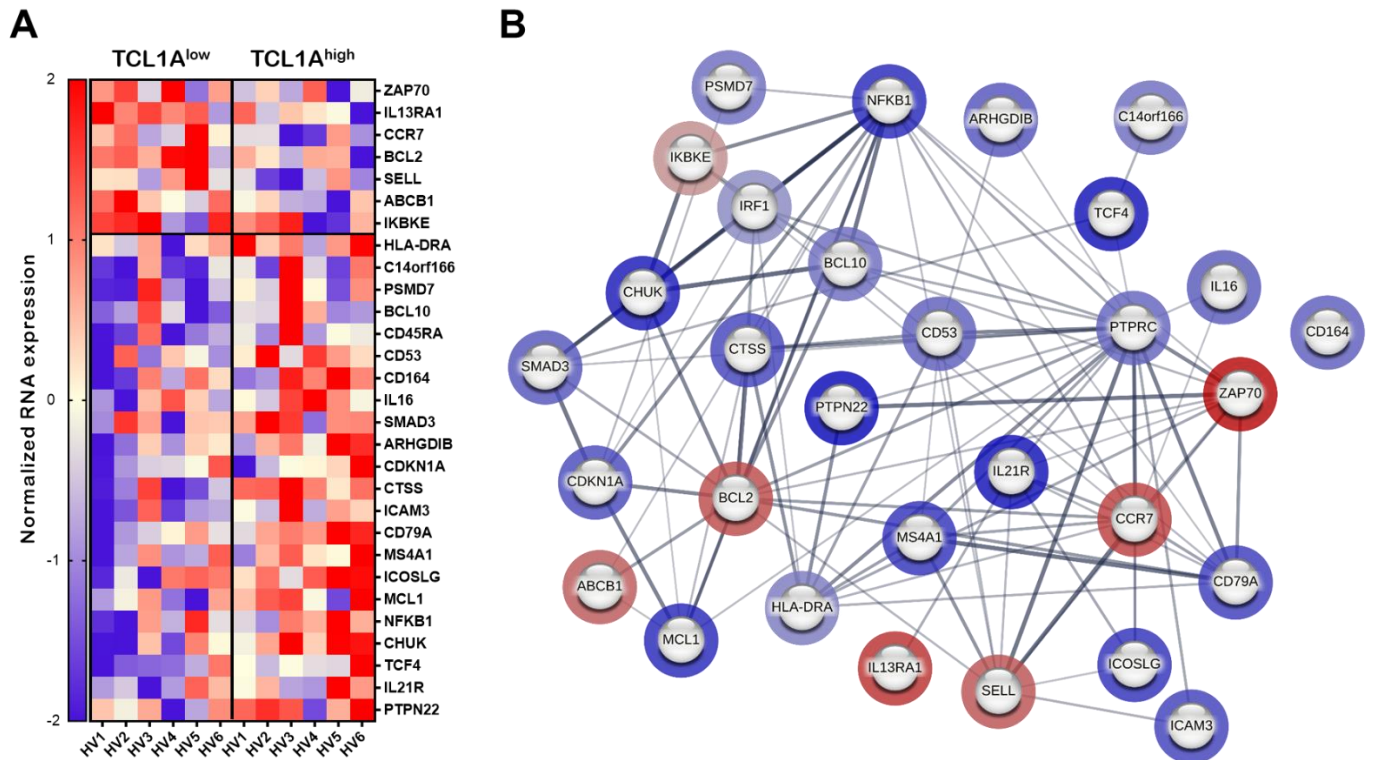


Figure 4 : Differential RNA expression in TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cell populations. **A**: HeatMap representation of normalized expression for each genes found differentially expressed (adjusted  $p$ -value  $< 0.1$ ) between TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cell population in 6 Healthy Volunteers. The upper part contain genes up regulated and the lower part genes down regulated in the TCL1A<sup>low</sup> population. **B**: Protein–protein interaction network of differentially expressed genes in TCL1A<sup>low</sup> Vs TCL1A<sup>high</sup> populations. Upregulated genes are represented in red, down-regulated genes in blue. **C**: GSEA analysis of an IL-10 signaling gene set with gene expression data from TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cells population obtained from 6 HV. Enrichment score is the level to which the analyzed gene set is increased in our genes data base.

We also assessed the transcriptomic profile of  $TCL1A^{low}$  B-cells from 3 TOLs and 3 STAs using a scRNAseq PBMC dataset.  $TCL1A^+$  B-cells were segmented into  $TCL1A^{low}$  and  $TCL1A^{high}$  subsets based on *TCL1A* expression (Figure S10B and S10C). Only 44  $TCL1A^{low}$  cells were identified (20 in TOLs, 24 in STAs) with no differentially expressed genes between TOLs and STAs. Altogether, our results highlighted the increase in a  $TCL1A^{low}$  naive B-cell population in TOLs, with a transcriptomic profile associated with a defect in survival and differentiation, increased migratory properties and IL-10 imprinting.

## E. Discussion

Operational tolerance in kidney transplantation represents an ideal condition for recipients with an important need to understand this condition and how it can be promoted. Through an exhausted blood phenotypic analysis, we confirmed the increased frequency and absolute number of total B-cells in TOLs compared with non-TOL patients and HVs (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010). We highlighted a decreased frequency of switch memory  $IgA^+/IgG^+$  B-cells in TOLs compared to LTTs, consistent with our previous study showing an increased frequency of switch memory B-cells compared to naive B-cells in very long-term stable patients (>25 years) (Dujardin et al., 2021). Conversely, we highlighted that TOLs have the highest frequency of naive B-cells ( $CD27^- IgD^+ CD24^+ CD38^+$ ), in accordance with our previous studies (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010; Silva et al., 2012), and we reported for the first time a higher frequency of B-cells expressing the *TCL1A* protein in TOLs. This finding is consistent with the fact that the *TCL1A* transcript is one of the most increased transcripts in TOL (Azim et al., 2023; Baron et al., 2015; Braud et al., 2008; Brouard et al., 2007; Christakoudi et al., 2020; Danger et al., 2017; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Our unsupervised analysis of the B-cell compartment revealed that early B-cells ( $CD27^- IgD^+$ ) can be divided into two populations based on the expression of *TCL1A*. The  $TCL1A^{low}$  subset is characterized by reduced expression of *IgD*, *CD24*, *CD38*, *CD9*, and *HLA-DR* compared to the  $TCL1A^{high}$  subset. Distribution analyses revealed a significantly increased frequency of the  $TCL1A^{low}$  subset in TOLs compared to STAs and LTTs and to a lesser extent than in HVs. The emergence of such a  $TCL1A^{low}$  naive B-cell subset in TOLs has not been described thus far.

We previously reported that after 6 days of differentiation in vitro, B-cells from TOLs display proapoptotic behavior with higher caspase-3 levels and fewer antiapoptotic genes than B-cells

from STAs (Chesneau et al., 2014). This finding was confirmed by higher Annexin V expression on Day 0 in B-cells from TOLs (Le Berre et al., 2021). Conversely, we previously reported a reduced frequency of CD38<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup> plasma cells after 6 days of in vitro differentiation in TOLs compared to STAs that was associated with decreased expression of the early differentiation transcription factors XBP1, BLIMP-1 and IRF4 (Chesneau et al., 2014). Interestingly, TCL1A in naive B-cells is known to prevent their apoptosis through Mcl-1 expression following BCR stimulation (Tabrizi et al., 2009). Moreover, in an E $\mu$ -TCL1A murine model, prolonged TCL1A expression in B-cells induced the expression of transcription factors mandatory for B-cell differentiation, notably XBP1, IRF4 and BLIMP-1 (Kriss et al., 2012). Hence, the emergence of such a TCL1A<sup>low</sup> naive B-cell subset in TOLs is consistent with a proapoptotic behavior associated with reduced differentiation capacities previously demonstrated in B-cells from TOLs.

We further characterized this naive TCL1A<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup> B-cell subset at the transcriptomic level and showed that these cells display a proapoptotic profile, a reduced differentiation ability and an IL-10 imprint, consistent with previous observations on TOL B-cells (Chesneau et al., 2014; Le Berre et al., 2021; Nova-Lamperti et al., 2017). According to their low frequency, we investigated the transcriptomic profile of early TCL1A<sup>high</sup> IgD<sup>high</sup> vs. TCL1A<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup> B-cells in 6 HVs. TCL1A<sup>low</sup> B-cell subsets show a transcriptional profile with opposite expression of two well-known antiapoptotic proteins, an increase in *BCL2* and a decrease in *MCL1*. This result is consistent with the low TCL1A expression and its role in Akt coactivation. Indeed, the PI3K-Akt pathway has been demonstrated to induce Mcl-1 expression, and TCL1A expression has been shown to be critical for naive B-cell survival following BCR stimulation by induction of Mcl-1 expression (Tabrizi et al., 2009; Wang et al., 1999). TCL1A<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup> B-cells are also associated with reduced expression of *PTPN22*, a phosphatase that acts to dampen BCR signaling and whose depletion in chronic lymphocytic leukemia (CLL) induces B-cell apoptosis after antigen stimulation (Negro et al., 2012). In addition, we identified decreased expression of several NF- $\kappa$ B pathway components involved in B-cell apoptosis. *CHUK* has been shown to participate in the degradation of the proapoptotic protein Bad following BAFF stimulation (Enzler et al., 2006). *NFKB1* favors neutralization of the proapoptotic protein Bim following TLR4 stimulation (Banerjee et al., 2008). *BCL10*, which is involved in apoptotic processes, has been shown to favor B-cell survival following BCR stimulation through NF- $\kappa$ B activation (Tian et al., 2005).

Additionally, downregulation of *PSMD7*, a 19S proteasome subunit involved in several carcinomas, induces cell apoptosis (Shi et al., 2018). Moreover, we observed a downregulation of *CTSS*, coding for Cathepsin S, whose inhibition promotes Bim expression at the post-translational level (Seo et al., 2018). In addition to *CTSS*, we found reduced expression of *HLA-DRA*, which also showed a decreased protein level in the  $TCL1A^{\text{low}}$  population. Both proteins are highly implicated in antigen processing and presentation by B-cells (Guo-Ping et al., 1999; Pesando & Graf, 1986). Moreover, the  $TCL1A^{\text{low}}$  subset harbored decreased expression of cellular factors involved in T-dependent B-cell activation, GC formation and B-cell differentiation, including *B7RP1* (ICOSL), which is involved in T-B-cell interactions in GC and plasma cell generation (Liu et al., 2015); *IL21R*, whose signaling is required in T-dependent B-cell activation and plasma cell differentiation (Kuchen et al., 2007); *IL16*, which acts as a chemotactic factor for Tfh and dendritic cells (Kaser et al., 2000); and *TCF4*, which is required for B-cell differentiation in GC and notably activates *Blimp-1* and *Xbp-1* expression (Wöhner et al., 2016). Altogether, this transcriptomic profile reflects a proapoptotic character and a reduced propensity for activation and differentiation in the  $TCL1A^{\text{low}}$  naive B-cell population. This finding is consistent with previous observations on TOL B-cells (Chesneau et al., 2014; Le Berre et al., 2021) and the fact that this  $TCL1A^{\text{low}}$  population is increased in blood from TOLs.

Consistent with a  $TCL1A/IgD^{\text{low}}$  phenotype, we observed a downregulation of several BCR signaling factors, including *PTPN22*, *MS4A1* (CD20), *CD79A* and *PTPRC* (CD45RA), in the sorted  $TCL1A^{\text{low}}$  population. These results are consistent with a recent study showing a higher frequency of B-cells with early phenotypes in TOLs, which was associated with the downregulation of genes related to alloimmune pathways, notably *CD79A*, *HLA-A* and *LYN*, in these cells (Bae et al., 2023). In addition to this BCR signalosome downregulation, based on GSEA, we observed a significant enrichment of IL-10 reactome signaling, indicating an imprint of IL-10 signaling in the  $TCL1A^{\text{low}}$  B-cell subset. Interestingly, Nova-Lamperti *et al.* reported reduced BCR signaling based on ERK phosphorylation in B-cells from TOLs compared to HVs with higher expression and production of IL-10 in total B-cells of TOLs compared to HVs (Nova-Lamperti et al., 2017), consistent with our previous observations of increased IL-10 expression and production in TOL B-cells on Day 4 of differentiation (Chesneau et al., 2014). This decreased BCR signaling and increased propensity for IL-10 expression in TOLs are concordant

with our findings on the  $TCL1A^{low}$  population showing a reduced BCR signalosome and an increase in the IL-10 reactome, which may suggest tolerogenic behavior in this population.

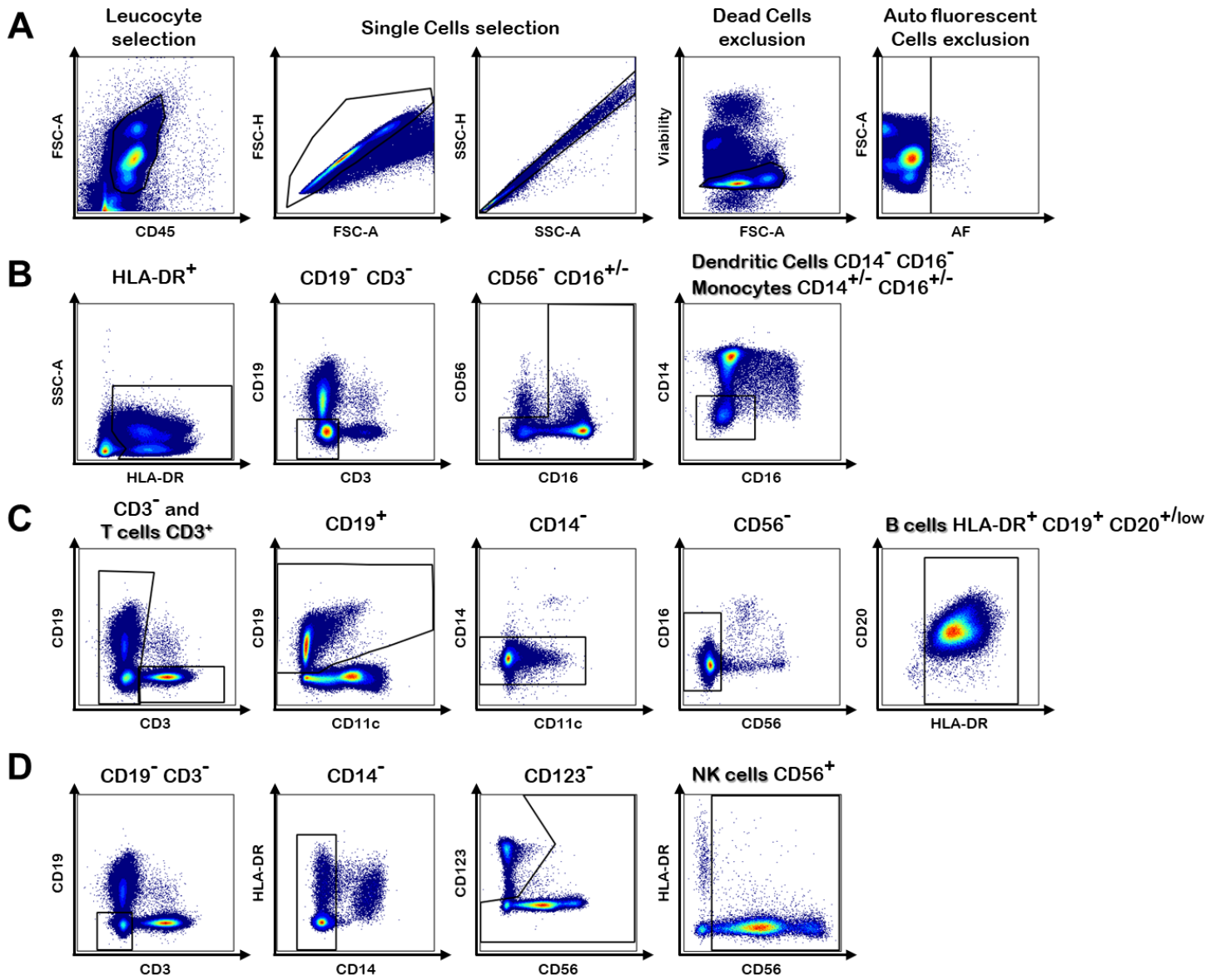
We also found increased expression of *ZAP70* in  $TCL1A^{low}$  B-cells, which is involved in T-cell receptor signaling and is also expressed physiologically in some peripheral human B-cell subsets (Nolz et al., 2005). High expression of both *TCL1A* and *ZAP70* has been shown to be a predictor of progressive CLL disease in B-cells with unmutated immunoglobulin variable chain regions. Surprisingly, here, increased *ZAP70* expression was associated with the  $TCL1A^{low}$  subset (Herling et al., 2009; Wiestner et al., 2003). It has been shown that ZAP-70 expression in B-cells induces *CCR7* and *CD62L* expression and enhances B-cell migration to CCL21 (Calpe et al., 2011). Consistently, we found increased expression of both *CCR7* and *CD62L* (*SELL*) in the  $TCL1A^{low}$  subset, suggesting enhanced migratory capacities. This observation needs to be validated at the protein level since the  $TCL1A/IgD^{high}$  sorted subset may contain a small portion of transitional B-cells, shown to variously express *CCR7* and *CD62L* according to their transitional subset (Meyer-Bahlburg et al., 2008; Zhang et al., 2021). However, this result suggests an increased capacity of this population to transit from the periphery to tissues, which in the context of renal transplantation is a mandatory parameter if this population does participate in tolerance maintenance since this phenomenon notably occurs at the tissue level. Further characterization of  $TCL1A^{low}$  B-cells in TOLs using scRNA-seq revealed no difference in the  $TCL1A^{low}$  B-cell subset between TOLs and STAs.

To conclude, from a large phenotypic study, we highlighted the emergence of a naive  $TCL1A^{low}$   $IgD^{low}$  B-cell subset increased in the blood of TOLs. Their characterization at the transcriptomic level provides evidence of a proapoptotic profile, a reduced differentiation ability, an IL-10 imprint and increased migratory abilities.

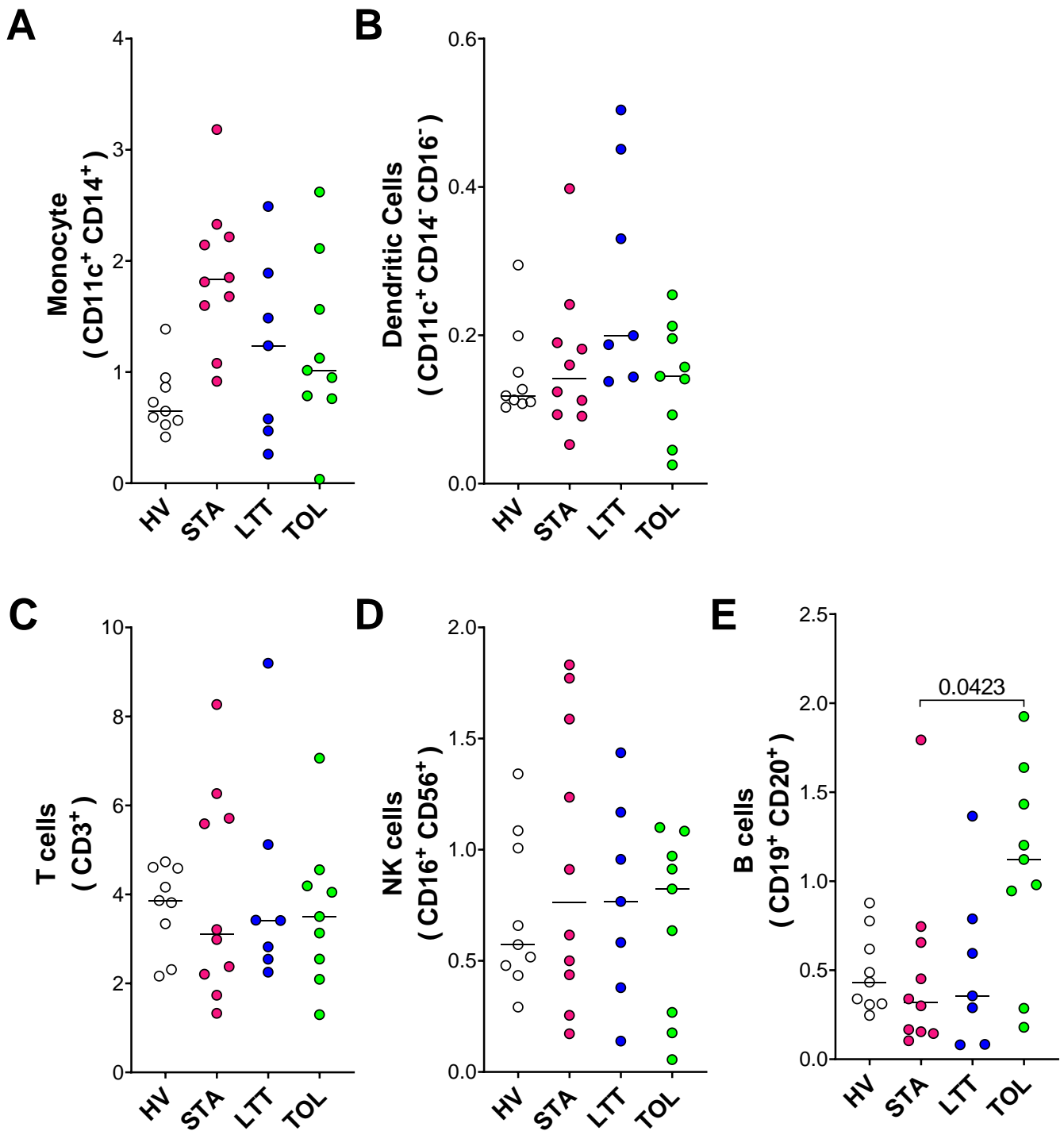
An increased proportion of such B-cell compartments in patients who develop tolerance may contribute to maintaining fine control of B-cell homeostasis, favoring long-term graft stability. Further characterization of these cells and confirmation at a functional level may provide important insight into the understanding of operational tolerance and B-cell biology.

## F. Supplementary data

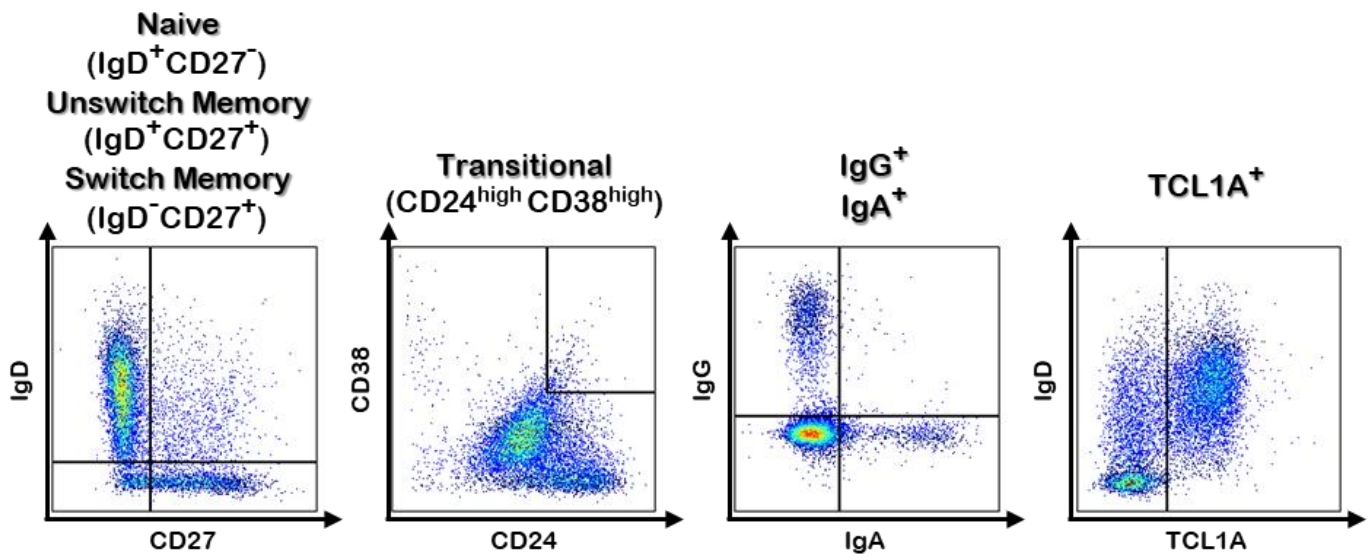




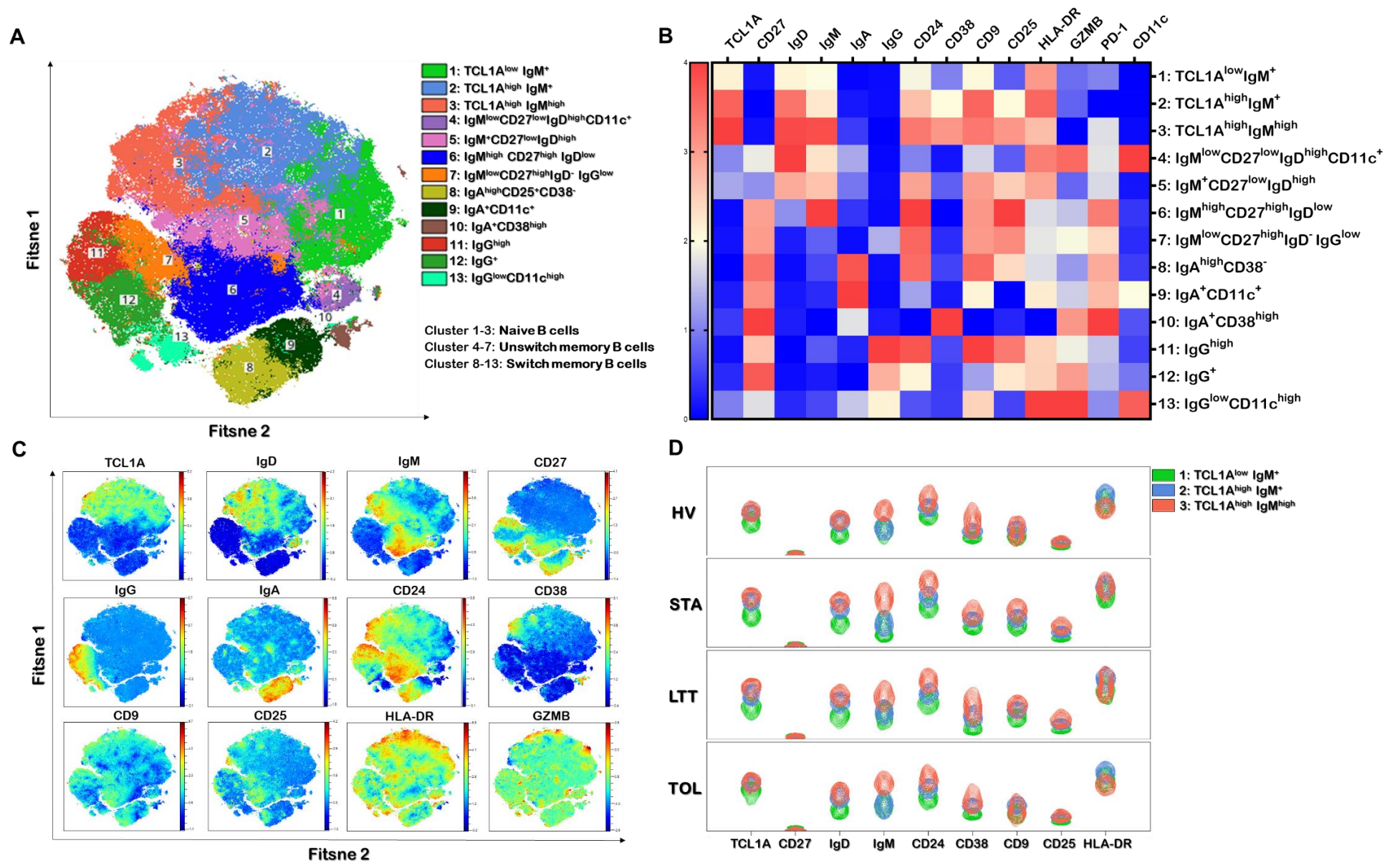
Supplementary Figure 1: Gating strategy applied to select **A** : singlets, lives and not auto fluorescent PBMCs, **B** : monocytes (CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) and dendritic cells (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>), **C** : T (CD3<sup>+</sup>) and B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>), **D** : NK cells (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>).



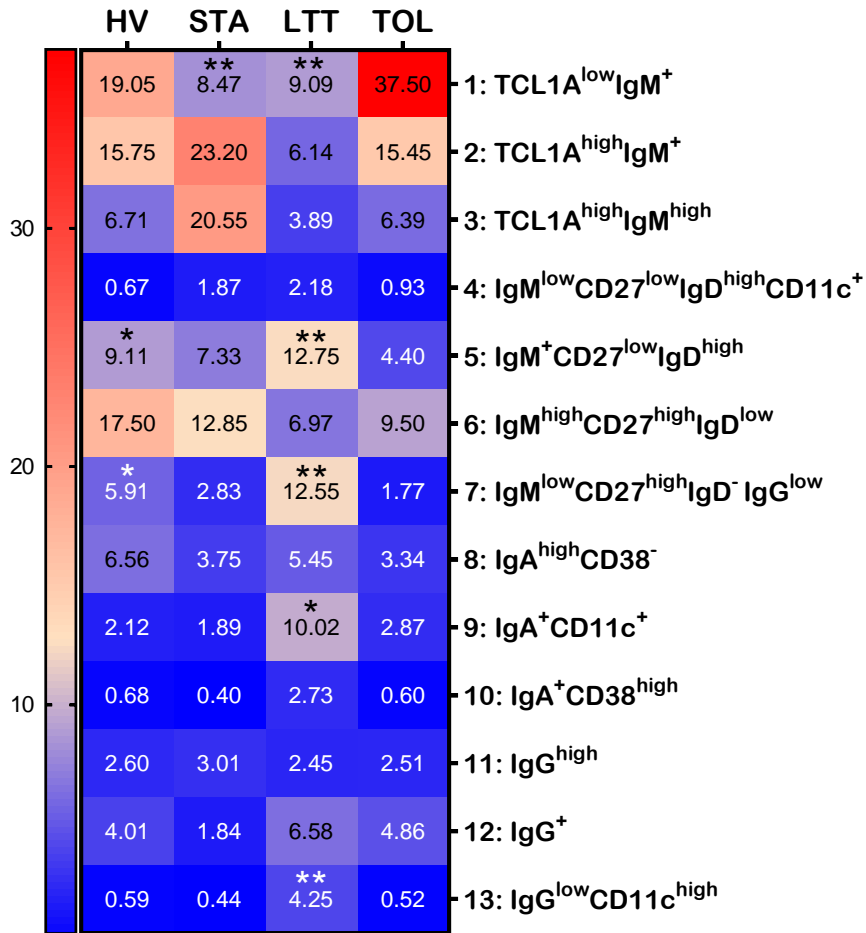
Supplementary Figure 2: Main PBMCs pollutions absolute values. Absolute number median (Giga/L) for each individuals groups of **A** : Monocytes (CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>), **B** : Dendritic cells (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>), **C** : T cells (CD3<sup>+</sup>), **D** : NK cells (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>), **E** : B-cells (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>). The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



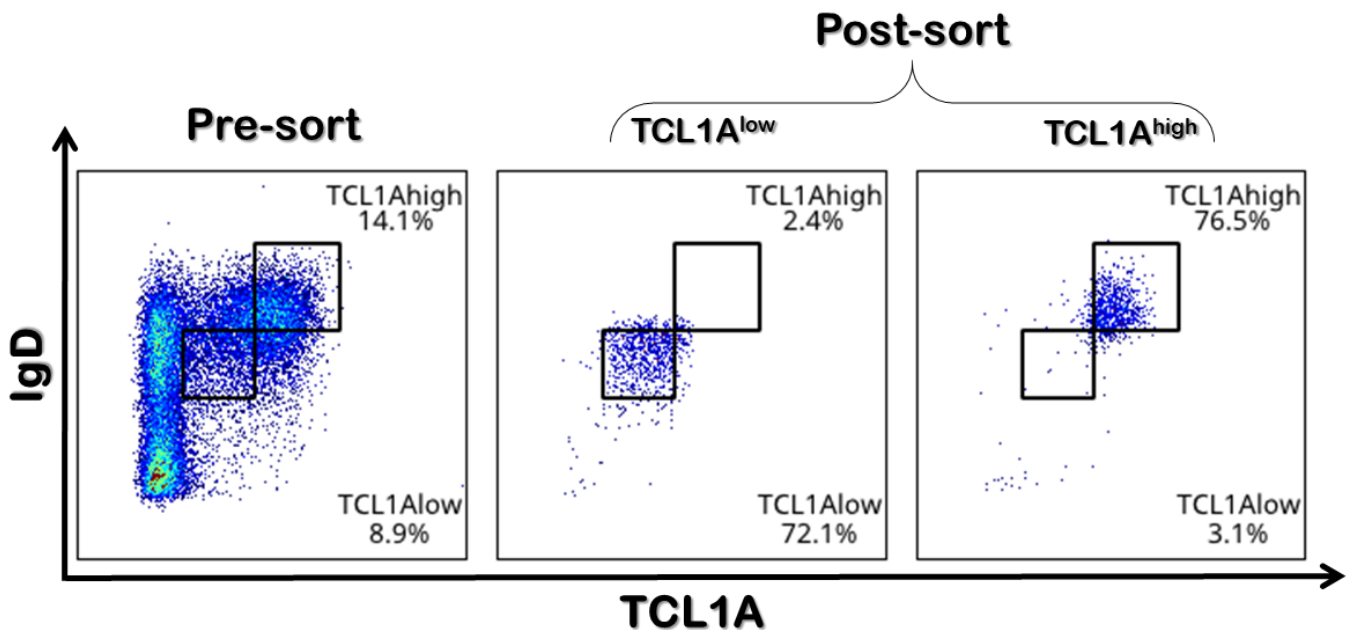
Supplementary Figure 3: Gating strategy applied in total B-cells to select Naive B-cell (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), Unswitch memory B-cell (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), Switch memory B-cell (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), Transitional B-cell (CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>), IgA<sup>+</sup> B-cell, IgG<sup>+</sup> B-cell, TCL1A<sup>+</sup> B-cells..



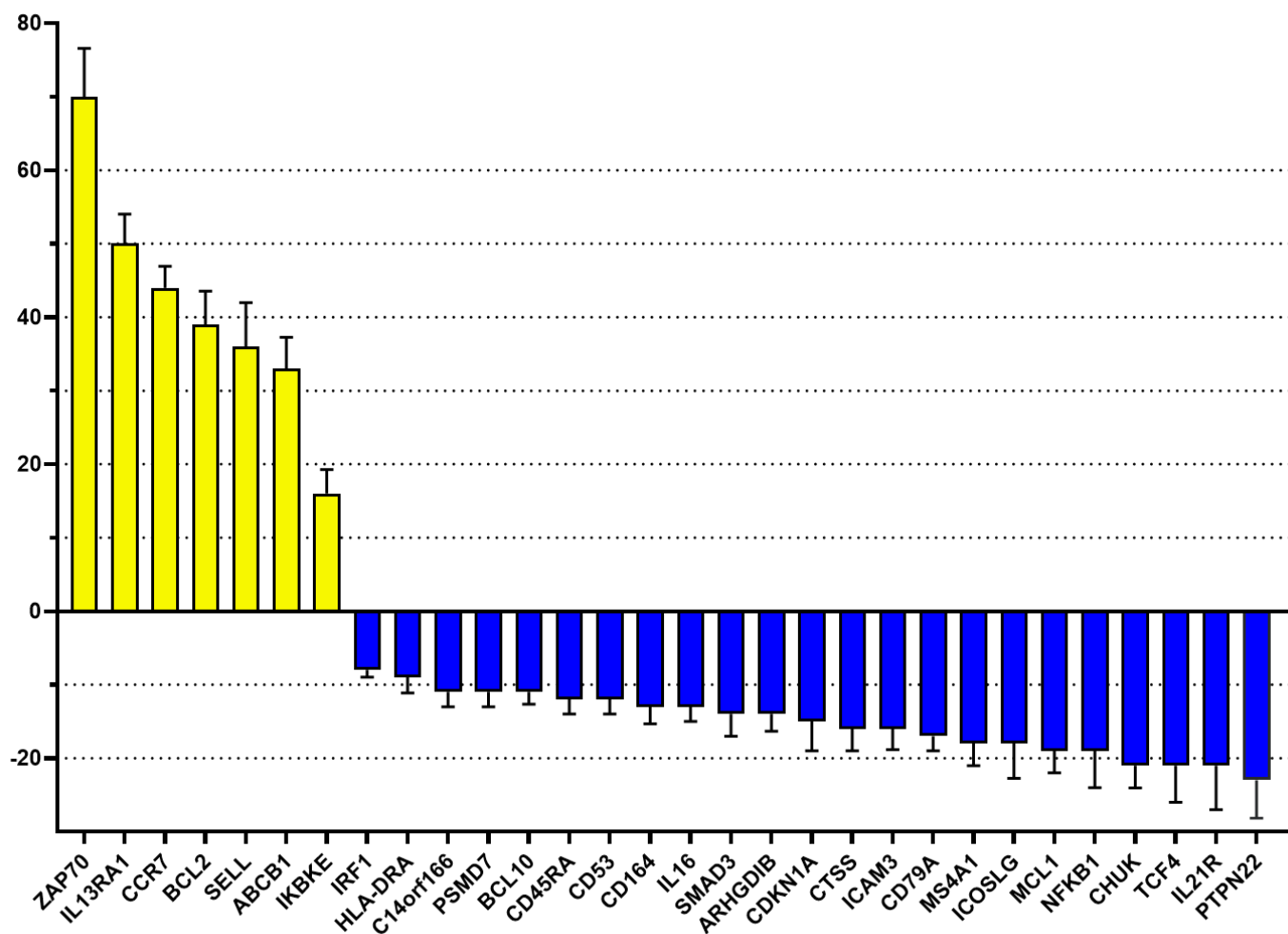
Supplementary Figure 4: Cleusturization of B-cells. **A** : Fitsne representation of the total B-cells of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : HeatMap representation of each B-cell markers expression in the 13 B-cells clusters of Healthy Volunteers. **C** : Fitsne representation of the total B-cells of the individuals of the cohort colored according to their expression of B-cells markers. **D** : Contour Plot representation of B-cell markers expression in the 3 early B-cells clusters for each individuals groups-



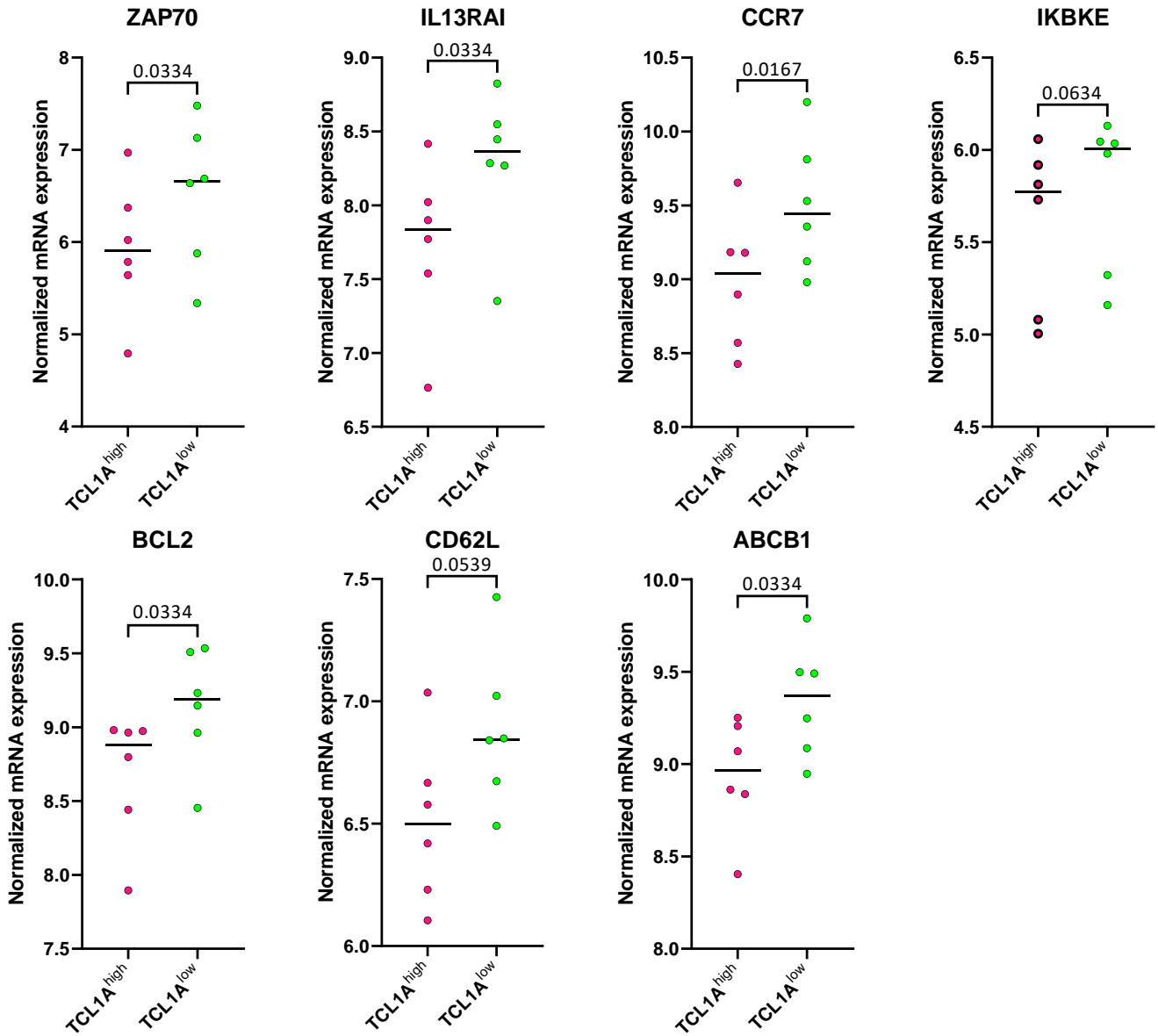
Supplementary Figure 5: HeatMap representation of the frequency median (%) of the 13 B-cell clusters for each individuals groups. Asterisks correspond to the significance of cluster median frequency differences in each group compared to TOL (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).



Supplementary Figure 6: Gating strategy in a representative healthy individuals for the sorting of  $TCL1A^{low}$  and  $TCL1A^{high}$  populations with representation of cells before sorting and post sort of  $TCL1A^{low}$  and  $TCL1A^{high}$  populations.

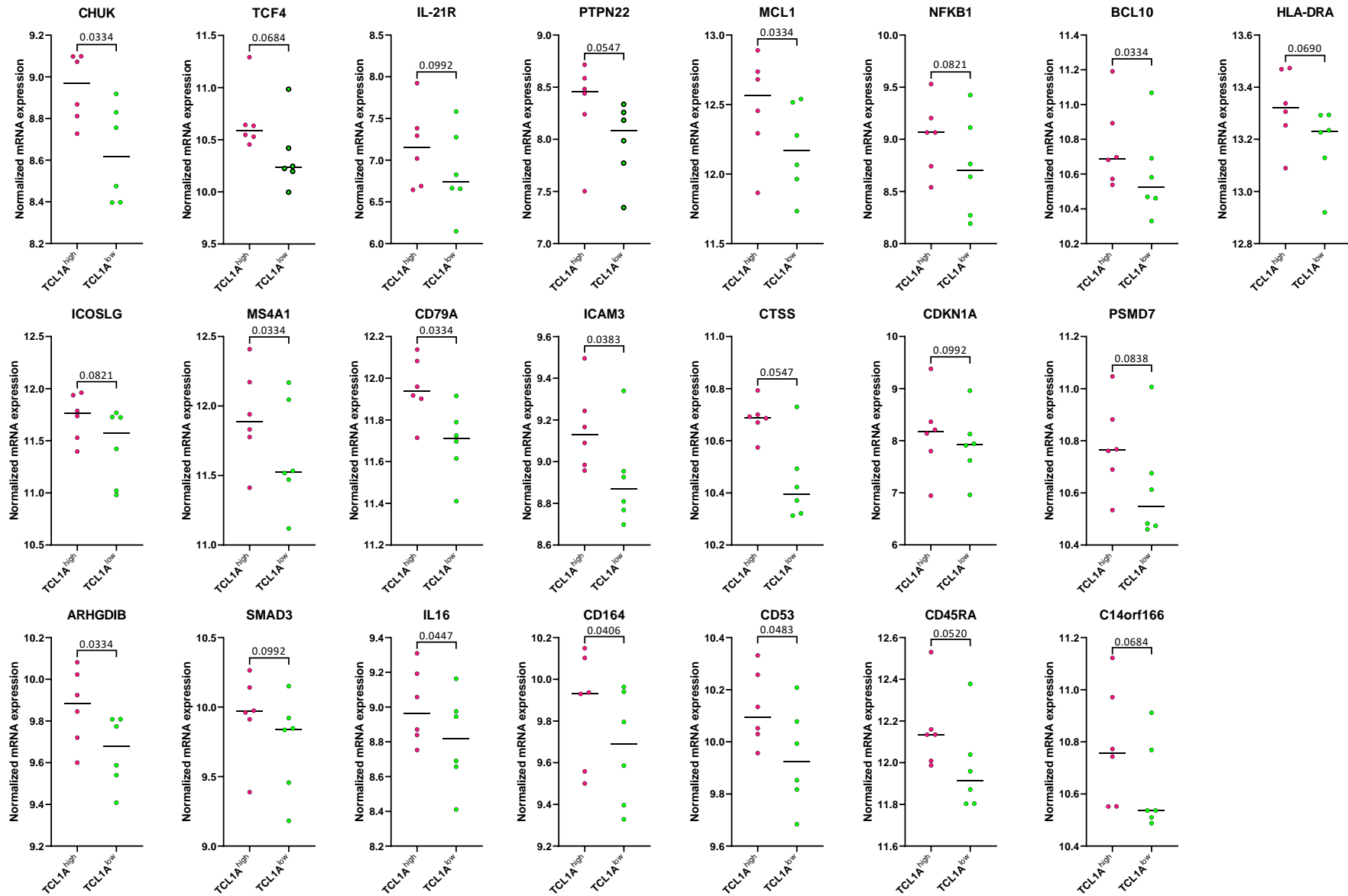


Supplementary Figure 7: Representation of the expression variation for each genes found differentially express in the  $TCL1A^{low}$  population compared with  $TCL1A^{high}$  population. In yellow the up-regulated genes and in blue the down regulated genes in the  $TCL1A^{low}$  compared to the  $TCL1A^{high}$  population. Each histogram indicate the mean of expression variation and bars the standard deviation in the 6 healthy individuals.



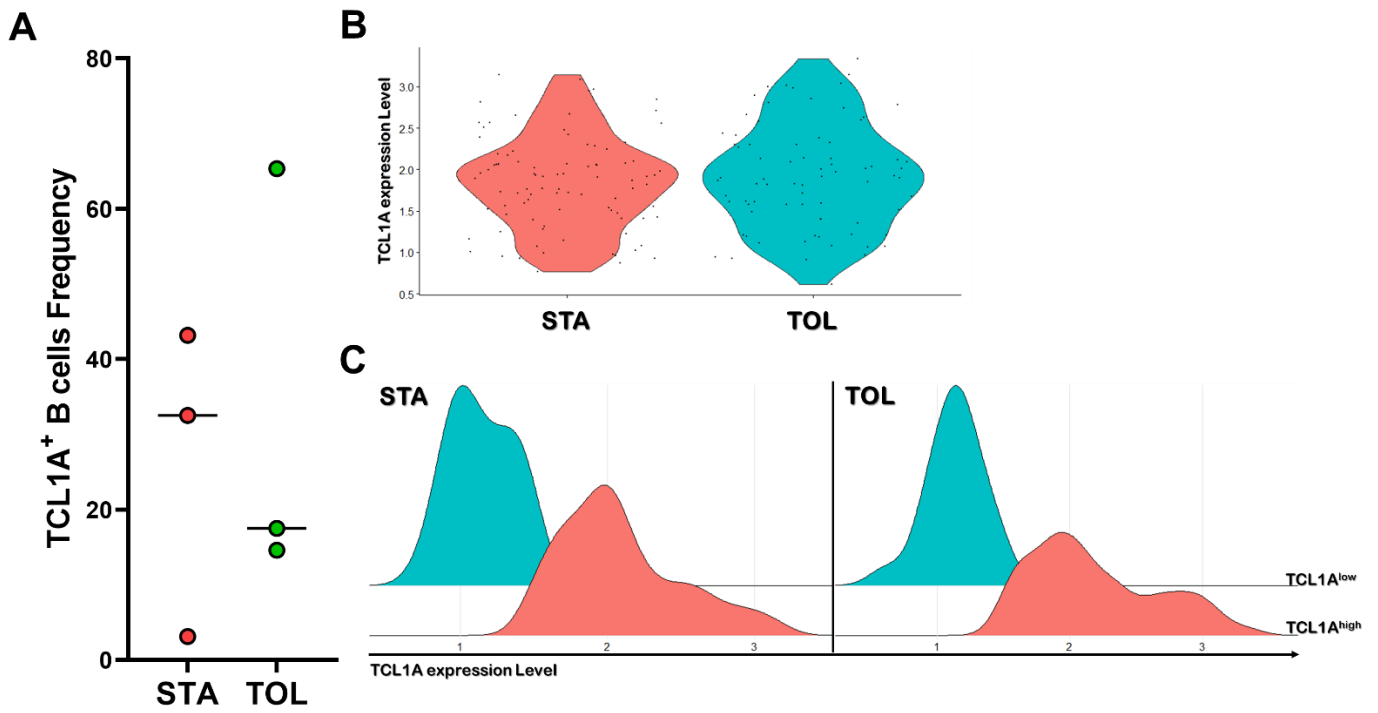
Supplementary Figure 8: Normalized median expression of mRNA genes found up-regulated in *TCL1A*<sup>low</sup> population compared with *TCL1A*<sup>high</sup> population. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric Wilcoxon test.





Supplementary Figure 9: Normalized median expression of mRNA genes found down-regulated in  $TCL1A^{low}$  compared with  $TCL1A^{high}$  population. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric Wilcoxon test.





Supplementary Figure 10: TCL1A<sup>+</sup> B-cells transcriptome study in a PBMC scRNAseq dataset of 3 TOL and 3 STA. **A:** Frequency median (%) in total B-cells of TCL1A<sup>+</sup> cells. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P value was calculated using Mann-Witney test. **B:** Violin representation of TCL1A RNA expression level in TCL1A<sup>+</sup> B-cells in STA and TOL. **C:** Ridge Plot representation of TCL1A RNA expression level in TCL1A<sup>low</sup> and TCL1A<sup>high</sup> B-cells in STA and TOL.

Resource or Reagent	Provider
Cytofix #554655	BD Bioscience
Fixable viability dye: Live/Dead Blue	ThermoFisher
Fixable Viability Dye: eFluor450	eBioscience
Lymphocyte separation medium	Eurobio-scientific
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen
Naive CD19+ CD27- B-cells enrichment: B-cell isolation kit II; CD27 microbeads	Miltenyi
PermWash # 51-2091K2	BD Bioscience
RNasin Plus RNase inhibitor	Promega
RPMI 1640	Invitrogen
Serum-free thawing solution	Cellular Technology Limited

*Supplementary Table 1: Listing of resources and reagents used in this work.*

Target	Fluorochrome	Clone Name	Provider
CD11b <sup>1,A</sup>	PCPCy5.5	ICRF44	Biolegend
CD11c <sup>1,A</sup>	BUV661	B-ly6	BD Biosciences
CD123 <sup>1,A</sup>	AF647	9F5	BD Biosciences
CD138 <sup>1,A</sup>	BUV737	MI15	BD Biosciences
CD141 <sup>1,A</sup>	BB515	1A4	BD Biosciences
CD141 <sup>1,A</sup>	SparkBlue550	63D3	Biolegend
CD158a <sup>1,A</sup>	BV711	HP-3E4	BD Biosciences
CD158b <sup>1,A</sup>	BUV563	CH-L	BD Biosciences
CD158e1 <sup>1,A</sup>	BV750	DX9	BD Biosciences
CD159a <sup>1,A</sup>	BV650	131411	BD Biosciences
CD159c <sup>1,A</sup>	BUV615	134591	BD Biosciences
CD16 <sup>1,A</sup>	BUV496	3G8	BD Biosciences
CD19 <sup>1,A</sup>	BUV805	SJ25C1	BD Biosciences
CD19 <sup>2,A</sup>	FITC	HIB19	BD Biosciences
CD20 <sup>1,A</sup>	PacificOrange	HI47	Thermo Fisher
CD21 <sup>2,A</sup>	PE-CF594	B-ly4	BD Biosciences
CD24 <sup>1,A</sup>	PEDz594	ML5	Biolegend
CD25 <sup>2,A</sup>	PE AF700	CD25-3G10	Thermo Fisher
CD27 <sup>1,A</sup>	APC	M-T271	Biolegend
CD27 <sup>2,A</sup>	PE-Cy7	1A4CD27	Beckman Coulter
CD3 <sup>1,A</sup>	PE-Cy5	HIT3a	BD Biosciences
CD38 <sup>1,A</sup>	APC-Fire810	HIT2	Biolegend
CD45 <sup>1,A</sup>	PerCP	2D1	Biolegend

CD56 <sup>1,A</sup>	APCF750	5.1H11	Biolegend
CD9 <sup>1,A</sup>	BV510	M-L13	BD Biosciences
GZMB <sup>1,B</sup>	PE	GB11	BD Biosciences
HLA-DR <sup>1,A</sup>	PE Fire810	L243	Biolegend
IgA <sup>1,A</sup>	FITC	Polyclonal	Jackson Immuno Research
IgD <sup>1,A</sup>	AF700	IA6-2	Biolegend
IgD <sup>2,A</sup>	PE	IA6-2	BD Biosciences
IgG <sup>1,A</sup>	BV605	G18-145	BD Biosciences
IgM <sup>1,A</sup>	BV570	MHM-88	Biolegend
IL-10 <sup>1,B</sup>	BV421	JES3-9D7	Biolegend
Ki67 <sup>1,B</sup>	BUV395	B56	BD Biosciences
PD-1 <sup>1,A</sup>	BV785	EH12.2H7	Biolegend
TCL1A <sup>1,B</sup>	PE-Vio770	REA289	Miltenyi
TCL1A <sup>2,B</sup>	APC	REA289	Miltenyi

---

Supplementary Table 2: Listing of antibodies used for cytometry labeling. <sup>1</sup>Used for spectral cytometry PBMC phenotyping; <sup>2</sup>used for TCL1A<sup>low/high</sup> populations sorting; <sup>A</sup>extra cellular labelling; <sup>B</sup>intra cellular labelling.

## G. Références

- Apel, H., Walschburger-Zorn, K., Häberle, L., Wach, S., Engehausen, D. G., & Wullich, B. (2013). De novo malignancies in renal transplant recipients: Experience at a single center with 1882 transplant patients over 39 yr. *Clinical Transplantation*, 27(1), 30–36. <https://doi.org/10.1111/ctr.12050>
- Azim, S., Zubair, H., Rousselle, T., McDaniels, J. M., Shetty, A. C., Kuscu, C., Kuscu, C., Talwar, M., Eason, J. D., Maluf, D. G., & Mas, V. R. (2023). Single-cell RNA sequencing reveals peripheral blood mononuclear immune cell landscape associated with operational tolerance in a kidney transplant recipient. *American Journal of Transplantation*, December 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.04.035>
- Bae, H., Lee, H., Ryu, J. H., Jang, J. H., Lee, J., Ko, G. Y., Yang, C. W., Chung, B. H., & Oh, E.-J. (2023). Cellular and genetic signatures of operational tolerance in kidney transplant recipients through single cell RNA sequencing analysis. *HLA*, 1–15. <https://doi.org/10.4285/atw2021.po-1109>
- Ballet, C., Roussey-Kesler, G., Aubin, J. T., Brouard, S., Giral, M., Miqueu, P., Louis, S., Van Der Werf, S., & Souillou, J. P. (2006). Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *American Journal of Transplantation*, 6(11), 2796–2801. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01533.x>
- Banerjee, A., Grumont, R., Gugasyan, R., White, C., Strasser, A., & Gerondakis, S. (2008). NF- $\kappa$ B1 and c-Rel cooperate to promote the survival of TLR4-activated B-cells by neutralizing Bim via distinct mechanisms. *Blood*, 112(13), 5063–5073. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-120832>
- Baron, D., Ramstein, G., Chesneau, M., Echassieriau, Y., Pallier, A., Paul, C., Degauque, N., Hernandez-Fuentes, M. P., Sanchez-Fueyo, A., Newell, K. A., Giral, M., Souillou, J. P., Houlgatte, R., & Brouard, S. (2015). A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney International*, 87(5), 984–995. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.395>
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B-cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, 32(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Braud, C., Baeten, D., Giral, M., Pallier, A., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Chevalier, C., Lebars, A., Léger, J., Moreau, A., Pechkova, E., Nicolini, C., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), 1681–1692. <https://doi.org/10.1002/jcb.21574>
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S. C., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., Dupont, A., Pallier, A., Moreau, A., Louis, S., Ruiz, C., Salvatierra, O., Souillou, J. P., & Sarwal, M. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15448–15453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705834104>
- Brouard, S., Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A., Guillot-Guegen, C., Ashton-Chess, J., Le Roux, S., Harb, J., Roussey, G., Subra, J. F., Villemain, F., Legendre, C., Bemelman, F. J., Orlando, G., Garnier, A., Jambon, H., ... Giral, M. (2012). The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *American Journal of Transplantation*, 12(12), 3296–3307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04249.x>

- Calpe, E., Codony, C., Baptista, M. J., Abrisqueta, P., Carpio, C., Purroy, N., Bosch, F., & Crespo, M. (2011). ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*, 118(16), 4401–4410. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333682>
- Cherukuri, A., Rothstein, D. M., Clark, B., Carter, C. R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., Hewitt, E., Salama, A. D., & Baker, R. J. (2014). Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- $\alpha$  expression ratio in regulatory B-cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1575–1585. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080837>
- Cherukuri, A., Salama, A. D., Mehta, R., Mohib, K., Zheng, L., Magee, C., Harber, M., Stauss, H., Baker, R. J., Tevar, A., Landsittel, D., Lakkis, F. G., Hariharan, S., & Rothstein, D. M. (2021). Transitional B-cell cytokines predict renal allograft outcomes. *Science Translational Medicine*, 13(582). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe4929>
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D. A., Degauque, N., Souillou, J. P., Tarte, K., & Brouard, S. (2014). Unique B-cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 14(1), 144–155. <https://doi.org/10.1111/ajt.12508>
- Christakoudi, S., Runglall, M., Mobillo, P., Rebollo-Mesa, I., Tsui, T. L., Nova-Lamperti, E., Taube, C., Norris, S., Kamra, Y., Hilton, R., Augustine, T., Bhandari, S., Baker, R., Berglund, D., Carr, S., Game, D., Griffin, S., Kalra, P. A., Lewis, R., ... Hernandez-Fuentes, M. P. (2020). Development and validation of the first consensus gene-expression signature of operational tolerance in kidney transplantation, incorporating adjustment for immunosuppressive drug therapy. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102899>
- Danger, R., Chesneau, M., Paul, C., Guérif, P., Durand, M., Newell, K. A., Kanaparthi, S., Turka, L. A., Souillou, J. P., Houlgatte, R., Giral, M., Ramstein, G., & Brouard, S. (2017). A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney International*, 91(6), 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.020>
- Danger, R., Le Berre, L., Cadoux, M., Kerleau, C., Papuchon, E., Mai, H. Le, Nguyen, T. V. H., Guérif, P., Morelon, E., Thauinat, O., Legendre, C., Anglicheau, D., Lefaucheur, C., Couzi, L., Del Bello, A., Kamar, N., Le Quintrec, M., Goutaudier, V., Renaudin, K., ... Zuber, J. (2023). Subclinical rejection-free diagnostic after kidney transplantation using blood gene expression. *Kidney International*, 1167–1179. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.03.019>
- Dujardin, A., Chesneau, M., Dubois, F., Danger, R., Bui, L., Kerleau, C., Guérif, P., Brouard, S., & Dantal, J. (2021). Clinical and immunological follow-up of very long-term kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors indicates dual phenotypes. *Kidney International*, 99(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.036>
- Emmaneel, A., Quintelier, K., Sichien, D., Rybakowska, P., Marañón, C., Alarcón-Riquelme, M. E., Van Isterdael, G., Van Gassen, S., & Saeys, Y. (2022). PeacoQC: Peak-based selection of high quality cytometry data. *Cytometry Part A*, 101(4), 325–338. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24501>
- Enzler, T., Bonizzi, G., Silverman, G. J. J., Otero, D. C., Widhopf, G. F. F., Anzelon-Mills, A., Rickert, R. C. C., & Karin, M. (2006). Alternative and Classical NF- $\kappa$ B Signaling Retain Autoreactive B-cells in the Splenic Marginal Zone and Result in Lupus-like Disease. *Immunity*, 25(3), 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.010>
- Gonwa, T. A., Mai, M. L., Melton, L. B., Hays, S. R., Goldstein, R. M., Levy, M. F., & Klintmalm, G. B. (2001). END-STAGE RENAL DISEASE (ESRD) AFTER ORTHOTOPIC LIVER TRANSPLANTATION (OLT) USING CALCINEURIN-BASED IMMUNOTHERAPY Risk of Development and Treatment. *Control*, 72(12), 1934–1939.

- Guo-Ping, S., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Lijuan, G., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L., & Chapman, H. A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10(2), 197–206. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80020-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80020-5)
- Heidt, S., Vergunst, M., Anholts, J. D. H., Reinders, M. E. J., De Fijter, J. W., Eikmans, M., & Claas, F. H. J. (2015). B-cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function. *Transplantation*, 99(5), 1058–1064. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000465>
- Herling, M., Patel, K. A., Weit, N., Lilienthal, N., Hallek, M., Keating, M. J., & Jones, D. (2009). High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114(21), 4675–4686. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208256>
- Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C. W., Gifford, D. K., & Melton, D. A. (2014). MARIS: Method for analyzing RNA following intracellular sorting. *PLoS ONE*, 9(3), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089459>
- Kaser, A., Dunzendorfer, S., Offner, F. A., Ludwiczek, O., Enrich, B., Koch, R. O., Cruikshank, W. W., Wiedermann, C. J., & Tilg, H. (2000). B Lymphocyte-Derived IL-16 Attracts Dendritic Cells and Th Cells. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2474–2480. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2474>
- Kriss, C. L., Pinilla-Ibarz, J. A., Mailloux, A. W., Powers, J. J., Tang, C. H. A., Kang, C. W., Zanesi, N., Epling-Burnette, P. K., Sotomayor, E. M., Croce, C. M., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. A. (2012). Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, 120(5), 1027–1038. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394346>
- Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., & Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B-cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B-cell Collaboration. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5886–5896. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5886>
- Laine, J., Künstle, G., Obata, T., Sha, M., & Noguchi, M. (2000). The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Molecular Cell*, 6(2), 395–407. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00039-3)
- Le Berre, L., Chesneau, M., Danger, R., Dubois, F., Chaussabel, D., Garand, M., & Brouard, S. (2021). Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B-cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 5–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589786>
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., & Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, 517(7533), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature13803>
- Massart, A., Pallier, A., Pascual, J., Viklicky, O., Budde, K., Spasovski, G., Klinger, M., Sever, M. S., Sørensen, S. S., Hadaya, K., Oberbauer, R., Dudley, C., De Fijter, J. W., Yussim, A., Hazzan, M., Wekerle, T., Berglund, D., De Biase, C., Pérez-Sáez, M. J., ... Abramowicz, D. (2016). The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 31(6), 1002–1013. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv437>
- Meyer-Bahlburg, A., Andrews, S. F., Yu, K. O. A., Porcelli, S. A., & Rawlings, D. J. (2008). Characterization of a late transitional B-cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 155–168. <https://doi.org/10.1084/jem.20071088>

- Negro, R., Gobessi, S., Longo, P. G., He, Y., Zhang, Z. Y., Laurenti, L., & Efremov, D. G. (2012). Overexpression of the autoimmunity-associated phosphatase PTPN22 promotes survival of antigen-stimulated CLL cells by selectively activating AKT. *Blood*, 119(26), 6278–6287. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403162>
- Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., Hernandez-Fuentes, M. P., Turka, L. A., & Seyfert-Margolis, V. L. (2010). Identification of a B-cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1836–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI39933>
- Newell, K. A., Asare, A., Sanz, I., Wei, C., Rosenberg, A., Gao, Z., Kanaparthi, S., Asare, S., Lim, N., Stahly, M., Howell, M., Knechtle, S., Kirk, A., Marks, W. H., Kawai, T., Spitzer, T., Tolkoff-Rubin, N., Sykes, M., Sachs, D. H., ... Turka, L. A. (2015). Longitudinal studies of a B-cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 15(11), 2908–2920. <https://doi.org/10.1111/ajt.13480>
- Nolz, J. C., Tschumper, R. C., Pittner, B. T., Darce, J. R., Kay, N. E., & Jelinek, D. F. (2005). ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*, 19(6), 1018–1024. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403726>
- Nova-Lamperti, E., Chana, P., Mobillo, P., Runglall, M., Kamra, Y., McGregor, R., Lord, G. M., Lechler, R. I., Lombardi, G., & Hernandez-Fuentes, M. P. (2017). Increased CD40 ligation and reduced bcr signalling leads to higher il-10 production in B-cells from tolerant kidney transplant patients. *Transplantation*, 101(3), 541–547. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001341>
- Paduano, F., Gaudio, E., Mensah, A. A., Pinton, S., Bertoni, F., & Trapasso, F. (2018). T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 (TCL1): An oncogene regulating multiple signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, 8(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00317>
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J. J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Soullillou, J. P., & Brouard, S. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B-cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 78(5), 503–513. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.162>
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., & Cosimi, A. B. (2002). Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 346(8), 580–590. <https://doi.org/10.1056/nejmra011295>
- Pekarsky, Y. (2000). Tc1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3028–3033. <https://doi.org/10.1073/pnas.040557697>
- Pesando, J. M., & Graf, L. (1986). Differential expression of HLA-DR, -DQ, and -DP antigens on malignant B-cells. *Journal Of Immunology*, 136(11), 4311–4318.
- Rabbani, A., Eghlimi, H., Khoshkbarforoushan, M., & Baziboroun, M. (2023). The prevalence of latent / chronic infection in liver transplant candidates in Taleghani Hospital of Tehran , Iran , from 2020 until 2021. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.*, 16(1), 478–485.
- Ramos, H. ., Reyes, J., Abu-Elmagd, K., Zeevi, A., Reinsmoen, N., Tzakis, A., Demetris, A. J., Fung, J. J., Flynn, B., McMichael, J., Ebert, F., & E. Starzl, T. (1995). Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation*, 59(2), 212–217.



- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J. F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S., & Souillou, J. P. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6(4), 736–746. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01280.x>
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., Rovis, F., Jimenez, E., Ballow, A., Giral, M., Rebollo-Mesa, I., Le Moine, A., Braudeau, C., Hilton, R., Gerstmayr, B., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–1861. <https://doi.org/10.1172/JCI39922>
- Seo, S. U., Woo, S. M., Min, K. jin, & Kwon, T. K. (2018). Z-FL-COCHO, a cathepsin S inhibitor, enhances oxaliplatin-induced apoptosis through upregulation of Bim expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 849–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.068>
- Shi, K., Zhang, J. Z., Zhao, R. L., Yang, L., & Guo, D. (2018). PSMD7 downregulation induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via the mTOR/p70S6K pathway. *FEBS Open Bio*, 8(4), 533–543. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12394>
- Silva, H. M., Takenaka, M. C. S., Moraes-Vieira, P. M. M., Monteiro, S. M., Hernandez, M. O., Chacara, W., Six, A., Agena, F., Sesterheim, P., Barbé-Tuana, F. M., Saitovitch, D., Lemos, F., Kalil, J., & Coelho, V. (2012). Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Molecular Medicine*, 18(5), 733–743. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00281>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Tabrizi, S. J., Niuro, H., Masui, M., Yoshimoto, G., Iino, T., Kikushige, Y., Wakasaki, T., Baba, E., Shimoda, S., Miyamoto, T., Hara, T., & Akashi, K. (2009). T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM + Memory B-cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1490–1499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1490>
- Tian, M. T., Gonzalez, G., Scheer, B., & DeFranco, A. L. (2005). Bcl10 can promote survival of antigen-stimulated B lymphocytes. *Blood*, 106(6), 2105–2112. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1248>
- Van Gassen, S., Gaudilliere, B., Angst, M. S., Saeys, Y., & Aghaepour, N. (2020). CytoNorm: A Normalization Algorithm for Cytometry Data. *Cytometry Part A*, 97(3), 268–278. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23904>
- Viklicky, O., Krystufkova, E., Brabcova, I., Sekerkova, A., Wohlfahrt, P., Hribova, P., Wohlfahrtova, M., Sawitzki, B., Slatinska, J., Striz, I., Volk, H. D., & Reinke, P. (2013). B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*, 95(1), 148–154. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182789a24>
- Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J. J.-Y., & Yang-Yen, H.-F. (1999). The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6195–6206. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.6195>
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., & Staudt, L.

M. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101(12), 4944–4951. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3306>

Wöhner, M., Tagoh, H., Bilic, I., Jaritz, M., Poliakova, D. K., Fischer, M., & Busslinger, M. (2016). Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B-cell and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine*, 213(7), 1201–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20152002>

Zhang, C., Zhang, T. X., Liu, Y., Jia, D., Zeng, P., Du, C., Yuan, M., Liu, Q., Wang, Y., & Shi, F. D. (2021). B-Cell Compartmental Features and Molecular Basis for Therapy in Autoimmune Disease. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(6). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001070>

II. Augmentation d'une population de lymphocytes B  
CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> chez des patients  
transplantés rénaux présentant une stabilité de  
leur greffon à long terme sous  
immunosuppression

Rise of a CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells population in kidney  
recipients achieving long term graft stability under  
immunosuppression

(article en préparation)

## A. Résumé de l'article

En transplantation rénale, des progrès ont été fait pour réduire l'usage des thérapies IS cancérigènes et néphrotoxiques mais celles-ci restent obligatoires pour la prévention de rejets du greffon. Dans ce contexte, les receveurs conservant une stabilité de leur greffon à long terme (>10 ans) représente un défi clinique avec l'usage obligatoire des thérapies IS pour garantir la stabilité du greffon et la gestion de leurs effets indésirables. Quelques rares patients dits tolérants sont parvenue à des temps de stabilité de leur greffon similaires sans cependant recevoir de thérapies IS. L'objectif de notre étude est de dresser le portrait globale du système immunitaire de ces deux groupes de patients présentant une stabilité de leur greffon à long terme avec et sans IS et trouver si ils présentent ou non des similitudes.

Le phénotypage des PBMC a été réalisé par cytométrie spectrale en utilisant deux panels de marqueurs pour l'étude des cellules T, B, NK, monocytes et cellules dendritiques. Les PBMC de 34 individus ont ainsi été étudiées, incluant 6 receveurs présentant une stabilité prolongée de leur greffon sous IS (LTT), 8 sans IS (TOL), 10 récemment transplantés (STA) et 10 volontaires sains (HV).

Les LB ont constitués le compartiment de cellules présentant le plus de variations entre les LTT et les TOL, avec une diminution du nombre total de LB et un phénotype principalement de LB mémoire chez les LTT, et inversement une augmentation des LB totaux avec un phénotype principalement naïf chez les TOL. De plus, les LB des LTT présentent une fréquence accrue de LB mémoires double négatifs (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) CD11c<sup>+</sup>. Ces LB CD11c<sup>+</sup> présentent également un phénotype d'exhaustion similaire à celui retrouvé chez les patients atteints de maladie auto-immunes chroniques, évoquant chez les patients LTT une situation d'inflammation chronique. Nos résultats semblent souligner chez ces patients l'importance du maintien des thérapies IS ainsi que des précautions nécessaires dans la minimisation de ces dernières.

## B. Introduction

Kidney transplantation is the treatment of choice for end-stage renal disease, but its management still needs to be improved to increase long-term graft survival (Coemans et al., 2018). The requirement of life-long immunosuppressive drugs (ISs) is responsible for important side effects, including infection, malignancy and nephrotoxicity, which may contribute to chronic allograft dysfunction (Fishman, 2007; Ojo et al., 2003; Pascual et al., 2002; Wimmer et al., 2007). Having recipients achieve tolerance, defined as graft stability, without requiring ISs represents an end goal in the field of solid organ transplantation. Although numerous trials to reduce the use of ISs in kidney transplantation have progressed, they still remain indispensable to prevent graft rejection in the majority of recipients (Brar & Nader, 2014; Dugast et al., 2016; Masset et al., 2022). The study of immune cell homeostasis in patients achieving long-term graft stability under IS treatment may provide important insights to understand the immune conditions that prevent rejection events. We previously performed a phenotyping analysis focused on T and B-cells in a cohort of stable recipients under IS with middle-, long-term and very long-term posttransplantation times. This work highlighted that a prolonged graft stability period under IS was associated with a reduced B-cell frequency and acquisition of a memory phenotype (Dujardin et al., 2021). However, more work is needed to further explore regulatory or inflammatory immune cell populations, which may be of interest to understand the immune profile of these patients.

Operationally tolerant patients (TOLs) are rare kidney recipients that achieve long-term stable function without IS treatment and represent the archetype of kidney transplant patients with a low risk of rejection. We and others identified several specificities in immune cells from TOLs, especially in their B-cells. TOLs exhibit increased numbers of total B-cells (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010), associated with decreased frequencies of plasma cells (CD20<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup>) and increased frequencies of transitional (CD24<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup>) and naive (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) B-cell populations (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010, 2015; Pallier et al., 2010; Silva et al., 2012). Several studies also revealed that there is an increased frequency of Granzyme B<sup>+</sup> (GZMB) B-cells and regulatory CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> T cells with enhanced suppressive properties (Braudeau et al., 2007; Braza et al., 2015; Chesneau et al., 2015), a decrease in the frequency of PD-1<sup>high</sup> CCR7<sup>low</sup> follicular helper T cells (Chenouard et al., 2017), and a reduced expression level of CD16,

perforin, and GZMA in CD56<sup>dim</sup> NK cells, impairing their functional capacities (Dugast et al., 2017) in the blood of TOLs. Herein, our aim was to further characterize the immune blood phenotype of patients with long-term posttransplantation time (LTTs) to decipher whether LTTs and TOLs share immune features. To this end, we compared a group of LTTs to TOLs, stable patients at 1 year posttransplantation (STAs) and healthy volunteers (HVs), in which we performed exhaustive phenotyping of their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by spectral cytometry using two panels of markers allowing the study of B-cells, T cells, NK cells, dendritic cells (DCs) and monocytes. While the TOL B-cell phenotype reflects a relative immune regulation profile, those from LTTs may conversely trigger chronic immune system activation, in which IS maintenance is by far highly recommended.

## C. Materials and Methods

### 1) Study population

This research project was noninterventional and included 34 adult kidney transplant recipients that were monitored at the Angers, Nantes, Necker and Saint-Louis hospitals. Reported clinical and research activities are consistent with the principles of the declarations of Istanbul and Helsinki and in line with the good practice recommendations of the University Hospital of Nantes. Written consent was obtained from all patients, and data were deposited prospectively into the multicenter DIVAT database approved by the French Ministry of Higher Education and Research (file 13.334-cohort DIVAT RC12\_0452, [www.divat.fr](http://www.divat.fr)) and the CNIL (DR-2025-087 N°914184, 15/02/2015; ClinicalTrials.gov recording NCT02900040). Normal renal function was defined as proteinuria below 0.5 g/24 h and a glomerular filtration rate (Modification of Diet in Renal Disease) over 40 mL/min. DSA monitoring was performed according to the center's standard of care. LTTs were defined as patients with normal renal function for more than at least 5 years posttransplantation. STAs were defined as patients with normal renal function at 1 year posttransplantation. TOLs were defined as kidney transplant patients with normal renal function and no IS treatment for more than 1 year <sup>21</sup>. HVs from the French Blood Institute were included thanks to the agreement CPDL-PLER-2018 180.

## 2) Spectral cytometry

All antibodies of Panel 1 (T, B, NK, DC, monocytes) and 2 (T cells) are listed in Supplementary Tables 2 and 3, respectively. PBMCs were obtained by density centrifugation from blood samples collected in EDTA tubes (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). PBMCs were frozen in 1 mL of 10% fetal bovine serum in DMSO and stored at -150 °C until experimentation. PBMCs were thawed at room temperature using serum-free thawing solution according to the manufacturer’s instructions (Cellular Technology Limited, Cleveland, CA) and then incubated in complete RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) at room temperature for 1 hour. In both panels, PBMCs were first stained with viability fixable dye (Live/Dead Blue; Thermo Fisher, Waltham, CA). Extracellular antibody labeling was performed in running buffer (RB), PBS with 5% m/v bovine serum albumin (BSA) and  $2 \times 10^{-3}$  M EDTA. Intracellular antibody labeling for Panel 1 was performed in permeabilization buffer (PB) including 5% PermWash (# 51-2091K2, BD bioscience, Franklin Lakes, CA) after fixation and permeabilization for 30 minutes using Cytofix buffer (# 554655, BD Biosciences). For Panel 2, permeabilization was performed in 10% PermBuffer 10X (# 00-8333-56, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) after fixation and permeabilization for 30 minutes using Fix/Perm reagents following the manufacturer’s instructions (# 00-5223-56, # 00-5123-43, Invitrogen). Cells were analyzed using a Cytex AURORA spectral flow cytometer (configuration: 5 L 16UV-16 V-14B-10YG-8R).

Data analyses were performed using OMIQ software (Dotmatics, [www.dotmatics.com](http://www.dotmatics.com)). After data compensation, the same gating strategy was applied for each individual to remove debris, doublets, dead cells, and autofluorescent cells (figure S1A). The PeacoQC algorithm was used as a quality control data process, removing the remaining aberrant events in the dataset (Emmaneel et al., 2022). In Panels 1 and 2, an internal HV control was applied to the CytoNorm normalization process to correct potential batch effects (Van Gassen et al., 2020). For each group of cells, final cell subsampling was performed according to their relative numbers to ensure suitable comparability between individuals, and individuals with not enough cells were excluded. For total PBMCs, 100,000 cells per sample were required. For B-cells, monocytes and NK cells, final cell subsampling was performed using 10,000 cells per sample. For DCs, 2,000 cells per sample were used. For T cells, 50,000 cells per sample were used in Panel 1 and 30,000 T cells were used in Panel 2. We performed supervised and unsupervised analyses in each cell group. The latter uses Fit-SNE dimensional reduction to

allow a two-dimensional representation of cell marker expression and the Flow-SOM algorithm to cluster cells.

### 3) Statistical analysis

Group comparisons were performed using nonparametric Kruskal–Wallis tests with Dunn’s multigroup comparisons tests, and intragroup comparisons were performed using nonparametric Wilcoxon paired tests. Analyses were performed using GraphPad Prism v.9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## D. Results

### 1) Patient description

The clinical characteristics of the 34 individuals are displayed in Supplementary Table 1. Whereas posttransplantation times were not different between TOLs and LTTs, they were significantly lower in the STA ( $p=0.0068$  and  $0.0004$  compared to LTTs and TOLs, respectively). Recipient age was not different between TOLs, LTTs and STAs (3  $p$  values  $>0.1$ ), while the ages of HVs were significantly lower than those of LTTs ( $p=0.0303$ ) and TOLs ( $p=0.0346$ ). At the time of sampling, LTTs were all treated with calcineurin inhibitors (ratio cyclosporine A/tacrolimus: 2/4), 5 of 6 received antiproliferative agents, and none had received steroids or mTOR inhibitors. STAs were treated with CNIs (ratio cyclosporine A/tacrolimus: 2/8) at the time of sampling, none received mTOR inhibitors, 5/10 received only anti-proliferative agents, 2/10 only steroids and 3/10 received both anti-proliferative agents and steroids.

### 2) LTTs show a B-cell imbalance in favor of differentiated B-cell subpopulations

We found an increase in the  $CD56^{low} CD16^{-}$  NK cell population in LTTs compared to HVs and TOLs ( $p=0.0289$  and  $0.0230$ , respectively), a decrease in the frequency of  $CD123^{+}$  plasmacytoid DCs compared to STAs ( $p=0.0162$ ), and an increase in the frequencies of  $GZMB^{+}$  T cells, monocytes and DCs compared to STAs and HVs (Figure S2 to S18). Finally, LTTs displayed a similar frequency and absolute number of total B-cells ( $CD19^{+} CD20^{+}$ ) as STAs and HVs (Figure S19 to S21). Within the B-cell compartment, we found a significant decrease in the frequency of naive B-cells ( $IgD^{+} CD27^{-}$ ) associated with a higher frequency of  $IgA^{+}$  and  $IgG^{+}$  B-cells in LTTs vs. STAs and TOLs (Figure S22). Despite low levels in peripheral blood ( $\sim 5\%$ ), we report a significantly increased frequency of  $IgD^{-} CD27^{-}$  B-cells, considered double negative (DN) memory B-cells (Y. Li et al., 2021), in LTTs compared to STAs and TOLs ( $p=0.0383$  and  $0.0107$ ,



respectively) (Figure 1A) and a significant increase in plasmablasts-plasma cells (CD24<sup>-</sup> CD38<sup>high</sup>) frequency in LTTs compared to TOLs ( $p= 0.0316$ ) (Figure 1B). Taken together, these data show a more differentiated B-cell phenotype in the blood from LTTs compared to the other groups of transplanted recipients, particularly TOLs.

### 3) LTTs possessed a higher frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells with an IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> DN memory phenotype, class switch BCR expression and exhausted phenotype

We then analyzed the expression of markers associated with the homeostasis and activation of B-cells, including PD-1, CD25 (IL2RA), GZMB and the integrins CD11b and CD11c. We observed a more activated phenotype in B-cells from STAs compared to the other groups and in particular TOLs, with a significantly increased frequency of B-cells expressing PD-1 ( $p= 0.0022$  in STAs vs. TOLs) (Figure 1C) and CD25 ( $p= 0.0104, 0.0088$  vs. HVs and TOLs, respectively) (Figure 1D). We observed a higher frequency of B-cells expressing GZMB in TOLs, in accordance with our previous results (Chesneau et al., 2015), and in LTTs than in HVs ( $p= 0.0732, p= 0.0534$ ) (Figure 1E). LTTs displayed a significantly increased frequency of CD11b<sup>+</sup> B-cells ( $p= 0.0112$  and  $0.0451$  compared to HVs and TOLs, respectively) (Figure 1F) and a higher frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells compared to the other groups ( $p= 0.0110, 0.0458, 0.0116$  compared to HVs, STAs and TOLs, respectively) (Figure 1G and 1H). Given this increase in CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs (median of 36.55% vs. 10.85%, 10.34%, and 10.50% in HVs, STAs and TOLs, respectively), we looked at their distribution in the different B-cell subpopulations. The increase in CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs was mainly due to IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> DN memory B-cells, IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> switch memory B-cells, and, to a much lesser extent, IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> naive B-cells (Figure 2). No difference was found in transitional B-cells or plasmablasts-plasma cells between groups (Figures S23A and S23B).

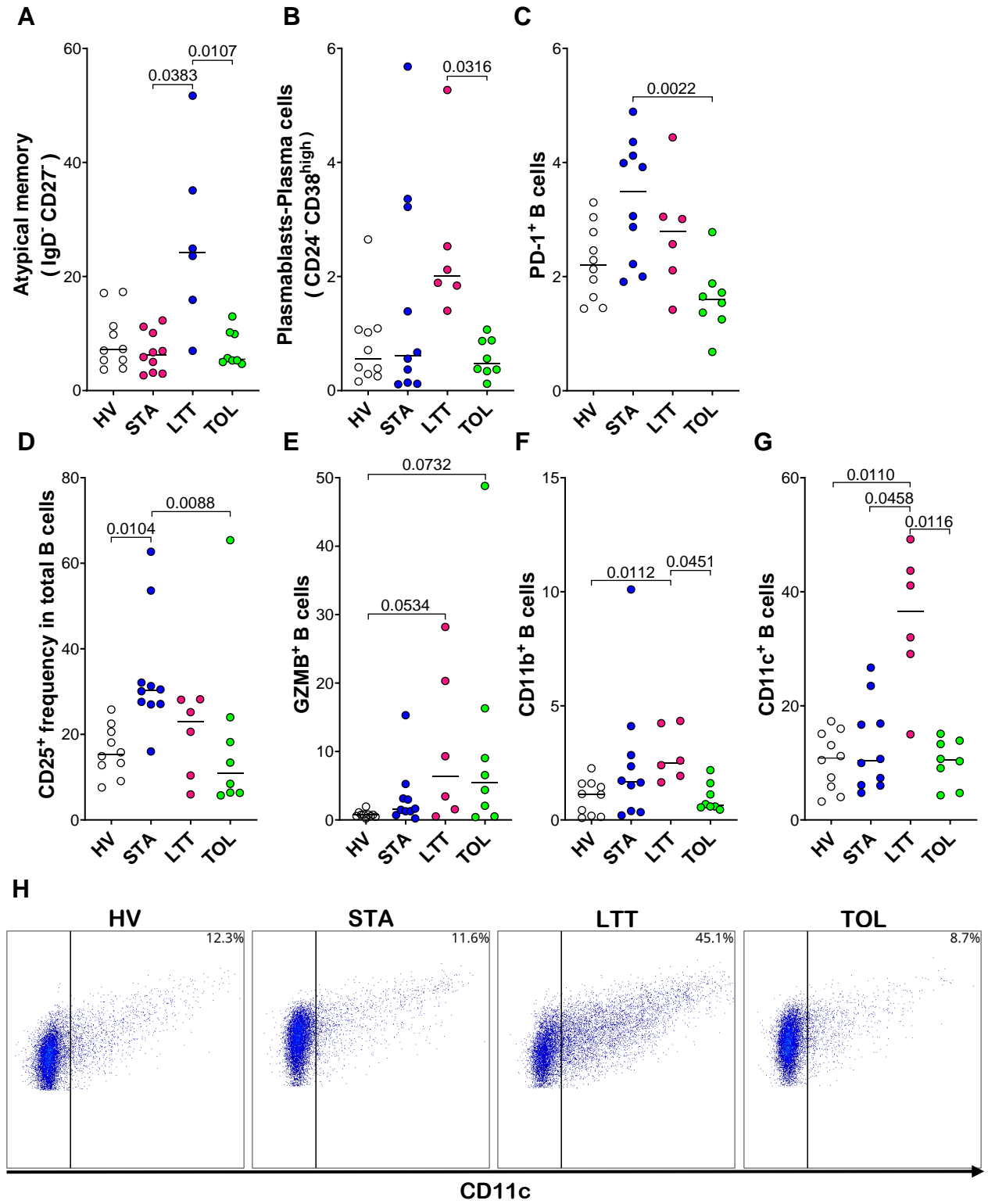


Figure 1 : B-cell compartment phenotyping. Frequency Median (%) in total B-cells for each individuals groups of **A** : double negative memory (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>), **B** : plasmablasts-plasma cells (CD24<sup>-</sup> CD38<sup>high</sup>). **C** : PD-1<sup>+</sup> cells, **D** : CD25<sup>+</sup> cells, **E** : GZMB<sup>+</sup> cells, **F** : CD11b<sup>+</sup> cells, **G** : CD11c<sup>+</sup> cells. Each single individual values are indicating by the points and medians are indicating by the bars. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. **H** : A scatterplot representation of CD11c expression in each groups of the cohort using 4 representative individuals.

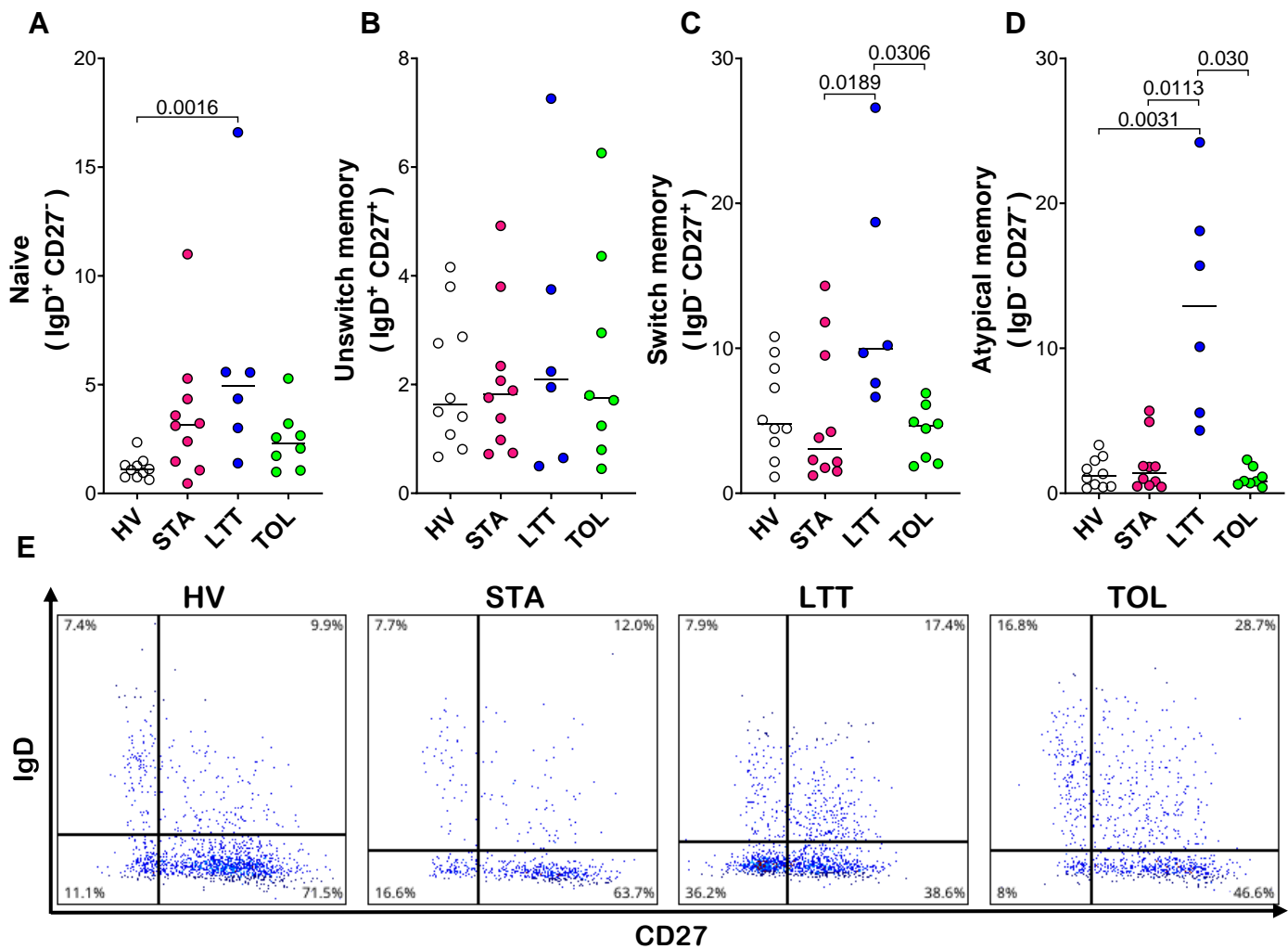


Figure 2 : CD11c<sup>+</sup> B-cell repartition in B-cell subpopulations based on IgD and CD27 expression. Frequency median (%) of CD11c<sup>+</sup> B-cells in total B-cells for each individuals groups in **A** : naive compartment (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), **B** : unswitch memory compartment (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), **C** : switch memory compartment (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), **D** : double negative memory compartment (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>). Each single individuals values are indicating by the points and medians are indicating by the bars. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test using LTT group as control. **E** : A scatterplot representation of IgD and CD27 expression in CD11c<sup>+</sup> B-cells in each groups of the cohort using 4 representative individuals.

Whereas equivalent frequency of nonswitch IgA<sup>-</sup> IgG<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> and switch IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells were found in LTTs, LTTs were enriched in switch IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells compared to the other groups (Figure 3A and 3B), and a significantly higher level of nonswitch IgA<sup>-</sup> IgG<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> cells was found in LTTs compared to HVs (p= 0.0267) (Figure 3C). CD11c<sup>+</sup> nonswitch B-cells in LTTs were mostly represented in the IgD<sup>low</sup> IgM<sup>low</sup> and IgD<sup>low</sup> IgM<sup>high</sup> compartments (Figure S1 and S24), suggesting that CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs were mainly in the switch class B-cell compartment and that CD11c<sup>+</sup> nonswitch class B-cells mostly exhibited downregulated expression of IgD.

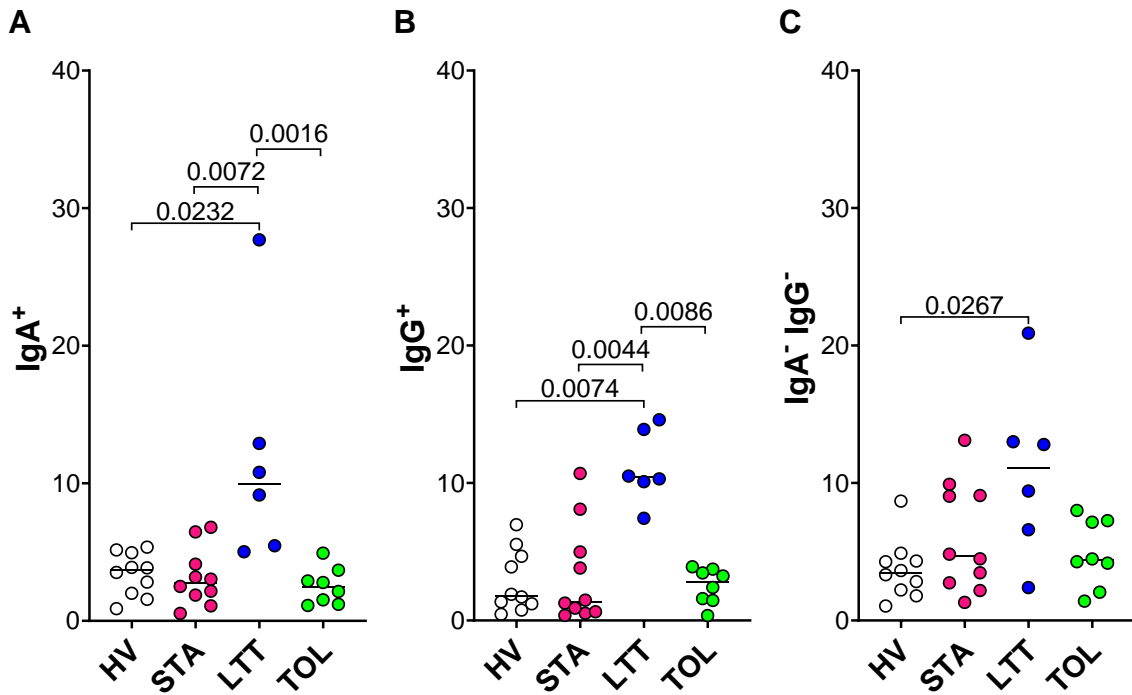


Figure 3 : CD11c<sup>+</sup> B-cell repartition in IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> B-cell compartments. Frequency median (%) of CD11c<sup>+</sup> B-cells in total B-cells for each individuals groups in **A** : IgA<sup>+</sup> B-cells, **B** : IgG<sup>+</sup> B-cells, **C** : IgA<sup>-</sup> IgG<sup>-</sup> B-cells. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test using LTT group as control.

We further characterized the CD11c<sup>+</sup> B-cells in the different groups of patients and HVs, looking at the GZMB<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup> cell frequencies in CD11c<sup>+</sup> B-cells. No differences were observed in the PD-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> and GZMB<sup>+</sup> cell frequencies between LTTs and the other groups (Figure 4A, 4B and 4C). In contrast, CD11c<sup>+</sup> B-cells from LTTs displayed a lower frequency of CD25<sup>+</sup> cells than those from STAs (p= 0.0078) (Figure 4D).

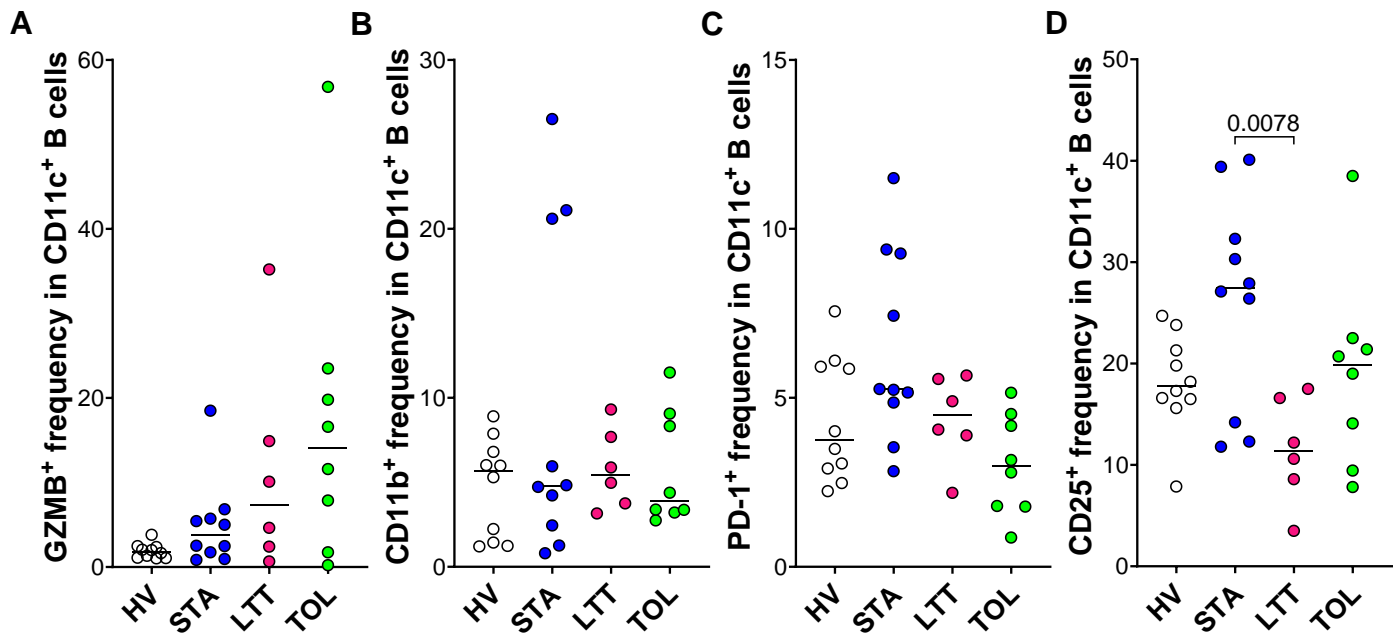


Figure 4 : Frequency of cells expressing markers relevant in B-cell activation and regulation in CD11c<sup>+</sup> B-cells. Frequency median (%) in CD11c<sup>+</sup> B-cells in each individual groups of **A** : GZMB<sup>+</sup> cells, **B** : CD11b<sup>+</sup> cells, **C** : PD-1<sup>+</sup> cells, **D** : CD25<sup>+</sup> cells. Each single individual values are indicating by the points and medians are indicating by the bars. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test using LTTs group as control.

To complete this analysis, we also compared CD11c<sup>+</sup> to CD11c<sup>-</sup> B-cells in each group. We found that the GZMB<sup>+</sup> cell frequency was increased in CD11c<sup>+</sup> (vs. CD11c<sup>-</sup>) B-cells in each group but not significantly in LTTs (Figure 5A), suggesting that the increase in GZMB<sup>+</sup> B-cell frequency observed in the total B-cells of LTTs may also be due to CD11c<sup>-</sup> B-cells. CD11b<sup>+</sup> cells were mainly present in the CD11c<sup>+</sup> B-cell compartment, representing approximately 5% of CD11c<sup>+</sup> B-cells compared to 1% of CD11c<sup>-</sup> B-cells (Figure 5B). We found a significantly higher frequency of PD-1<sup>+</sup> cells in CD11c<sup>+</sup> (vs. CD11c<sup>-</sup> B-cells) in all groups of patients. This higher frequency is associated with a significant decrease in the frequency of CD25<sup>+</sup> cells in CD11c<sup>+</sup> (vs. CD11c<sup>-</sup> B-cells) only in LTTs (Figure 5C and 5D). Altogether, these data show that LTTs possess a higher frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells with an IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> DN memory phenotype, class switch BCR expression and an exhausted CD25<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup> phenotype. We also reported upregulated expression of CD19 and downregulated expression of CD38 in the CD11c<sup>+</sup> (vs. CD11c<sup>-</sup>) B-cells from all groups (figure 5E and 5F).

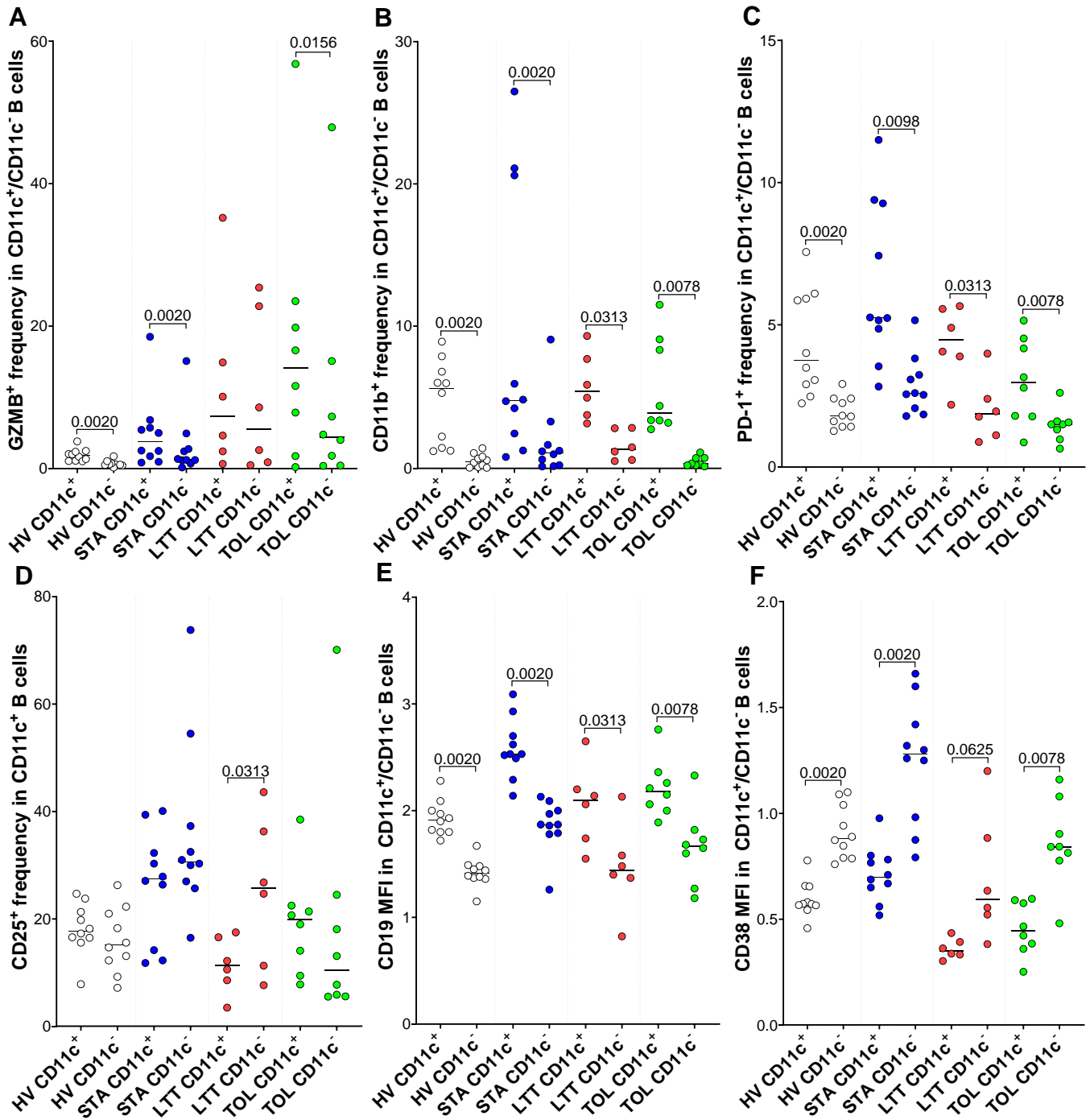


Figure 5: CD11c<sup>+</sup> vs CD11c<sup>-</sup> differential expression of markers relevant in B-cell activation and regulation. Median in CD11c<sup>+</sup> and CD11c<sup>-</sup> B-cells in each individual groups of **A** : GZMB<sup>+</sup> cells frequency (%), **B** : CD11b<sup>+</sup> cells frequency (%), **C** : PD-1<sup>+</sup> cells frequency (%), **D** : CD25<sup>+</sup> cells frequency, **E** : CD19 expression (MFI), **F** : CD38 expression (MFI). Each single individual values are indicating by the points and medians are indicating by the bars. Intra-groups P values were calculated using nonparametric paired t test (Wilcoxon).

## E. Discussion

We previously reported that very long-term stable recipients >25 years posttransplantation possessed a reduced frequency of total and naive B-cells and an increased frequency of switch memory (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>) B-cells compared with patients with a shorter posttransplantation time (Dujardin et al., 2021). In the present study, we confirmed this phenotype in enrolled LTTs compared to the other groups. Accordingly, we investigated the B-cell compartment in LTTs. Whereas all the groups of patients and HVs display comparable frequencies of nonswitch (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) and switch memory (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) B-cells, only LTTs exhibited an increased frequency of IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> DN memory B-cells and CD11c<sup>+</sup> B-cells. Moreover, whereas CD11c<sup>+</sup> B-cells in others largely belong to the switch memory compartment (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs belong mainly to the DN (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) compartment and only secondarily to the switch memory B-cell compartment. The origin and role of DN memory and CD11c<sup>+</sup> B-cells are still incompletely understood but have been increasingly described in recent years as expressing the T-bet marker and associated with chronic inflammatory disorders, including autoimmunity, infections and immunosenescence (Karnell et al., 2017; Y. Li et al., 2021). Interestingly, these CD11c<sup>+</sup> B-cells display high expression of CD19 and low expression of CD38, which make this population comparable with the CD19<sup>high</sup> CD21<sup>-</sup> CXCR5<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> DN population predominantly found in blood from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and with IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, CD21<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, CD21<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> DN B-cells reported in blood from patients with primary Sjögren's syndrome (pSS) (Jenks et al., 2018; Rincon-Arevalo et al., 2021). Not surprisingly, we found a general increase in the frequency of GZMB<sup>+</sup> B-cells in CD11c<sup>+</sup> cells compared to CD11c<sup>-</sup> B-cells from the different groups of patients. Indeed, GZMB as CD11c is a marker of differentiated B-cells, which is consistent with the increased frequency of differentiated B-cells in LTTs (Chesneau et al., 2020; Sailliet et al., 2023). LTTs also display higher frequency of IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells than other groups. Since CD11c<sup>+</sup> B-cells with a switch class represented approximately 2/3 of total CD11c<sup>+</sup> B-cells, they likely contribute to the increased frequency of IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> total B-cells also found in LTTs. Regarding nonswitch class B-cells, the distribution of CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs was higher in the IgD<sup>low</sup> compartment, suggesting an IgM memory phenotype of CD11c<sup>+</sup> nonswitch B-cells in these patients, which also coincides with the increase in differentiated B-cells in these patients. Thus, the frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells harboring a DN class switch memory phenotype were increased in LTTs, in

accordance with the activated phenotype of CD11c<sup>high</sup> T-bet<sup>+</sup> B-cells in SLE patients (S. Wang et al., 2018).

Interestingly, while CD11c<sup>+</sup> B-cells from LTTs present a decreased frequency of CD25<sup>+</sup> (IL2RA) cells compared to their counterparts CD11c<sup>-</sup> B-cells, CD11c<sup>+</sup> B-cells from LTTs also displayed an even lower frequency of CD25<sup>+</sup> cells compared to STAs CD11c<sup>+</sup> B-cells. In addition, more PD1<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> B-cells than PD1<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> B-cells were observed in LTTs. These results may suggest a progressive exhaustion of CD11c<sup>+</sup> B-cells over a long period of IS treatment, which is consistent with several studies in which CD11c<sup>+</sup> B-cells appear to have an exhausted phenotype (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rincon-Arevalo et al., 2021). Notably, upregulated expression of PD-1 and downregulated expression of *IL2RA* mRNA were observed in the CD11c<sup>+</sup> B-cells of SLE patients (Jenks et al., 2018; Rincon-Arevalo et al., 2021). This finding also coincides with the fact that CD11c<sup>+</sup> B-cells fail to express CD25 *in vitro* in response to BCR or CD40 triggering (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016) in HVs (H. Li et al., 2016) and SLE (Jenks et al., 2018), common variable immunodeficiency (CVID) or rheumatoid arthritis (RA) patients (Isnardi et al., 2010). CD11c<sup>+</sup> B-cells have also been found to be associated with the expression of several inhibitory molecules, including CD22, CD32, CD85, CD72, PDL1 and CD95 (Fas) (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rincon-Arevalo et al., 2021; S. Wang et al., 2018). This finding supports the fact that CD19<sup>high</sup> CD11c<sup>+</sup> memory B-cells from patients with HIV, RA or CVID are more susceptible to FasL-induced apoptosis or more prone to spontaneous apoptosis than their CD19<sup>low</sup> CD11c<sup>-</sup> counterparts (Austin et al., 2019; Isnardi et al., 2010). Altogether, CD11c<sup>+</sup> B-cells from LTTs share a common profile with those observed in the blood from patients with chronic inflammatory diseases, suggesting that CD11c<sup>+</sup> B-cells from LTTs are exhausted cells.

Interestingly, despite their exhausted profile, CD11c<sup>+</sup> B-cells in the literature are also responsive to TLR7 and TLR9 innate stimuli and are able to proliferate and secrete antibodies both in mice and humans (Hao et al., 2011; Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; Rubtsov et al., 2011). In mice, these CD11c<sup>+</sup> B-cells that are induced following chronic activation of TLR7 also express CD11b (Rubtsov et al., 2011). This observation is consistent with our findings that CD11b expression is restricted to CD11c<sup>+</sup> B-cells also observed in SLE patients (S. Wang et al., 2018). We also report an increased frequency of plasmablasts-plasma cells in the blood from LTTs. Additionally, CD11c<sup>+</sup> DN memory B-cells in SLE patients express more *PRDM1* and *IRF4*,



2 genes involved in plasma cell generation, and are associated with active disease and autoantibody secretion (Jenks et al., 2018; S. Wang et al., 2018). Similarly, the frequency of DN CD11c<sup>+</sup> memory B-cells is increased in pSS patients and express high levels of autoreactive antibodies (Saadoun et al., 2013).

CD11c<sup>+</sup> B-cells are also named “Age-associated B-cells”, as they are increased with age in mice and in humans in physiological and pathological situations (Golinski et al., 2020; Hao et al., 2011; Rubtsov et al., 2011). A recent study revealed the frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells in a cohort of kidney transplant patients before and after 3 years of transplantation (L. Wang et al., 2021). The CD11c<sup>+</sup> B-cell frequency at 3 years posttransplantation was similar to the frequency found in HVs and higher than that before transplantation. This finding is consistent in our analysis with the similar frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells in STAs (1 year) and HVs. They also show that this increased frequency is more important in recipients above 50 years of age (L. Wang et al., 2021). Nevertheless, no such association and no correlation was found between CD11c<sup>+</sup> B-cell frequency, age and time posttransplantation in our cohort of patients regardless of their clinical status, suggesting another explanation for the increased frequency of CD11c<sup>+</sup> B-cells in LTTs only.

We report an increase in the CD11c<sup>+</sup> memory B-cell population in immunocompromised patients with long-term graft stability, whereas this population is 3 times lower in TOLs and patients with short-term graft stability. Further analysis is obviously needed to elucidate the role of this particular B lymphocyte population in the blood of LTT patients, but the current findings clearly suggest the maintenance of a chronic inflammatory immune response contained by immunosuppressive drugs. Studies carried out on malaria and HIV patients with impaired immune responses support this hypothesis since CD11c<sup>+</sup> B-cell frequency is increased in these pathologies and drops after malaria resolution or after the initiation of effective antiretroviral therapy in HIV patients (Moir et al., 2008; Sundling et al., 2019). In liver transplantation, studies have shown that the beneficial effect of IS withdrawal was positively correlated with posttransplant time (Benítez et al., 2013; Feng et al., 2012). In renal transplantation, studies have clearly shown failure of IS withdrawal in patients less than 6 years posttransplantation (Brar & Nader, 2014; Dugast et al., 2016; Ekberg et al., 2007; Masset et al., 2022). The results of these studies and ours do not suggest better IS weaning capacities

in long-term kidney recipients but rather support previous studies highlighting immunological differences in liver and kidney transplant patients (Dumontet et al., 2016; Lozano et al., 2011).

In conclusion, our study highlighted that these LTTs are clearly different from TOLs from an immunological point of view and that it might be wise to monitor these B-cell populations with an exhausted phenotype, which are indicative of a chronic inflammatory state and can be reactivated in the event of treatment modification.

## F. Supplementary data

	Missing information	Healthy Volunteers (HV) n= 10		Stable patients at 1 year (STA) n= 10		Long term Stable patients >5 years (LTT) n= 6		Tolerant patients (TOL) n= 8		comparison p-value
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Male/Female recipients	0	5/5	50.00/50.00	5/5	50.00/50.00	3/3	50.00/50.00	5/3	62.50/37.50	0.6179
Allograft rank	0									0.0634
First				10	100.00	6	100.00	6	75.00	
Second				0	0.00	0	0.00	2	25.00	
Initial disease	0									NA
Undetermined etiology				1	10.00	0	0.00	3	37.00	
Chronic glomerulonephritis				3	30.00	2	33.33	2	26.00	
Chronic interstitial nephritis, urinary, and others malformations				6	60.00	2	33.33	3	37.00	
Vascular renal diseases				0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Diabetes				0	0.00	2	33.33	0	0.00	
History of diabetes	0			2	20.00	2	33.33	1	12.5	0.7338
History of cardiovascular disease	0			2	20.00	0	0.00	2	25.00	0.8323
History of malignancy	0			1	10.00	1	16.66	1	12.5	0.8579
Male/Female donor	0			7/3	70.00/30.00	5/1	83.33/16.66	3/5	37.50/62.50	0.1786
Deceased /Live donor	0			7/3	70.00/30.00	6/0	100.00/0.00	5/3	62.50/37.50	0.7845
HLA-A-B-DR mismatches	0									NA
0				0	0.00	0	0.00	3	37.50	
<4				3	30.00	2	33.33	2	25.00	
>3				7	70.00	4	77.77	3	37.50	
Depleting induction	0									0.7137
Non-depleting or none				7	70.00	3	50.00	5	62.50	
Depleting				3	30.00	3	50.00	3	37.50	
Immunosuppression at sampling	0									NA
CNIs				10	100.00	6	100.00	0	0.00	
Cyclosporine A				2	20.00	2	33.33	0	0.00	
Tacrolimus				8	80.00	4	66.66	0	0.00	
mTOR inhibitor				0	0.00	0	0.00	0	0.00	
Antiproliferative agents				8	80.00	5	83.33	0	0.00	
Steroid				5	50.00	0	0.00	0	0.00	
Reject before prelevement	0			2	20.00	1	16.66	2	25.00	0.8080
Positive DSA during the first year	0			2	20.00	0	0.00	0	0.00	0.1162
Reason for IS withdrawal (medical or non compliance)	0							2/6	25.00/75.00	
Time post-transplant (month)	0			12.00		148.50		228.50		0.0002* <sup>A</sup>
Time without immunosuppression (month)	1							145.00		
Recipient Age	0	37.00		48.00		57.50		54.50		0.0105* <sup>B</sup>
Cold ischemic time (minutes)	0			803.5		1163.0		1073		0.5122
Donor Age (years)	1			46.00		26.50		20.00		0.0083* <sup>C</sup>
eGFR at sampling (MDRD; mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	0			56.30		59.45		64.70		0.6786

Supplementary Table 1 : Individual groups clinical data table. \* p-value significantly different; <sup>A</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was significantly different between STA/LTT and STA/TOL because times post-transplantation was matched between TOL and LTT in a comparability purpose. <sup>B</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was significantly different between HV/LTT and HV/TOL. <sup>C</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's multiple comparison test was only significantly different between STA/TOL.

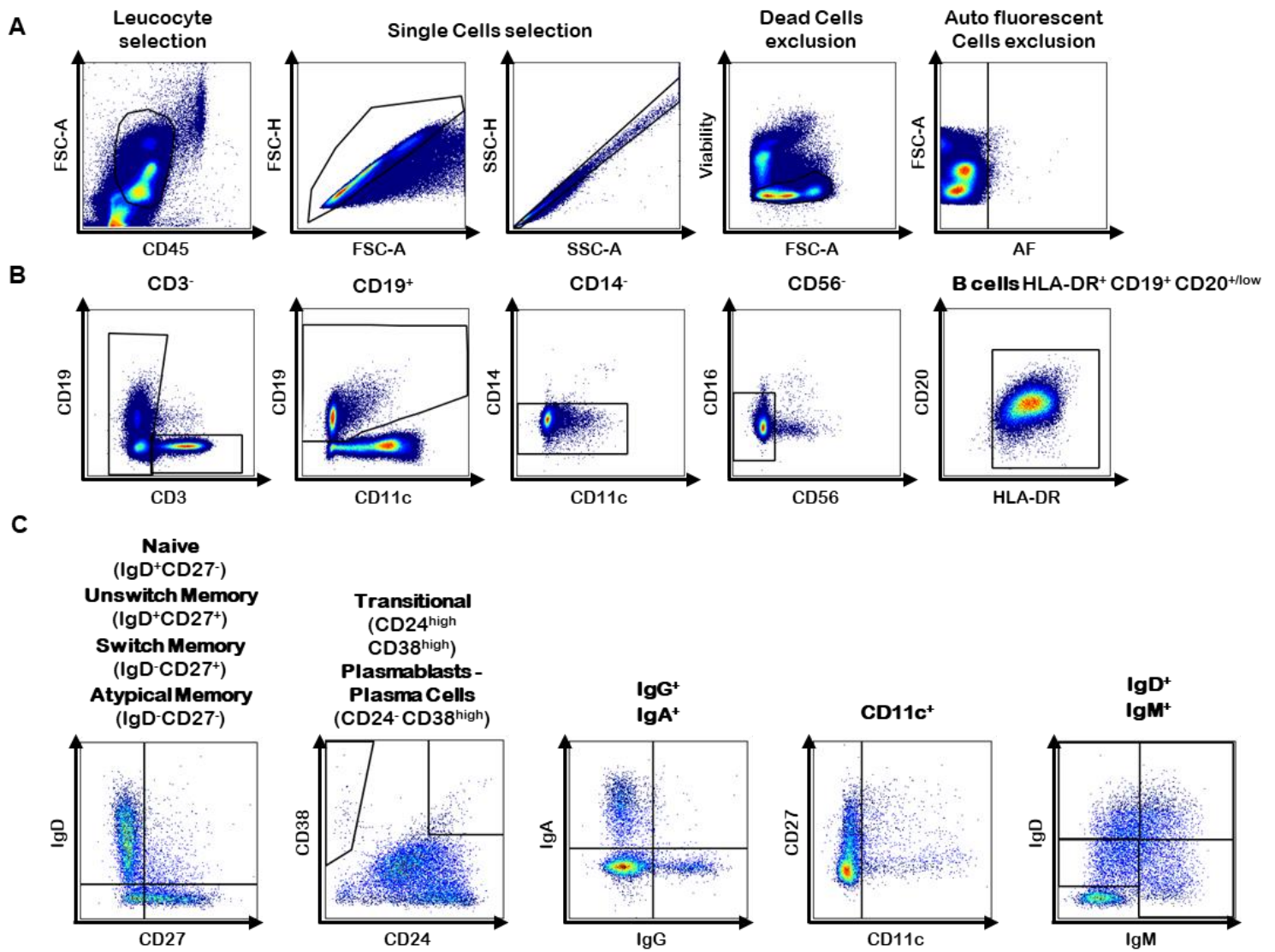
**A**

Target	Fluorochrome	Clone Name	Provider
CD11b <sup>A</sup>	PCPCy5.5	ICRF44	Biolegend
CD11c <sup>A</sup>	BUV661	B-ly6	BD Biosciences
CD123 <sup>A</sup>	AF647	9F5	BD Biosciences
CD138 <sup>A</sup>	BUV737	MI15	BD Biosciences
CD141 <sup>A</sup>	BB515	1A4	BD Biosciences
CD141 <sup>A</sup>	SparkBlue550	63D3	Biolegend
CD158a <sup>A</sup>	BV711	HP-3E4	BD Biosciences
CD158b <sup>A</sup>	BUV563	CH-L	BD Biosciences
CD158e1 <sup>A</sup>	BV750	DX9	BD Biosciences
CD159a <sup>A</sup>	BV650	131411	BD Biosciences
CD159c <sup>A</sup>	BUV615	134591	BD Biosciences
CD16 <sup>A</sup>	BUV496	3G8	BD Biosciences
CD19 <sup>A</sup>	BUV805	SJ25C1	BD Biosciences
CD20 <sup>A</sup>	PacificOrange	HI47	Thermo Fisher
CD24 <sup>A</sup>	PEDz594	ML5	Biolegend
CD25 <sup>A</sup>	PE AF700	CD25-3G10	Thermo Fisher
CD27 <sup>A</sup>	APC	M-T271	Biolegend
CD3 <sup>A</sup>	PE-Cy5	HIT3a	BD Biosciences
CD38 <sup>A</sup>	APC-Fire810	HIT2	Biolegend
CD45 <sup>A</sup>	PerCP	2D1	Biolegend
CD56 <sup>A</sup>	APCF750	5.1H11	Biolegend
CD9 <sup>A</sup>	BV510	M-L13	BD Biosciences
GZMB <sup>B</sup>	PE	GB11	BD Biosciences
HLA-DR <sup>A</sup>	PE Fire810	L243	Biolegend
IgA <sup>A</sup>	FITC	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch
IgD <sup>A</sup>	AF700	IA6-2	Biolegend
IgG <sup>A</sup>	BV605	G18-145	BD Biosciences
IgM <sup>A</sup>	BV570	MHM-88	Biolegend
IL-10 <sup>B</sup>	BV421	JES3-9D7	Biolegend
Ki67 <sup>B</sup>	BUV395	B56	BD Biosciences
PD-1 <sup>A</sup>	BV785	EH12.2H7	Biolegend
TCL1A <sup>B</sup>	PE-Vio770	REA289	Miltenyi

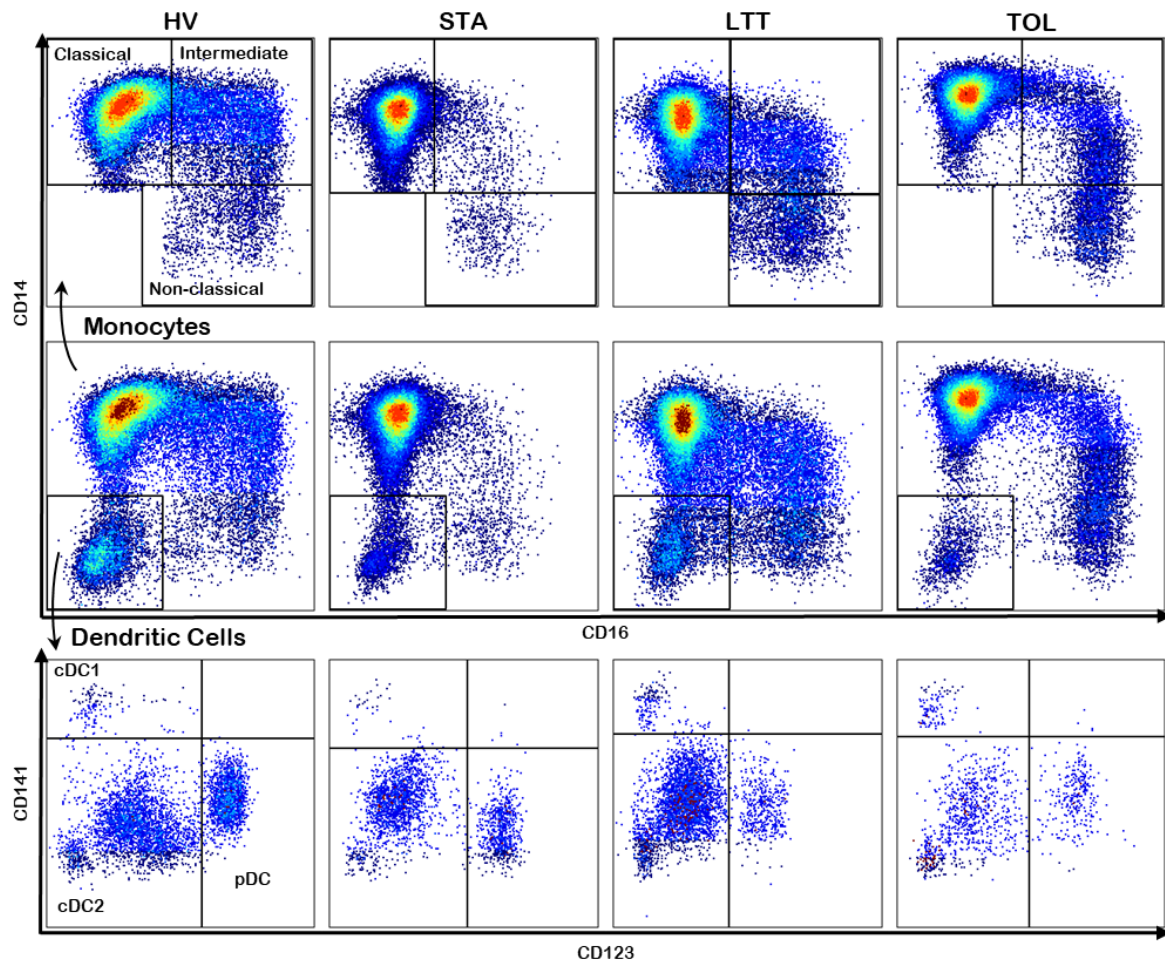
**B**

Target	Fluorochrome	Clone Name	Provider
CCR6 <sup>A</sup>	BV711	G034E3	Biolegend
CD127 <sup>A</sup>	APC-R700	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CD25 <sup>A</sup>	PE/Fire™ 700	M-A251	Biolegend
CD25 <sup>A</sup>	PE AF700	CD25-3G10	Thermo Fisher
CD28 <sup>A</sup>	BV650	CD28.2	Biolegend
CD3 <sup>A</sup>	BUV805	OKT3	BD Biosciences
CD38 <sup>A</sup>	BUV661	HIT2	BD Biosciences
CD4 <sup>A</sup>	cFluor® YG584	SK3	Cytek
CD45 <sup>A</sup>	PerCP	2D1	Biolegend
CD45RA <sup>A</sup>	BUV496	HI100	Biolegend
CD8 <sup>A</sup>	spark blue 550	SK1	Biolegend
c-MAF <sup>B</sup>	eFluor™ 660	sym0F1	ThermoFisher
CXCR3 <sup>A</sup>	PE Cy7	G025H7	Biolegend
CXCR5 <sup>A</sup>	BUV563	RF8B2	BD Biosciences
FOXP3 <sup>B</sup>	APC	PCH101	ThermoFisher
GATA3 <sup>B</sup>	BV421	L50-823	BD Biosciences
ICOS <sup>A</sup>	BUV737	DX29	BD Biosciences
IL-21R <sup>A</sup>	PE-CF594	17A12	BD Biosciences
IL-6R <sup>A</sup>	BB515	M5	BD Biosciences
IRF4 <sup>B</sup>	eFluor™ 450	3 E4	ThermoFisher
Ki67 <sup>B</sup>	BUV395	B56	BD Biosciences
OX40 <sup>A</sup>	PerCp5.5	ACT35	BD Biosciences
PD-1 <sup>A</sup>	BV785	EH12.2H7	Biolegend
T-Bet <sup>B</sup>	PE	4B10	BD Biosciences

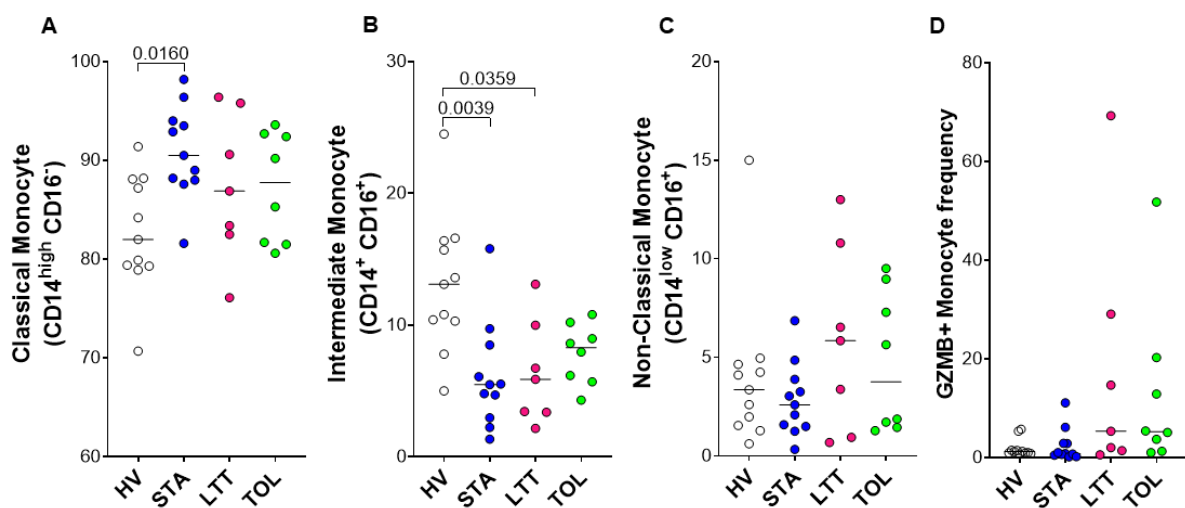
Supplementary Table 2 : **A**: Listing of panel 1 antibodies used for cytometry labeling, **B** : Listing of panel 2 antibodies used for cytometry labeling. <sup>A</sup> extra cellular labelling; <sup>B</sup> intra cellular labelling.



Supplementary figure 1 : PBMCs and B-cells gating strategies. Gating strategy applied to select **A** : singlets, lives and not auto fluorescent PBMCs, **B** : B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>), **C** : B-cells sub-populations.

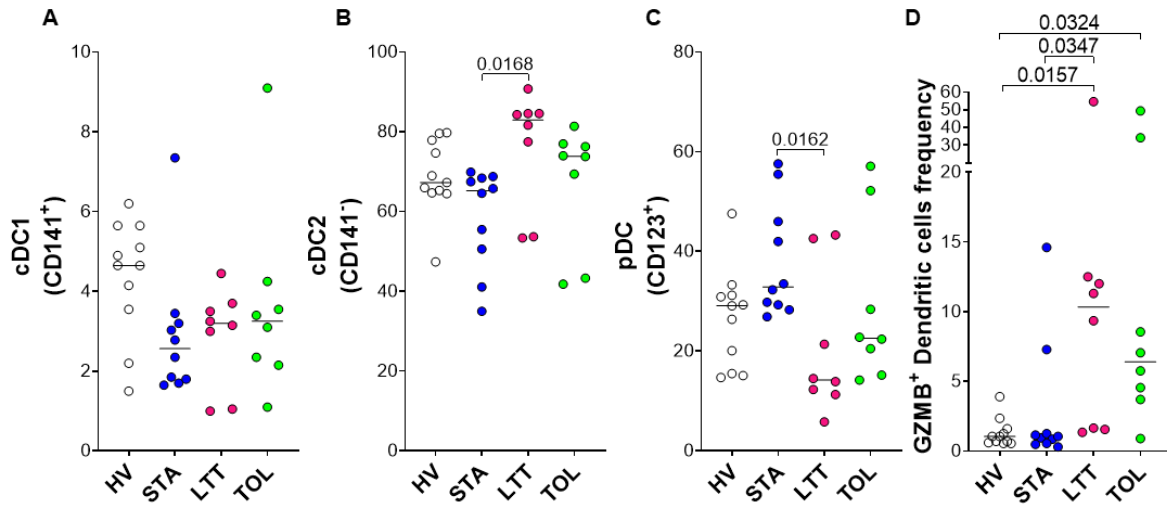


Supplementary figure 2: Monocytes and Dendritic Cells (DCs) gating strategies in each group of the cohort using 4 representative individuals. Monocytes (upper panel) expressed CD14 and CD16 with the following monocytes sub-population separation: classical monocytes  $CD14^{high} CD16^{-}$ , intermediate monocytes  $CD14^{+} CD16^{+}$ , non-classical monocytes  $CD14^{low} CD16^{+}$ . DCs are  $CD14^{-} CD16^{-}$  with the following sub-population separation: conventional DC1 (cDC1)  $CD141^{+}$ , conventional DC2 (cDC2)  $CD141^{-}$  and plasmacytoid DC (pDC)  $CD123^{+}$ .

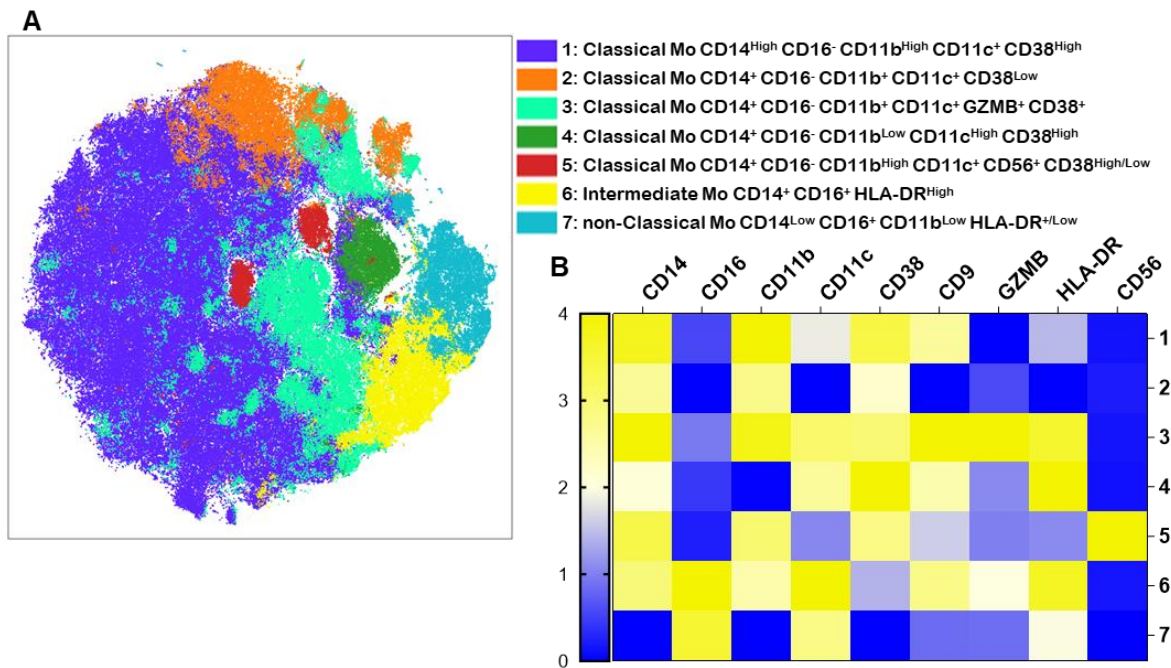


Supplementary figure 3: Monocyte compartment supervised phenotyping. Frequency median in total monocytes cells for each individuals groups of **A**: classical monocytes (%) ( $CD14^{high} CD16^{-}$ ), **B**: intermediate monocyte (%) ( $CD14^{+} CD16^{+}$ ). **C**: non-classical monocyte (%) ( $CD14^{low} CD16^{+}$ ). **D**: GZMB<sup>+</sup> monocyte (%). The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.

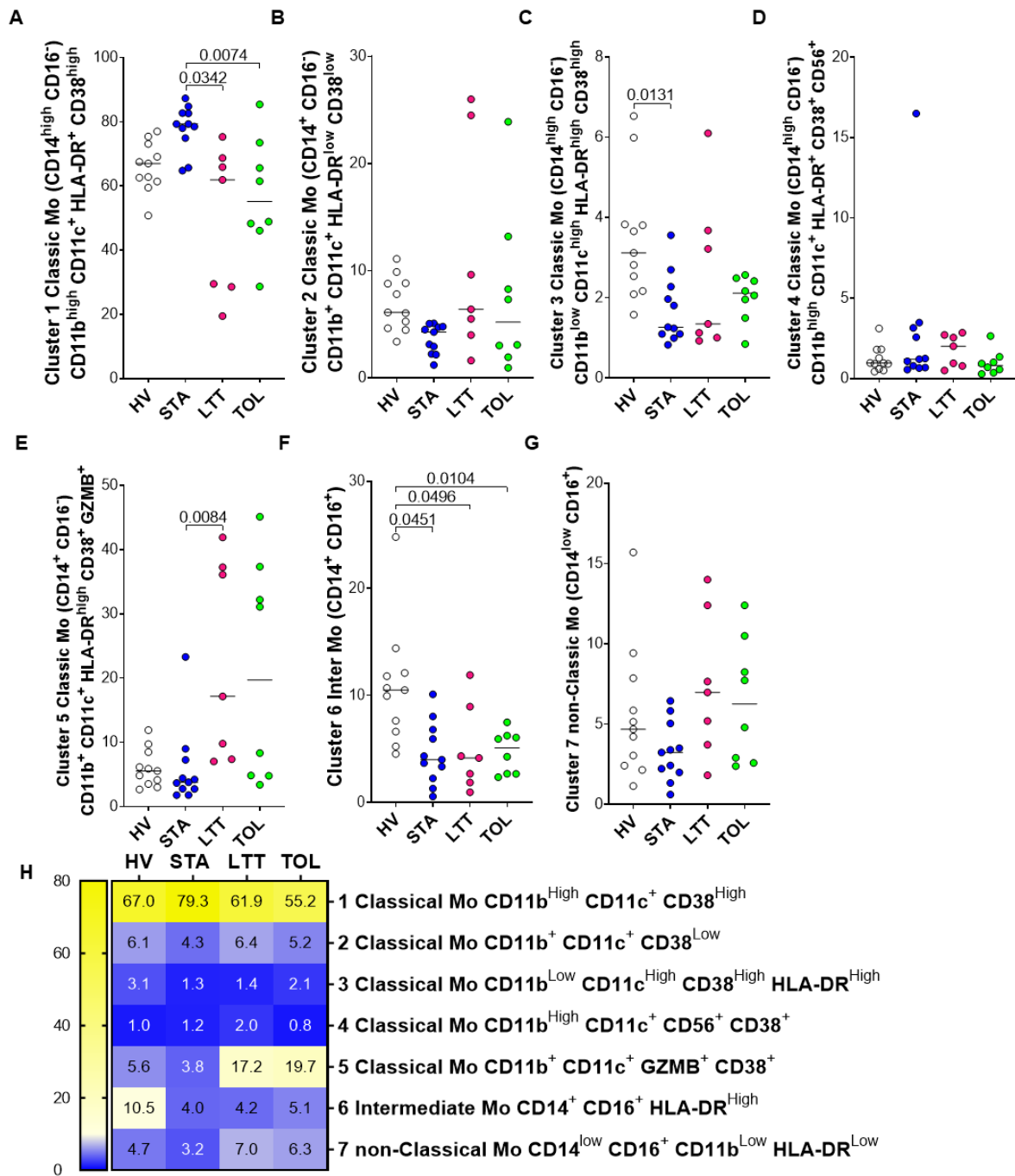




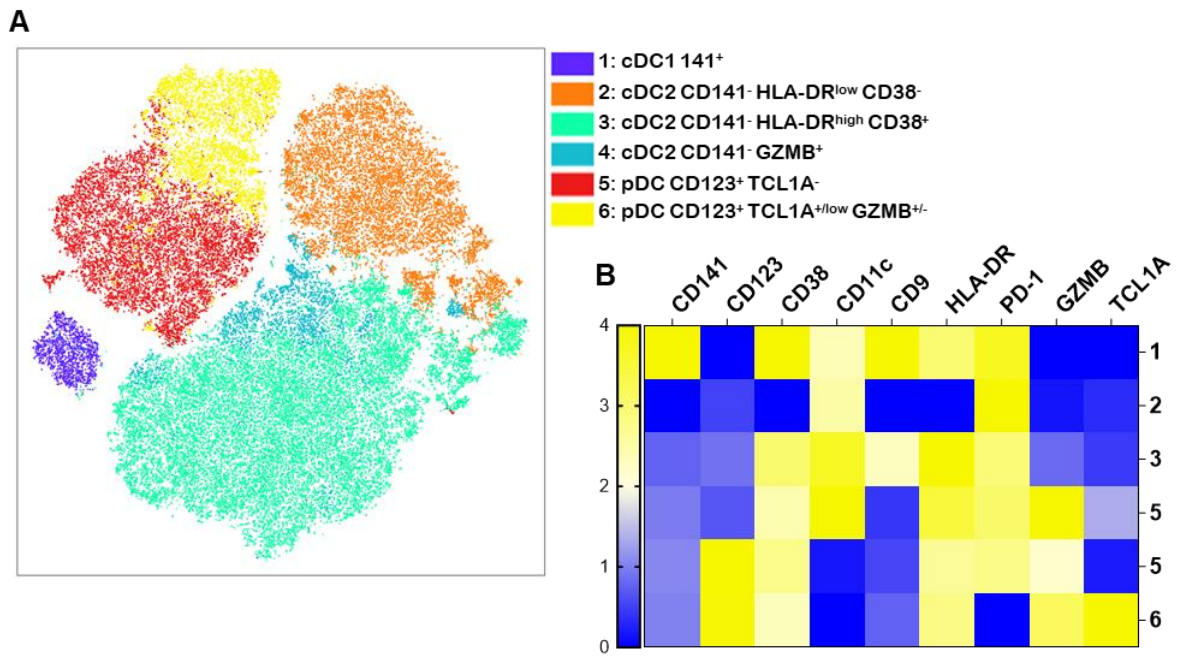
Supplementary figure 4 : Dendritic cells (DCs) compartment supervised phenotyping. Frequency median in total DCs for each individuals groups of **A** : conventional DC1 (%) (CD141<sup>+</sup>), **B** : conventional DC2 (%) (CD141<sup>-</sup>), **C** : plasmacytoid DC (%) (CD123<sup>+</sup>), **D** : GZMB<sup>+</sup> DCs frequency (%). The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



Supplementary Figure 5 : Unsupervised clusterization of monocytes. **A** : t-SNE representation of the total monocytes of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : HeatMap representation of each monocytes markers expression in the 7 monocytes clusters of Healthy Volunteers.

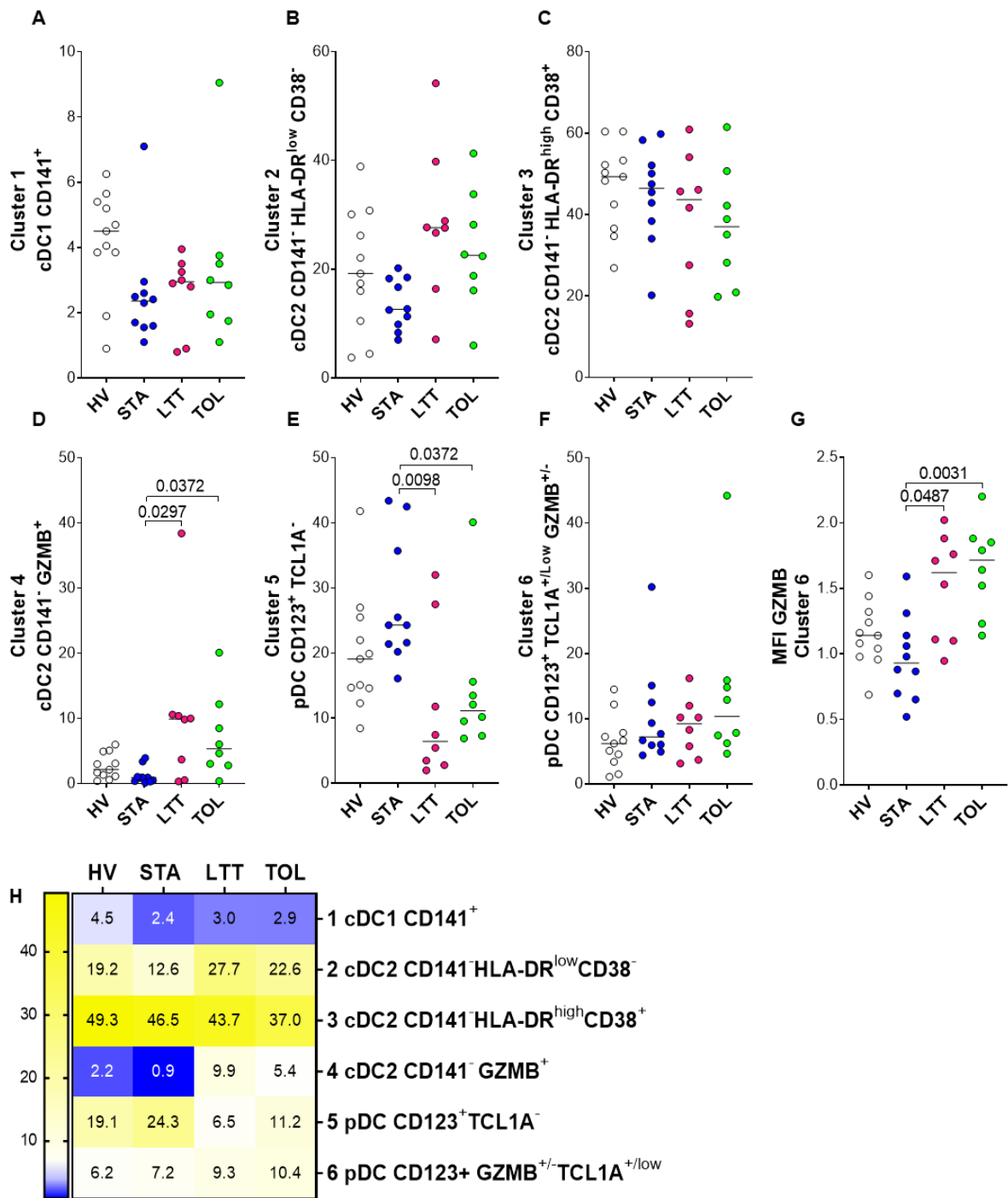


Supplementary figure 6 : Frequency of all monocytes clusters. **A-G** Frequency median (%) in total monocytes cells for each individuals groups of the 7 monocytes clusters. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. **H** : HeatMap representation of the frequency median (%) of the 7 monocytes clusters for each individuals groups.

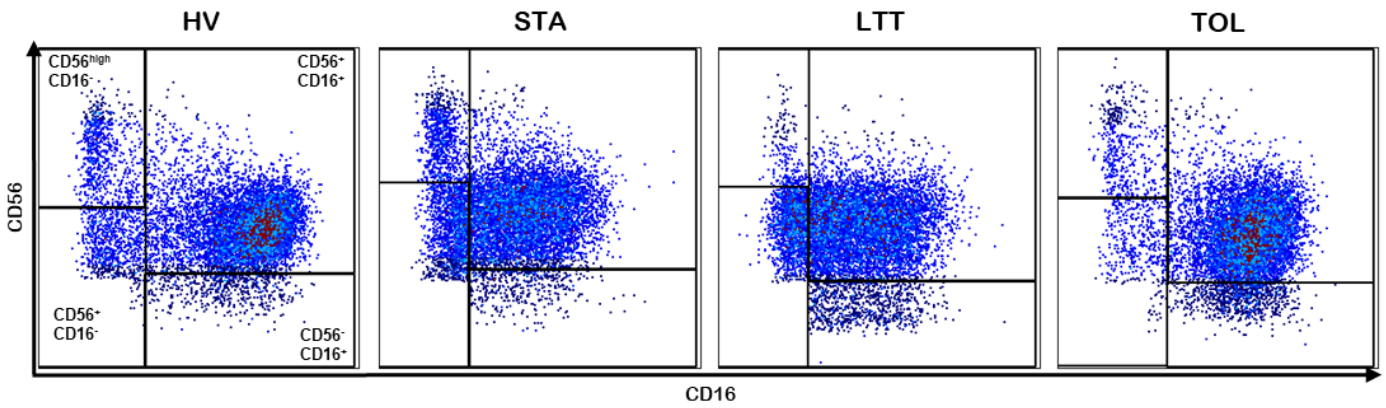


Supplementary Figure 7 : Unsupervised clusterization of Dendritic Cells (DCs). **A** : Fitsne representation of the total DCs of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : Fitsne representation of the total DCs of the individuals of the cohort colored according to their expression of DCs markers. **C** : HeatMap representation of each DCs markers expression in the 6 monocytes clusters of Healthy Volunteers.

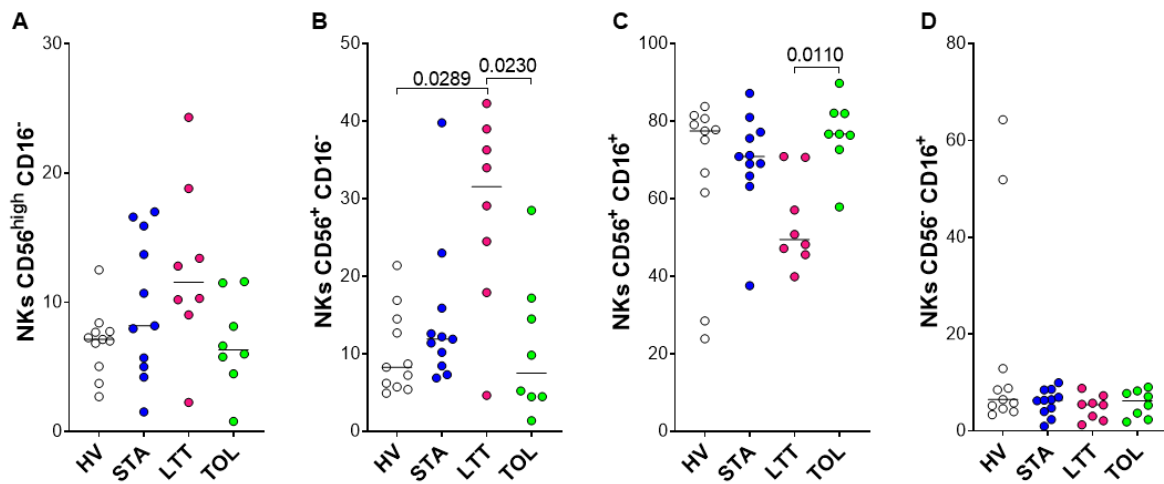




Supplementary figure 8 : Frequency of all Dendritic Cells (DCs) clusters. **A-F** Frequency median (%) in total DCs for each individuals groups of the 6 DC clusters. **G** : GZMB expression (MFI) for each individuals groups of the 6<sup>th</sup> DC cluster. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. **H** : HeatMap representation of the frequency median (%) of the 6 DC clusters for each individuals groups.

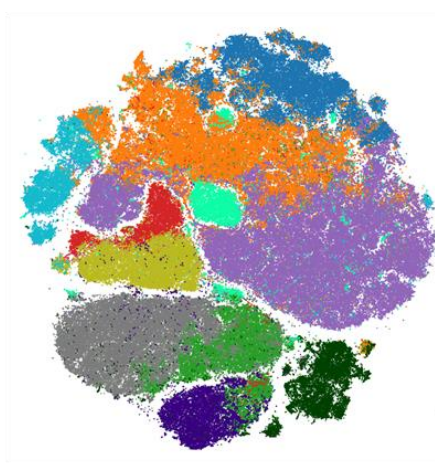


Supplementary figure 9 : NK cells gating strategies in each groups of the cohort using 4 representative individuals. NKs expressed CD56 and CD16 with the following NKs sub-populations separation:  $CD56^{high} CD16^{-}$ ,  $CD56^{+} CD16^{-}$ ,  $CD56^{+} CD16^{+}$ ,  $CD56^{-} CD16^{+}$ .



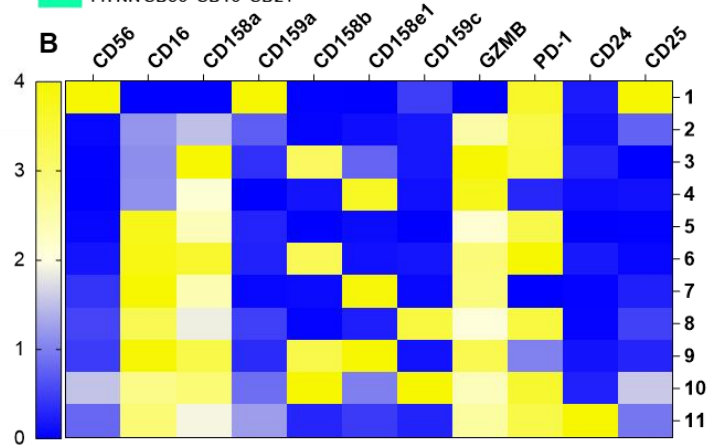
Supplementary figure 10 : NK cells compartment phenotyping. Frequency median in total NKs for each individuals groups of **A** : NKs  $CD56^{high} CD16^{-}$  (%), **B** : NKs  $CD56^{+} CD16^{-}$  (%), **C** : NKs  $CD56^{+} CD16^{+}$  (%), **D** : NKs  $CD56^{-} CD16^{+}$  (%). The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.

**A**

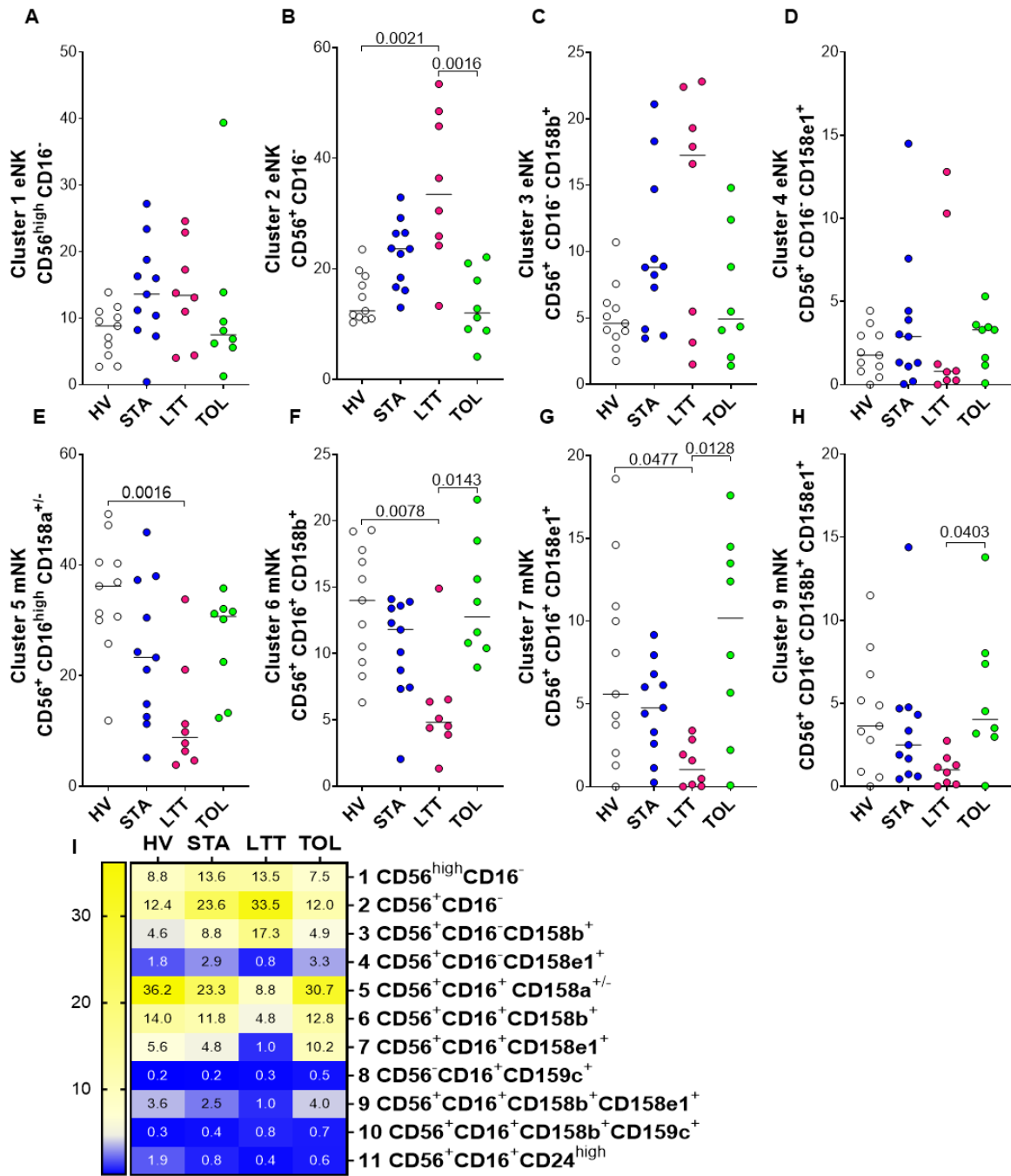


- 1: NK CD56<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup>
- 2: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>
- 3: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> CD158b<sup>+</sup>
- 4: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> CD158e1<sup>+</sup>
- 5: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD158a<sup>+</sup>
- 6: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup>
- 7: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD158e1<sup>+</sup>
- 8: NK CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD159c<sup>+</sup>
- 9: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> CD158e1<sup>+</sup>
- 10: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD158b<sup>+</sup> CD159c<sup>+</sup>
- 11: NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD24<sup>high</sup>

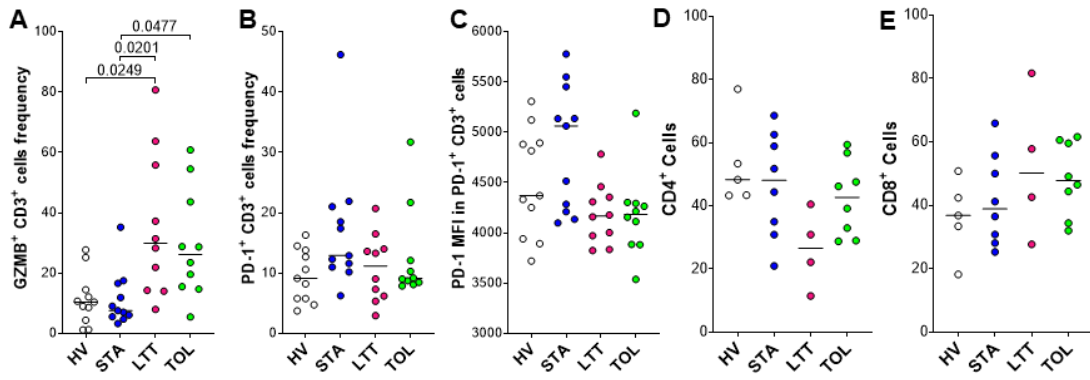
**B**



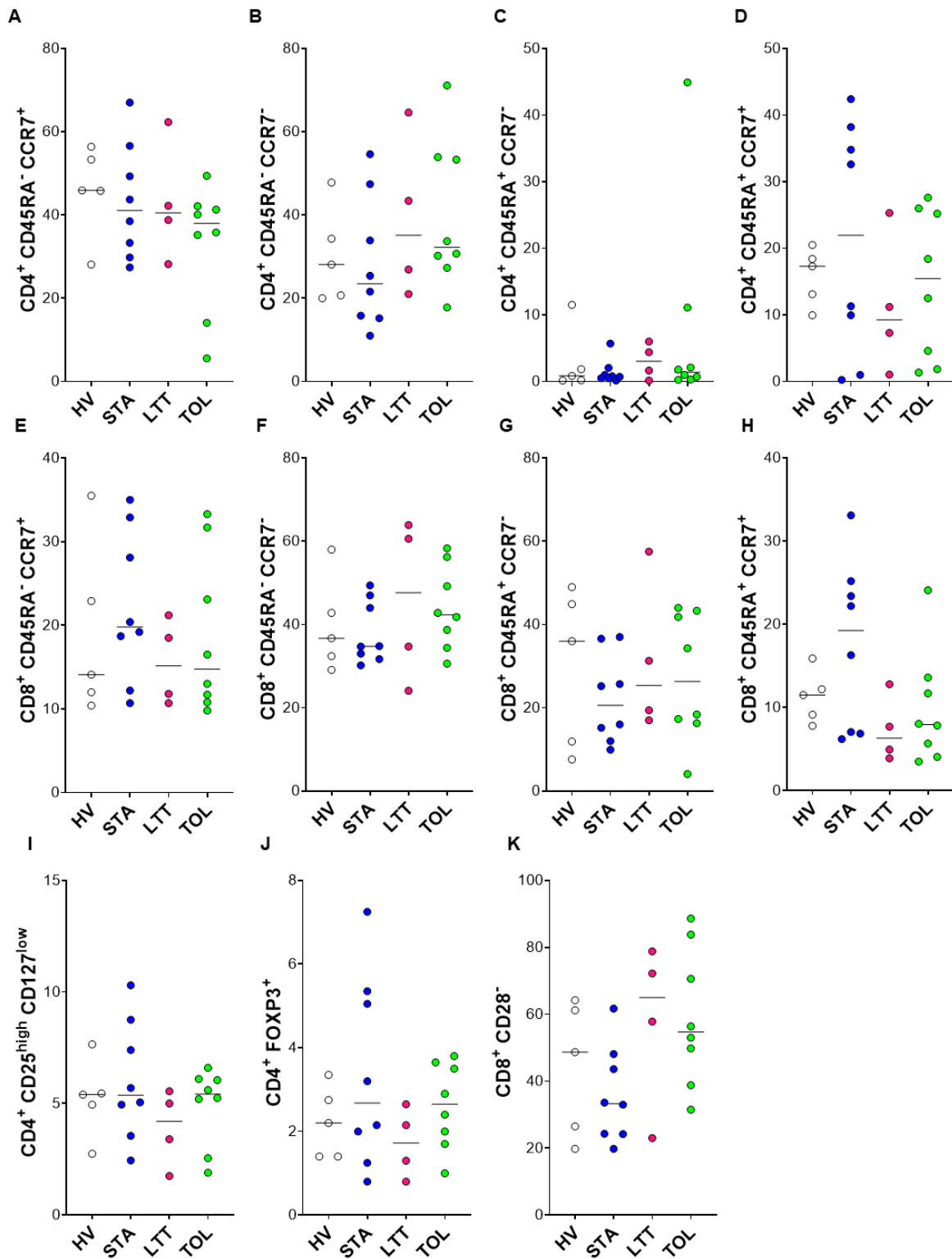
Supplementary Figure 11 : Unsupervised clusterization of NKs. **A** : Fitsne representation of the total NKs of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : HeatMap representation of each NKs markers expression in the 11 clusters of Healthy Volunteers.



Supplementary figure 12 : Frequency of NKs clusters. A-H Frequency median (%) in total NKs cells for each individuals groups of clusters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. I : HeatMap representation of the frequency median (%) of the 11 NKs clusters for each individuals groups.

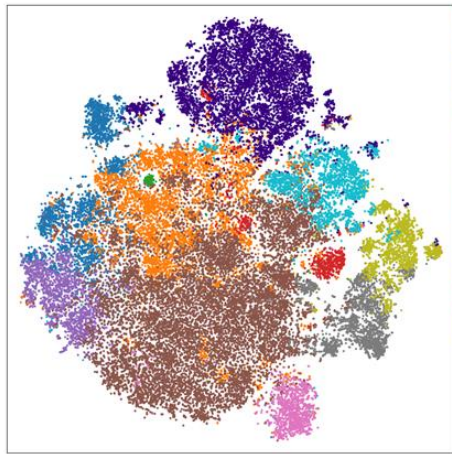


Supplementary figure 13 : T cells compartment phenotyping. Median in total T cells (CD3<sup>+</sup>) for each individuals groups of **A** (panel1): GZMB<sup>+</sup> cells frequency (%), **B** (panel 1): PD-1<sup>+</sup> cells frequency (%), **C** (panel 1): PD-1 expression (MFI), **E** (panel 2): CD4<sup>+</sup> cells frequency, **F** (panel 2): CD8<sup>+</sup> cells frequency. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



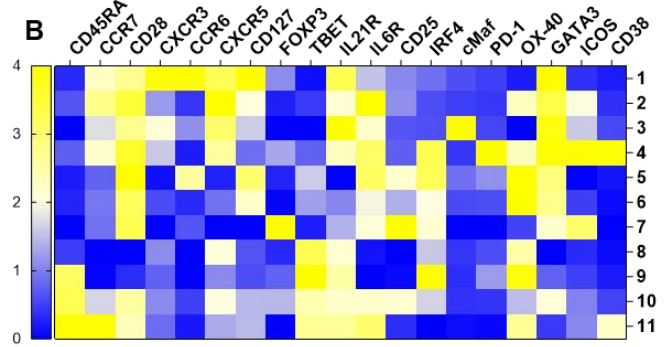
Supplementary figure 14 : T cells compartment phenotyping in panel 2 markers. Frequency median in total T cells (CD3<sup>+</sup>) for each individuals groups of **A** : CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> (%), **B** : CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> (%), **C** : CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> (%), **D** : CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> (%), **E** : CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> (%), **F** : CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> (%), **G** : CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> (%), **H** : CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> (%), **I** : CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> (%), **J** : FOXP3<sup>+</sup> (%), **K** : CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> (%). The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.

**A**

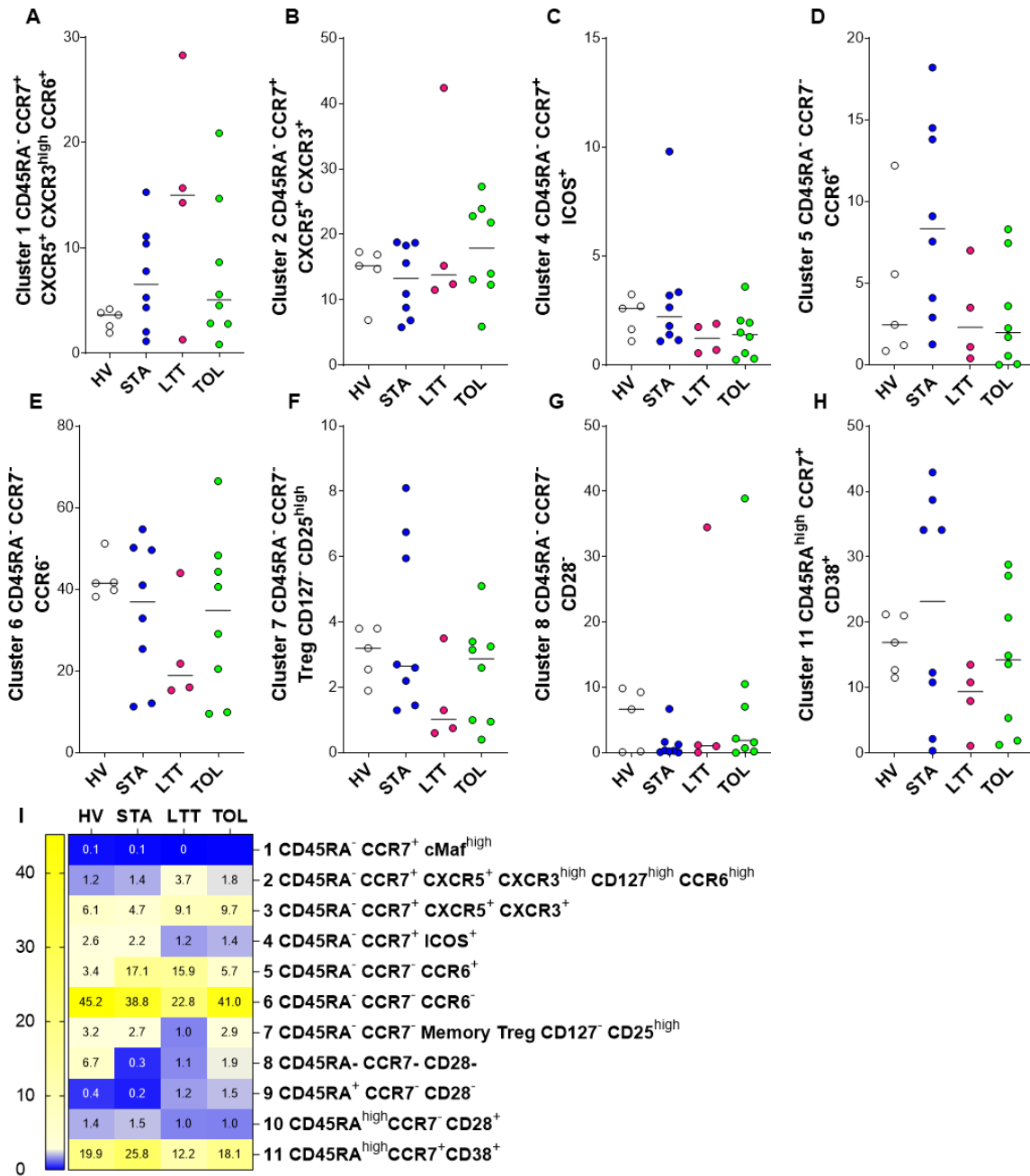


- 1: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>high</sup> CD127<sup>high</sup> CCR6<sup>high</sup>
- 2: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>
- 3: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> cMaf<sup>high</sup>
- 4: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>
- 5: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup>
- 6: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>
- 7: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> Memory Treg CD127<sup>-</sup> CD25<sup>high</sup>
- 8: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>
- 9: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup>
- 10: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>+</sup>
- 11: CD45RA<sup>high</sup> CCR7<sup>high</sup> CD38<sup>+</sup>

**B**



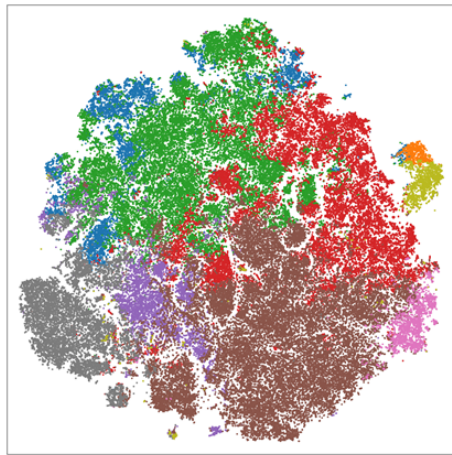
Supplementary Figure 15 : Unsupervised clusterization of CD4 T cells. **A** : t-SNE representation of the total CD4 T cells of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : HeatMap representation of each T cell markers expression in the 11 clusters of Healthy Volunteers.



Supplementary figure 16 : Frequency of CD4 T cells clusters. A-H Frequency median (%) in total CD4 T cells for each individuals groups of clusters 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. I : HeatMap representation of the frequency median (%) of the 11 CD4 T cell clusters for each individuals groups.

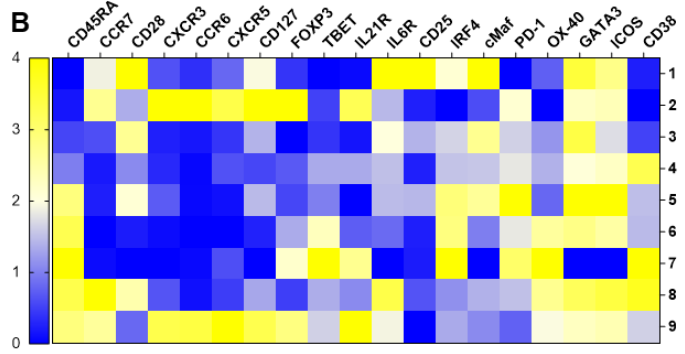


**A**

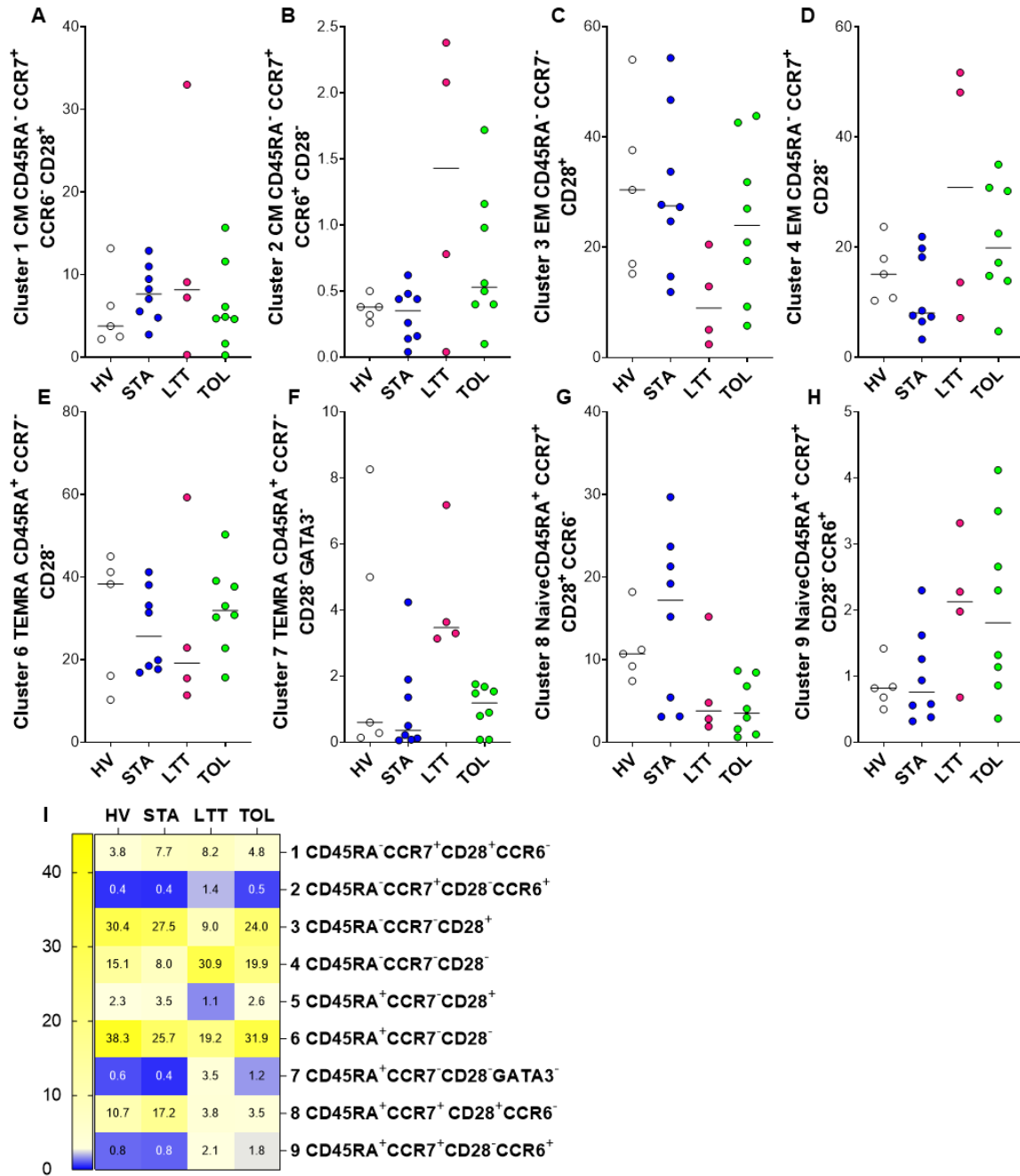


- 1: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>
- 2: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup>
- 3: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>+</sup>
- 4: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup>
- 5: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>+</sup>
- 6: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup>
- 7: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup> GATA3<sup>+</sup>
- 8: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>
- 9: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup>

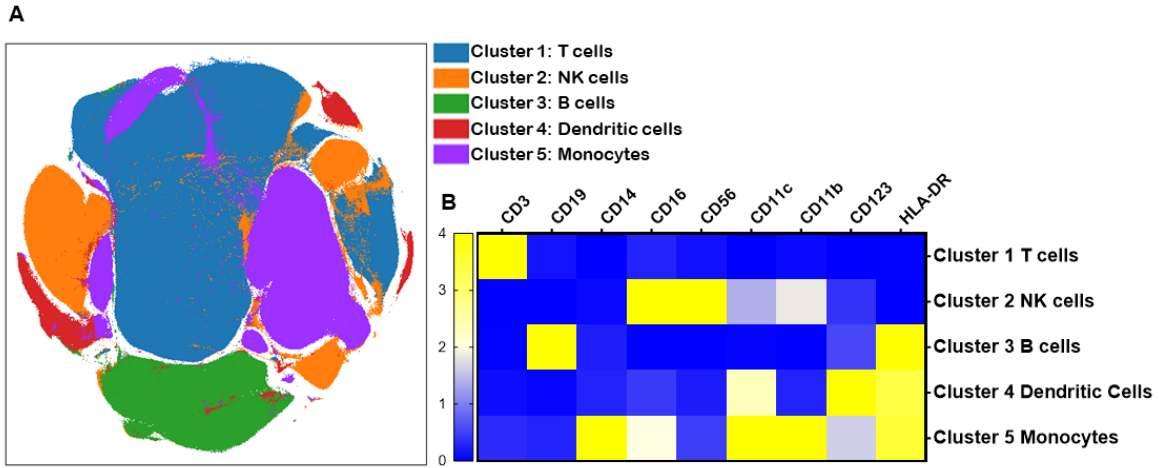
**B**



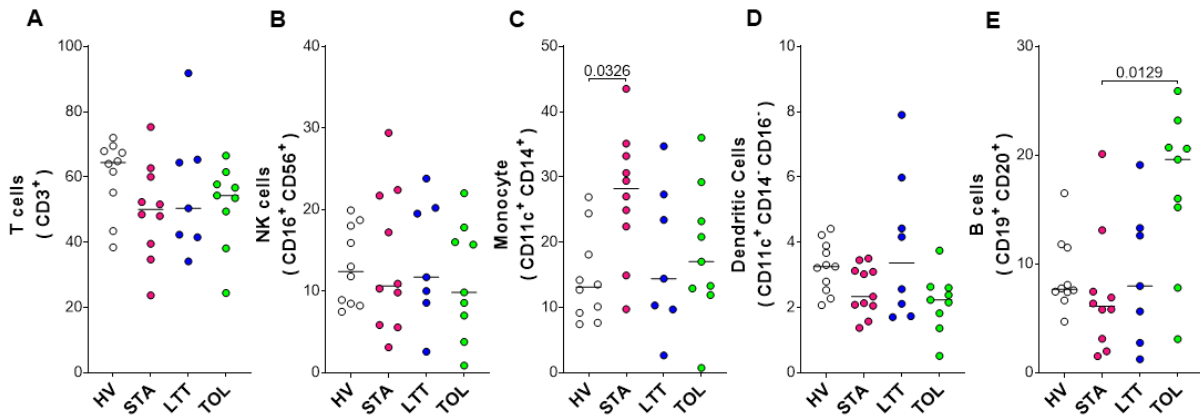
Supplementary Figure 17 : Cleusteurization of CD8 T cells. **A** : Fitsne representation of the total CD8 T cells of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : Fitsne representation of the total CD8 T cells of the individuals of the cohort colored according to their expression of T cells markers. **C** : HeatMap representation of each T cell markers expression in the 9 clusters of Healthy Volunteers.



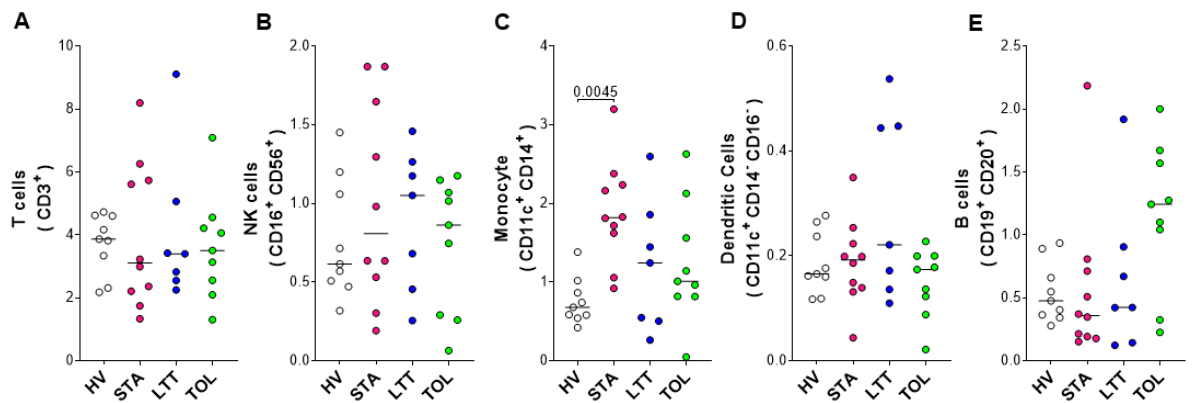
Supplementary figure 18 : Frequency of CD8 T cells clusters. A-H Frequency median (%) in total CD8 T cells for each individuals groups of clusters 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test. I : HeatMap representation of the frequency median (%) of the 9 CD8 T cell clusters for each individuals groups.



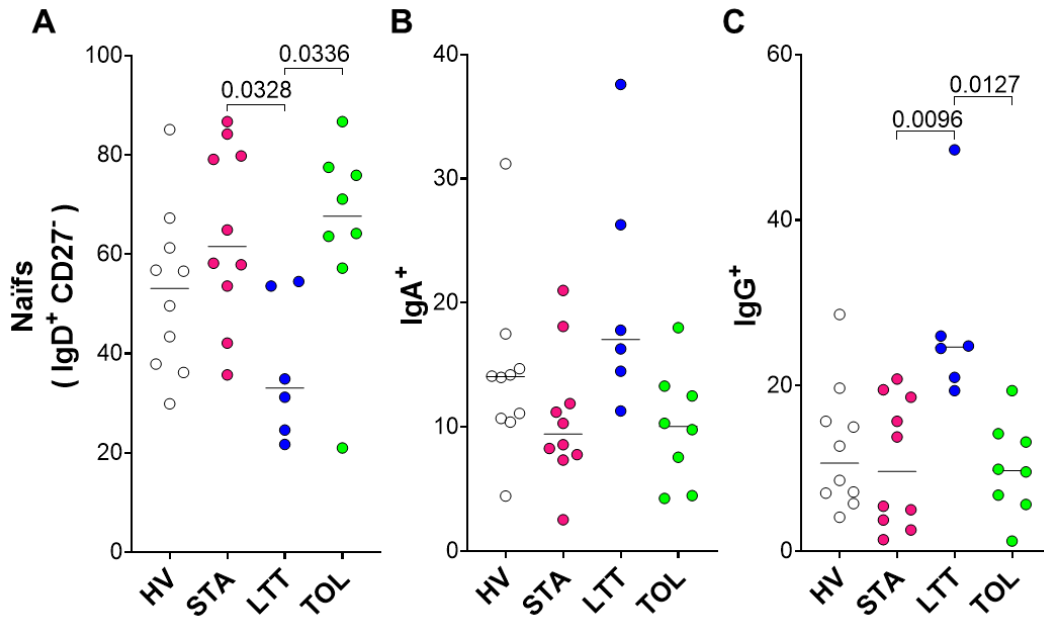
Supplementary Figure 19 : Unsupervised clusterization of PBMCs **A** : Fitsne representation of the total PBMCs of the individuals of the cohort colored according to their cluster identified by FlowSom. **B** : HeatMap representation of each PBMCs markers expression in the 5 PBMCs clusters of Healthy Volunteers.



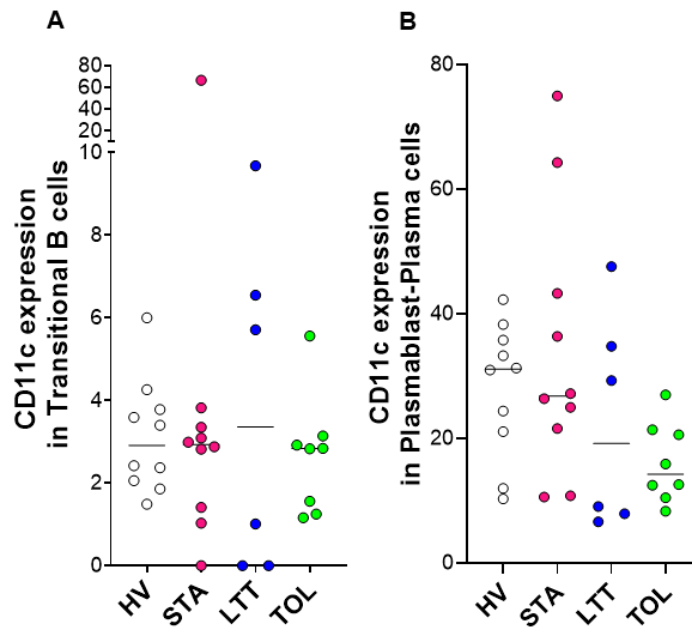
Supplementary Figure 20 : Unsupervised analysis of the main PBMCs population frequencies. Frequency median (%) in total PBMCs for each individuals groups of **A** : T cells (CD3<sup>+</sup>), **B** : NK cells (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>), **C** : Monocytes (CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>), **D** : Dendritic cells (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>) **E** : B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>). The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



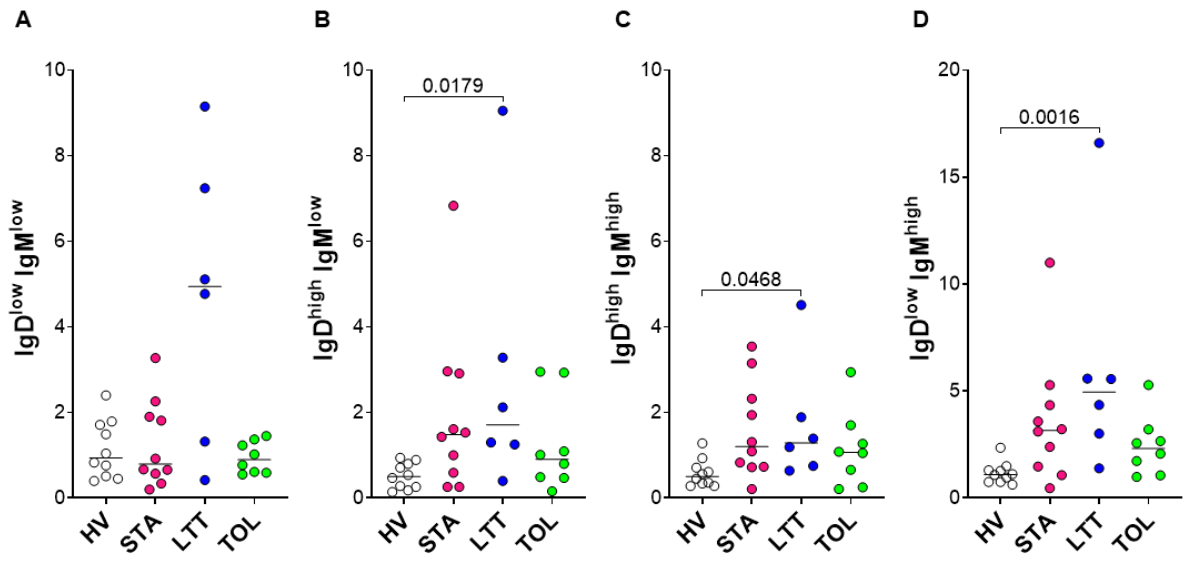
Supplementary Figure 21 : Unsupervised analysis of the main PBMCs population absolute value. Absolute value median (Giga/L) in total PBMCs for each individuals groups of **A** : T cells (CD3<sup>+</sup>), **B** : NK cells (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>), **C** : Monocytes (CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>), **D** : Dendritic cells (CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>) **E** : B-cells (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>). The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



Supplementary figure 22 : Supervised analyses of the B cell compartment. Frequency median (%) in total B cells for each individuals groups of **A** : naive B cells (IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), **B** : IgA<sup>+</sup> B cells, **C** : IgG<sup>+</sup> B cells. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



Supplementary figure 23 : CD11c<sup>+</sup> cells frequency median in transitional B-cells and plasmablasts-plasma cells. **A** : Frequency median (%) in transitional B-cells of CD11c<sup>+</sup> B-cells. **B** : Frequency median (%) in plasmablasts-plasma cell of CD11c<sup>+</sup> B-cells. Each single individual values are indicating by the points and medians are indicating by the bars. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test.



Supplementary figure 24 : CD11c<sup>+</sup> B-cell repartition in unswitch class B-cells. Frequency median (%) of CD11c<sup>+</sup> B-cells in total B-cells for each individuals groups in **A** : IgD<sup>low</sup> IgM<sup>low</sup> B-cells, **B** : IgD<sup>high</sup> IgM<sup>low</sup> B-cells, **C** : IgD<sup>high</sup> IgM<sup>high</sup> B-cells, **D** : IgD<sup>low</sup> IgM<sup>high</sup> B-cells. The bars indicate the median, and each point represents a single individual. The P values were calculated using nonparametric ANOVA (Kruskal–Wallis) with the Dunn multiple comparisons test using LTT group as control.

## G. Références

- Austin, J. W., Buckner, C. M., Kardava, L., Wang, W., Zhang, X., Melson, V. A., Swanson, R. G., Martins, A. J., Zhou, J. Q., Hoehn, K. B., Nicholas Fisk, J., Dimopoulos, Y., Chassiakos, A., O'Dell, S., Smelkinson, M. G., Seamon, C. A., Kwan, R. W., Sneller, M. C., Pittaluga, S., ... Moir, S. (2019). Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B-cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Science Translational Medicine*, 11(520), 10–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax0904>
- Benítez, C., Londoño, M. C., Miquel, R., Manzia, T. M., Abrales, J. G., Lozano, J. J., Martínez-Llordella, M., López, M., Angelico, R., Bohne, F., Sese, P., Daoud, F., Larcier, P., Roelen, D. L., Claas, F., Whitehouse, G., Lerut, J., Pirenne, J., Rimola, A., ... Sánchez-Fueyo, A. (2013). Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*, 58(5), 1824–1835. <https://doi.org/10.1002/hep.26426>
- Brar, J. E., & Nader, N. D. (2014). Immune minimization strategies in renal transplantation. *Immunological Investigations*, 43(8), 807–818. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.937492>
- Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2007). Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant International*, 20(10), 845–855. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x>
- Braza, F., Dugast, E., Panov, I., Paul, C., Vogt, K., Pallier, A., Chesneau, M., Baron, D., Guerif, P., Lei, H., Laplaud, D. A., Volk, H. D., Degauque, N., Giral, M., Souillou, J. P., Sawitzki, B., & Brouard, S. (2015). Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(8), 1795–1805. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014050480>
- Chenouard, A., Chesneau, M., Bui Nguyen, L., Le Bot, S., Cadoux, M., Dugast, E., Paul, C., Malard-Castagnet, S., Ville, S., Guérif, P., Souillou, J. P., Degauque, N., Danger, R., Giral, M., & Brouard, S. (2017). Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B-cell Help. *American Journal of Transplantation*, 17(6), 1490–1501. <https://doi.org/10.1111/ajt.14142>
- Chesneau, M., Mai, H. Le, Danger, R., Le Bot, S., Nguyen, T.-V.-H., Bernard, J., Poullaouec, C., Guerif, P., Conchon, S., Giral, M., Charreau, B., Degauque, N., & Brouard, S. (2020). Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B-cells with Potent Regulatory Properties. *The Journal of Immunology*, 205(9), 2391–2401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000335>
- Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A., Souillou, J.-P., Giral, M., Degauque, N., Chiffolleau, E., & Brouard, S. (2015). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B-cells with Regulatory Properties. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(10), 2588–2598. <https://doi.org/10.1681/asn.2014040404>
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D. A., Degauque, N., Souillou, J. P., Tarte, K., & Brouard, S. (2014). Unique B-cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 14(1), 144–155. <https://doi.org/10.1111/ajt.12508>
- Coemans, M., Süsal, C., Döhler, B., Anglicheau, D., Giral, M., Bestard, O., Legendre, C., Emonds, M. P., Kuypers, D., Molenberghs, G., Verbeke, G., & Naesens, M. (2018). Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney

transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney International*, 94(5), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.05.018>

Dugast, E., David, G., Oger, R., Danger, R., Judor, J. P., Gagne, K., Chesneau, M., Degauque, N., Paul, P., Picard, C., Guerif, P., Conchon, S., Giral, M., Gervois, N., Retière, C., & Brouard, S. (2017). Broad impairment of natural killer cells from operationally tolerant kidney transplanted patients. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01721>

Dugast, E., Souillou, J. P., Foucher, Y., Papuchon, E., Guerif, P., Paul, C., Riochet, D., Chesneau, M., Cesbron, A., Renaudin, K., Dantal, J., Giral, M., & Brouard, S. (2016). Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 16(11), 3255–3261. <https://doi.org/10.1111/ajt.13946>

Dujardin, A., Chesneau, M., Dubois, F., Danger, R., Bui, L., Kerleau, C., Guérif, P., Brouard, S., & Dantal, J. (2021). Clinical and immunological follow-up of very long-term kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors indicates dual phenotypes. *Kidney International*, 99(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.036>

Dumontet, E., Danger, R., Vagefi, P. A., Londoño, M. C., Pallier, A., Lozano, J. J., Giral, M., Degauque, N., Souillou, J. P., Martínez-Llordella, M., Lee, H., Latournerie, M., Boudjema, K., Dulong, J., Tarte, K., Sanchez-Fueyo, A., Feng, S., Brouard, S., & Conchon, S. (2016). Peripheral phenotype and gene expression profiles of combined liver-kidney transplant patients. *Liver International*, 36(3), 401–409. <https://doi.org/10.1111/liv.12917>

Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vítko, Š., Nashan, B., Gürkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyó, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloz, P., & Halloran, P. F. (2007). Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2562–2575. <https://doi.org/10.1056/nejmoa067411>

Emmaneel, A., Quintelier, K., Sichien, D., Rybakowska, P., Marañón, C., Alarcón-Riquelme, M. E., Van Isterdael, G., Van Gassen, S., & Saeys, Y. (2022). PeacoQC: Peak-based selection of high quality cytometry data. *Cytometry Part A*, 101(4), 325–338. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24501>

Feng, S., Ekong, U. D., Lobritto, S. J., Demetris, A. J., Roberts, J. P., Rosenthal, P., Alonso, E. M., Philogene, M. C., Ikle, D., Poole, K. M., Bridges, N. D., Turka, L. A., & Tchao, N. K. (2012). Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA*, 307(3), 283–293. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.2014>

Fishman, J. A. (2007). Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2601–2614. <https://doi.org/10.1056/nejmra064928>

Golinski, M. L., Demeules, M., Derambure, C., Riou, G., Maho-Vaillant, M., Boyer, O., Joly, P., & Calbo, S. (2020). CD11c+ B-cells Are Mainly Memory Cells, Precursors of Antibody Secreting Cells in Healthy Donors. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00032>

Hao, Y., O'Neill, P., Naradikian, M. S., Scholz, J. L., & Cancro, M. P. (2011). A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood*, 118(5), 1294–1304. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330530>

Isnardi, I., Ng, Y. S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J. H., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2010). Complement receptor 2/CD21- human naive B-cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood*, 115(24), 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243071>

Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B-cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 49(4), 725-739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>

Karnell, J. L., Kumar, V., Wang, J., Wang, S., Voynova, E., & Ettinger, R. (2017). Role of CD11c+ T-bet+ B-cells in human health and disease. *Cellular Immunology*, 321(May), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.008>

Li, H., Borrego, F., Nagata, S., & Tolnay, M. (2016). Fc Receptor–like 5 Expression Distinguishes Two Distinct Subsets of Human Circulating Tissue–like Memory B-cells. *The Journal of Immunology*, 196(10), 4064–4074. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501027>

Li, Y., Li, Z., & Hu, F. (2021). Double-negative (DN) B-cells: an under-recognized effector memory B-cell subset in autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 205(2), 119–127. <https://doi.org/10.1111/cei.13615>

Lozano, J. J., Pallier, A., Martinez-Llordella, M., Danger, R., López, M., Giral, M., Londoño, M. C., Rimola, A., Souillou, J. P., Brouard, S., & Sánchez-Fueyo, A. (2011). Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *American Journal of Transplantation*, 11(9), 1916–1926. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x>

Masset, C., Dantal, J., Souillou, J. P., Walencik, A., Delbos, F., Brouard, S., & Giral, M. (2022). Case Report: Long-term observations from the tacrolimus weaning randomized clinical trial depicts the challenging aspects for determination of low-immunological risk patients. *Frontiers in Immunology*, 13(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021481>

Moir, S., Malaspina, A., Ho, J., Wang, W., DiPoto, A. C., O’Shea, M. A., Roby, G., Mican, J. A. M., Kottlil, S., Chun, T. W., Proschan, M. A., & Fauci, A. S. (2008). Normalization of B-cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *Journal of Infectious Diseases*, 197(4), 572–579. <https://doi.org/10.1086/526789>

Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., Hernandez-Fuentes, M. P., Turka, L. A., & Seyfert-Margolis, V. L. (2010). Identification of a B-cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1836–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI39933>

Newell, K. A., Asare, A., Sanz, I., Wei, C., Rosenberg, A., Gao, Z., Kanaparthi, S., Asare, S., Lim, N., Stahly, M., Howell, M., Knechtle, S., Kirk, A., Marks, W. H., Kawai, T., Spitzer, T., Tolkoff-Rubin, N., Sykes, M., Sachs, D. H., ... Turka, L. A. (2015). Longitudinal studies of a B-cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 15(11), 2908–2920. <https://doi.org/10.1111/ajt.13480>

Ojo, A. O., Held, P. J., Port, F. K., Wolfe, R. A., Leichtman, A. B., Young, E. W., Arndorfer, J., Christensen, L., & Merion, R. M. (2003). Chronic Renal Failure after Transplantation of a Nonrenal Organ. *New England Journal of Medicine*, 349(10), 931–940. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021744>

Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J. J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B-cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 78(5), 503–513. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.162>



- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., & Cosimi, A. B. (2002). Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 346(8), 580–590. <https://doi.org/10.1056/nejmra011295>
- Rincon-Arevalo, H., Wiedemann, A., Stefanski, A. L., Lettau, M., Szelinski, F., Fuchs, S., Frei, A. P., Steinberg, M., Kam-Thong, T., Hatje, K., Keller, B., Warnatz, K., Radbruch, A., Lino, A. C., Schrezenmeier, E., & Dörner, T. (2021). Deep Phenotyping of CD11c+ B-cells in Systemic Autoimmunity and Controls. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635615>
- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J. F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S., & Souillou, J. P. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6(4), 736–746. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01280.x>
- Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R. T., Gillis, J. Z., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, 118(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>
- Saadoun, D., Terrier, B., Bannock, J., Vazquez, T., Massad, C., Kang, I., Joly, F., Rosenzweig, M., Sene, D., Benech, P., Musset, L., Klatzmann, D., Meffre, E., & Cacoub, P. (2013). Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B-cells in sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis and Rheumatism*, 65(4), 1085–1096. <https://doi.org/10.1002/ART.37828>
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., Rovis, F., Jimenez, E., Ballou, A., Giral, M., Rebollo-Mesa, I., Le Moine, A., Braudeau, C., Hilton, R., Gerstmayr, B., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–1861. <https://doi.org/10.1172/JCI39922>
- Sailliet, N., Mai, H. Le, Dupuy, A., Tilly, G., Fourgeux, C., Braud, M., Giral, M., Robert, J. M., Degauque, N., Danger, R., Poschmann, J., & Brouard, S. (2023). Human granzyme B regulatory B-cells prevent effector CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism dependent from lymphotoxin alpha. *Frontiers in Immunology*, 14(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1183714>
- Silva, H. M., Takenaka, M. C. S., Moraes-Vieira, P. M. M., Monteiro, S. M., Hernandez, M. O., Chaara, W., Six, A., Agena, F., Sesterheim, P., Barbé-Tuana, F. M., Saitovitch, D., Lemos, F., Kalil, J., & Coelho, V. (2012). Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Molecular Medicine*, 18(5), 733–743. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00281>
- Sundling, C., Rönnerberg, C., Yman, V., Asghar, M., Jahnmatz, P., LakshmiKanth, T., Chen, Y., Mikes, J., Forsell, M. N., Sondén, K., Achour, A., Brodin, P., Persson, K. E. M., & Färnert, A. (2019). B-cell profiling in malaria reveals expansion and remodeling of CD11c+ B-cell subsets. *JCI Insight*, 4(9). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126492>
- Van Gassen, S., Gaudilliere, B., Angst, M. S., Saeys, Y., & Aghaeepour, N. (2020). CytoNorm: A Normalization Algorithm for Cytometry Data. *Cytometry Part A*, 97(3), 268–278. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23904>
- Wang, L., Rondaan, C., de Joode, A. A. E., Raveling-Eelsing, E., Bos, N. A., & Westra, J. (2021). Changes in T and B-cell subsets in end stage renal disease patients before and after kidney transplantation. *Immunity and Ageing*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00254-9>
- Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J. L., Naiman, B., Gross, P. S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holoweckyj, N., Liu, H., Casey, K., Smith, M., Parker, M., White, N., Riggs, J., Ward, B., Bhat, G., ... Ettinger, R. (2018). IL-21

drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c<sup>hi</sup>T-bet<sup>+</sup> B-cells in SLE. *Nature Communications*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>

Wimmer, C. D., Rentsch, M., Crispin, A., Illner, W. D., Arbogast, H., Graeb, C., Jauch, K. W., & Guba, M. (2007). The janus face of immunosuppression - De novo malignancy after renal transplantation: The experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney International*, 71(12), 1271–1278. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002154>

# Discussion et Perspectives

Les deux études de ce travail ont donc permis de mettre en évidence des différences phénotypiques parmi les patients TOL et LTT. Cependant, certaines limites peuvent être discutées.

## I. Limites rencontrées dans nos deux études

Nos deux études se basent sur des analyses de cytométrie spectrales réalisées chez 4 groupes d'un total de 34 individus. Bien que nous ayant permis de mettre en avant des variations de de plusieurs phénotypes de LB entre ces différents groupes, ce nombre d'individus est relativement faible et nécessite une validation de nos résultats sur de nouveaux sujets. A cause de la rareté des patients TOL, cette validation n'a pas pu être faite durant ce travail mais est en préparation.

Ces études ne présentent pas non plus de tests fonctionnels des 2 populations de LB que nous avons identifiées qui seront nécessaires pour valider nos hypothèses. Les LTT présentent une fréquence de LB CD11c<sup>+</sup> de l'ordre de 30%. Bien qu'à l'instar des TOL nous disposions de peu de matériel biologique relatif à ces patients, cette population pourrait être suffisamment importante chez ces patients pour permettre leur tri et leur manipulation pour des tests fonctionnels. L'analyse transcriptionnelle des populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup> a été réalisée par un tri intracellulaire basée sur l'expression des protéines TCL1A et IgD. Pour procéder à des tests fonctionnels la limitation est de devoir s'affranchir de l'expression de TCL1A pour le tri des deux populations car elle nécessite la perméabilisation et la mort des cellules. Après enrichissement des LB naïfs IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>, nous procéderons à un tri se basant sur des marqueurs extracellulaires, les plus utiles à la segmentation des 2 populations afin de pouvons isoler ces deux populations vivantes et procéder à des tests fonctionnels. Nous avons déjà essayé de trier les populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup> en nous basant sur leur expression différentielle d'IgD et de CD24, les 2 marqueurs les plus utiles à la segmentation des populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup>. A partir d'un échantillon de volontaire sain, nous avons obtenu suffisamment de cellules pour procéder à un test de différenciation *in vitro* des 2 populations. Cependant suite à ce tri, le marquage de contrôle de l'expression intracellulaire n'a pas montré une différence d'expression de TCL1A aussi marquée entre les deux populations par rapport au tri intracellulaire. Nous savons chez les volontaires sains que la fréquence de LB TCL1A<sup>low</sup> peut

varier et il est possible que réitérer cette expérience chez un nombre suffisant de sujets puisse permettre un tri satisfaisant chez certains d'entre eux. De plus, la caractérisation phénotypique des cellules  $TCL1A^{low}$  et la validation des molécules mises en évidence dans l'analyse transcriptomique devraient nous permettre d'identifier d'autres marqueurs permettant d'améliorer la discrimination des cellules  $TCL1A^{low}$ .

Nous n'avons également pas pu déterminer le profil transcriptomique des populations  $TCL1A^{low}$  et  $TCL1A^{high}$  chez les patients LTT et TOL car cette analyse nécessite une quantité de cellules B en inadéquation avec le matériel biologique que nous sommes à même de pouvoir collecter. Il est toutefois possible que la caractérisation de cette population  $TCL1A^{low}$  chez de nouveaux volontaires sains nous apporte des pistes d'études et la mise à jour de marqueurs que nous pourrions ensuite tester chez les patients tolérants. Finalement, nous n'avons pas non plus analysé en détail la population de LB  $CD11c^+$  augmentés chez les LTT par manque d'échantillons de ces patients. Cependant, les LTT n'étant pas rares et la forte proportion de cette population chez les patients LTT devrait être suffisante pour permettre une caractérisation transcriptomique et fonctionnelle et à partir de nouveaux échantillons.

## II. Etude de la population de LB naïfs $TCL1A^{low}$ chez les patients tolérants

Cette étude a permis de confirmer les résultats de nos précédentes études concernant la conditions spécifiques des LB des patients tolérants à savoir une augmentation de leur fréquence et de leur valeur absolue associée à une proportion accrue de LB naïfs par rapport aux autres groupes de patients (M. Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010; Silva et al., 2012). Nous avons également mis en évidence pour la première fois une augmentation chez les patients tolérants de LB  $TCL1A^+$ . Ce résultat confirme ainsi à l'échelle protéique l'augmentation du transcrit *TCL1A* dans le sang de ces patients (Azim et al., 2023; Baron et al., 2015; Braud et al., 2008; Brouard et al., 2007; Christakoudi et al., 2020; Danger et al., 2017; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). L'analyse non supervisée des LB des patients de cette cohorte nous a de plus permis de constater une segmentation des LB naïfs ( $IgD^+ CD27^-$ ) basée sur l'expression de *TCL1A* et l'émergence d'une population de LB naïfs  $TCL1A^{low}$  accrue chez les patients tolérants. Cette population  $TCL1A^{low}$  se distingue également par une expression réduite des marqueurs *IgD*, *CD24*, *CD38*, *CD9*, *CD25* et *HLA-DR* par rapport aux LB  $TCL1A^{high}$ . Cette population  $TCL1A^{low}$  étant également présente dans une

moindre mesure que chez les patients tolérants chez les volontaires sains, nous avons entrepris le tri de cette population chez 6 nouveaux volontaires sains pour étudier son profil transcriptionnel. L'étude transcriptionnelle de cette population  $TCL1A^{low}$  vs  $TCL1A^{high}$  chez de nouveaux volontaires sains a permis de mettre en évidence un profil transcriptomique pro-apoptotique en cohérence avec le rôle anti-apoptotique de  $TCL1A$  dans les LB (Tabrizi et al., 2009; J.-M. Wang et al., 1999), ainsi qu'avec le caractère pro-apoptotique observé dans les LB des patients tolérants (M. Chesneau et al., 2014; Le Berre et al., 2021). L'analyse transcriptionnelle montre également dans la population  $TCL1A^{low}$  l'expression réduite de plusieurs gènes impliqués dans l'activation et la différenciation T-dépendante des LB notamment *B7RP1*, *IL21R*, *IL16* et *TCF4* (Kaser et al., 2000; Kuchen et al., 2007; Liu et al., 2015; Wöhner et al., 2016). Cela est cohérent avec l'implication de  $TCL1A$  dans la différenciation des LB dont l'expression induite de façon prolongée a été observée comme favorisant l'expression de AID ainsi que des facteurs de transcription *BLIMP1*, *XBP1* et *IRF4* (Kriss et al., 2012). Cela coïncide aussi avec la capacité réduite de différenciation en plasmocytes et d'expression de ces mêmes facteurs de transcription observés lors de la différenciation *in vitro* des LB des patients tolérants (M. Chesneau et al., 2014). L'analyse GSEA de l'ensemble des gènes exprimés différemment entre les populations  $TCL1A^{low}$  et  $TCL1A^{high}$  montre l'expression augmentée d'acteurs impliqués dans la signalisation de l'IL-10, incluant *IL-10RA* dans la population  $TCL1A^{low}$  suggérant une sensibilité accrue de cette population à la régulation via l'IL-10 allant également dans le sens de cellules pro-tolérantes. L'analyse transcriptomique de la population  $TCL1A^{low}$  révèle aussi une expression accrue de *CCR7* et *SELL* (*CD62L*), des marqueurs impliqués dans le trafic et l'adressage des LB aux organes lymphoïdes secondaires, ce qui pourrait suggérer une capacité accrue de la population  $TCL1A^{low}$  à transiter de la périphérie vers les tissus lymphoïdes (Calpe et al., 2011). Pour finir nous avons observé dans cette population au niveau protéique et transcriptomique une altération de la signalisation du BCR comprenant une diminution de l'expression d'IgD, *PTPN22*, *MS4A1*, *CD79A* et *PTPRC* ainsi qu'une diminution de marqueurs impliqués dans la présentation d'antigène incluant *HLA-DR* et *CTSS* et une réduction de l'expression de *CD25* (*IL2RA*). Ce phénotype est particulièrement évocateur de LB en état d'anergie ou d'exhaustion (Andrews et al., 2013; Fulcher & Basten, 1994; Goodnow et al., 1988; Pillai & Cariappa, 2009). Ce phénotype pourrait expliquer leur caractère pro-apoptotique ainsi que leur capacité réduite à se différencier. Une population de LB naïfs avec un tel phénotype et en si forte proportion chez les patients tolérants irait dans

le sens d'un compartiment de LB ne prenant pas part à la réponse allo-immune et/ou qui participe à la juguler, favorisant ainsi l'état de tolérance.

Pour tester cette hypothèse et ses différents aspects sur cette population de LB naïfs  $TCL1A^{low}$ , nous procéderons à la validation à l'échelle protéique de l'ensemble des marqueurs que nous avons identifiés ainsi que de nouveaux pouvant participer à notre hypothèse. Ces tests seront réalisés d'abord sur de nouveaux volontaires sains possédant une proportion de LB  $TCL1A^{low}$  suffisante pour permettre son étude. Les résultats qui en découleront permettront de préciser nos hypothèses pour ensuite pouvoir les tester chez de nouveaux patients tolérants. Ces premiers tests seront réalisés par cytométrie spectrale à partir de PBMC totales. Nous utiliserons un panel d'anticorps comprenant un pool de marqueurs pour la définition des principales populations de LB et la population  $TCL1A^{low}$  auxquels s'ajouteront nos marqueurs d'intérêts. Nous procéderons également à un tri des populations  $TCL1A^{low}$  et  $TCL1A^{high}$  utilisant la même méthode que dans notre étude. A partir de celui-ci nous pourrions explorer plusieurs voies d'intérêt par Western-Blot. Nous testerons ensuite nos hypothèses par des tests fonctionnels suite au tri des populations  $TCL1A^{low}$  et  $TCL1A^{high}$  vivantes pour leur mise en culture.

Etant donné l'hypothèse d'une population anergique à faible capacité de différenciation, nous comptons mesurer par cytométrie l'expression des marqueurs impliqués dans la différenciation T-dépendante des LB (ex : IL-21R, ICAM3, ICOSL) pour constater à l'échelle protéique s'ils sont également diminués dans la population  $TCL1A^{low}$ . Nous testerons également l'expression de marqueurs associés à l'anergie des LB tels que CD22, CD72, CD95 dont l'augmentation d'expression pourrait refléter un état d'anergie. La mesure de l'expression de BAFFR pourra également être intéressante dans notre hypothèse. Sa forte expression dans les LB de patients transplantés stables a notamment été associée à une plus forte probabilité de dysfonction du greffon à long terme (Thibault-Espitia et al., 2012), et sa diminution a été décrite comme participant à la tolérance périphérique des LB immatures (Lesley et al., 2004). Sa diminution dans les LB  $TCL1A^{low}$  ira dans le sens d'une population pro-tolérante. Pour comparer la capacité de différenciation des populations  $TCL1A^{low}$  et  $TCL1A^{high}$  nous les trierons sur la base d'expression de marqueurs extra cellulaires et procéderons à leur différenciation *in vitro*. Après marquage préalable d'un marqueur de prolifération intracellulaire, les cellules seront mises en culture pendant 4 jours en présence d'IL-2, de Fab'2 anti-BCR, de CD40L et de

CpG ODN, puis lavées et cultivées jusqu'à 6 jours en présence d'IL-2, IL-4 et IL-10 (M. Chesneau et al., 2014; Le Gallou et al., 2012). Avant mise en culture ainsi qu'à 4 et 6 jours, une partie des cellules sera mise en tampon de lyse pour extraction de l'ARNm et analyse transcriptomique par technologie NanoString. L'autre partie des cellules sera marquée pour une étude de leur phénotype par cytométrie spectrale en utilisant le panel de marqueurs décrits précédemment. De cette façon nous pourrions tester au niveau protéique et transcriptomique les capacités d'activation, de prolifération et de différenciation de ces deux populations. La capacité des cellules à se différencier est mesurée par la fréquence de LB différenciés CD38<sup>high</sup> CD27<sup>high</sup> à Jx et par l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LB (ex : XBP1, BLIMP1, IRF4) (M. Chesneau et al., 2014). Nous nous attendons à observer selon nos hypothèses au niveau fonctionnel et de leur phénotype étudié à chaque étape une capacité réduite de prolifération et de différenciation dans la population TCL1A<sup>low</sup>.

Pour étudier le profil apoptotique de la population TCL1A<sup>low</sup> nous analyserons par cytométrie l'expression de la caspase-3 et de l'annexine V dans les LB à J0 et l'expression accrue de ces marqueurs dans les LB TCL1A<sup>low</sup> validera l'hypothèse d'une population pro-apoptotique. Plus encore, mesurer l'expression de ces deux marqueurs au cours des tests fonctionnels de différenciation des populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup> nous permettra de mieux apprécier le caractère pro-apoptotique de cette population une fois les cellules activées. Nous avons déjà constaté lors de la différenciation *in vitro* de LB naïfs de volontaires sains que l'expression de TCL1A était associée à une expression réduite de la caspase-3 pouvant suggérer de son expression accrue dans les LB TCL1A<sup>low</sup>. Nous trierons également les populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup> selon la même méthode que dans notre étude pour cette fois-ci mesurer par Western-Blot l'activation des différentes voies de l'apoptose et notamment celles impliquant TCL1A incluant la voie PI3K-Akt et l'activation de la voie NF-κB impliquées dans l'apoptose et liée à TCL1A, dont nous avons observé l'expression diminuée de plusieurs acteurs dans la population TCL1A<sup>low</sup>, ainsi que l'activation des protéines de la famille Bcl-2 (Tabrizi et al., 2009).

Nous mesurerons l'expression de CCR7 et CD62L pour constater si leur expression est également augmentée au niveau protéique dans la population TCL1A<sup>low</sup>. Il a été observé dans le cas de LB anergisés un processus d'exclusion des follicules primaires par une expression soutenue de CCR7 et une diminution de l'expression de CXCR5 les relocalisant à la bordure de

la zone T. Ceci est cohérent avec l'expression accrue de CCR7 des LB TCL1A<sup>low</sup> et nous mesurerons également si dans ce sens l'expression de CXCR5 est diminuée dans cette population. De façon à mesurer les capacités migratoires de la population TCL1A<sup>low</sup> nous pourrions également procéder à des tests de mobilisation des populations TCL1A<sup>low</sup> et TCL1A<sup>high</sup> triées par une méthode de Transwell avec dépôts des cellules dans les inserts déposés dans des puits contenant un cocktail de cytokines. Nous pourrions également utiliser des anticorps neutralisant de certains récepteurs chimiotactiques notamment CCR7 pour tester son rôle dans la migration des cellules (Mcheik et al., 2019).

Nous évaluerons également le caractère régulateur de la population TCL1A<sup>low</sup>. Cette population accrue chez les patients tolérants pourrait avoir des propriétés régulatrices pouvant provenir d'une capacité accrue de production de cytokine immunorégulatrice ou de propriété suppressives. Nous savons que l'expression de TCL1A pouvait être associée à l'expression d'IL-10 dans les LB (D. J. Dilillo et al., 2013; David J. Dilillo et al., 2010). Bien que la population TCL1A<sup>low</sup> montre une expression réduite de TCL1A et une signalisation altérée du BCR des études ont montrées chez les patients tolérants une expression accrue d'IL-10 dans des LB présentant un phénotype similaire (Nova-Lamperti et al., 2017). Par des tests *in vitro* d'induction de LB B10 sur 2 jours en présence de CPG ODN et de CD40L nous pourrions évaluer si la population TCL1A<sup>low</sup> possède ou non une plus grande propension à l'expression et la production d'IL-10 (Chenouard et al., 2015). Nous pouvons également envisager de tester le caractère régulateur de cette population au travers de ses capacités suppressives par une co-culture de chacune des populations de LB triées en présence de cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> et mesurer si la population TCL1A<sup>low</sup> inhibe la prolifération des LT (Mélanie Chesneau et al., 2020). Il est possible qu'un effet tolérogène soit apporté par une plus grande capacité de cette population en réponse à des signaux régulateurs tels que ceux de l'IL-10 comme le laisse suggérer nos résultats. Nous pourrions donc également mesurer par Western-Blot, avec et sans pré sensibilisation à l'IL-10, si la population TCL1A<sup>low</sup> présente une activation accrue du signalosome de l'IL-10 incluant son récepteur IL-10R et la voie de signalisation impliquant Jak1 et Tyk2 et STAT3 décrit notamment comme inhibant l'activation de la voie NF-κB (Moore et al., 2001). Nous pourrions en même temps étudier les voies de signalisations reliant TCL1A à l'expression d'IL-10 tels que GSK3 et PTPROt (Cheng et al., 2020; Wakim et al., 2017).



Pour étudier l'effet d'une expression altérée de TCL1A dans les LB tels qu'observé chez les patients tolérants, nous avons prévu de moduler artificiellement son expression dans les LB de volontaires sains. Notre objectif est d'induire l'expression de TCL1A dans des LB mémoires normalement TCL1A<sup>-</sup> et inversement inhiber l'expression de TCL1A dans les LB naïfs que nous savons TCL1A<sup>+</sup> et ainsi reproduire une population TCL1A<sup>low</sup>. Nous évaluerons ensuite l'effet de cette modulation dans ces cellules sur leur différenciation, leur caractère apoptotique et leur propriétés régulatrices. Nous avons déjà induit l'expression de TCL1A dans des LB mémoires primaires à l'aide d'un transgène codant pour la protéine TCL1A et un rapporteur GFP (*green fluorescent protein*) par une technique d'électroporation. Toutefois la mise en culture des cellules transfectées s'est soldée par un échec du fait d'une trop grande mortalité des cellules transfectées. Sur la base de travaux de la littérature montrant la faisabilité de la transfection de siRNA par électroporation à partir de LB primaires (Shih et al., 2019), nous allons entreprendre la génération d'une population TCL1A<sup>low</sup> à partir de B naïfs TCL1A<sup>+</sup> avec un siRNA ciblant l'expression de TCL1A par électroporation.

### III. Etude de la population de LB mémoires CD11c<sup>+</sup> chez les patients stables à long terme

Dans cette étude nous validons un phénotype accru de LB mémoires (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup>) chez les patients stables à long terme (LTT) (>10 ans), phénotype déjà identifié chez les patients stables à très long terme (>25 ans) (Dujardin et al., 2021). L'étude du compartiment des LB révèle également une augmentation de la fréquence de cellules B mémoires double négatives (DN) IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup> et de cellules B CD11c<sup>+</sup> évoquant un phénotype de cellules B atypiques (Karnell et al., 2017; Y. Li et al., 2021), chez les LTT par rapport aux autres groupes de patients et aux volontaires sains. De plus, nous observons que la faible proportion de LB CD11c<sup>+</sup> dans les autres groupes est largement contenue dans le compartiment de LB commutés (switch) mémoires (IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) quand ceux des LTT sont principalement contenus dans le compartiment des LB DN et secondairement dans les LB switch mémoires. Nous observons également que la population de LB CD11c<sup>+</sup> est présente une expression accrue du CD19 et réduite de CD38. Ce phénotype correspond à celui de LB DN CD19<sup>high</sup> CD21<sup>-</sup> CXCR5<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> prédominant dans le sang des patients atteints de lupus systémique (SLE) ainsi qu'aux LB DN IgD<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, CD21<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>, CD21<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup> retrouvés dans le sang des patients atteints du syndrome primaire de Sjögren (SSP) (Jenks et al., 2018; Rincon-Arevalo et al., 2021). Nous trouvons une

fréquence de LB GZMB<sup>+</sup> plus importante dans les LB CD11c<sup>+</sup> par rapport aux CD11c<sup>-</sup> chez tous les patients. Ceci est cohérent avec le fait que le GZMB et le CD11c sont exprimés par les LB différenciés (Mélania Chesneau et al., 2020; Sailliet et al., 2023). Les LB CD11c<sup>+</sup> des LTT sont plus fréquents dans les compartiments IgG<sup>+</sup> et IgA<sup>+</sup> (2/3 de LB CD11c<sup>+</sup> dans ces deux compartiments B). Pour le compartiment des LB non commutés (unswitch), les LB CD11c<sup>+</sup> semblent plus largement distribués dans les compartiments IgD<sup>low</sup> suggérant un phénotype mémoire IgM<sup>+</sup>. Les LB CD11c<sup>+</sup> augmentés chez les LTT ont donc un phénotype mémoire DN principalement switché correspondant au phénotype de LB CD11c<sup>high</sup> T-bet<sup>+</sup> retrouvé chez les patients atteints de SLE (S. Wang et al., 2018).

Nous observons également, uniquement dans le sang des LTT, que les LB CD11c<sup>+</sup> des LTT possèdent une fréquence réduite de LB CD25<sup>+</sup> (IL2RA) par rapport aux LB CD11c<sup>-</sup> et plus encore, dans les LB CD11c<sup>+</sup>, la fréquence de LB CD25<sup>+</sup> est inférieure chez les LTT par rapport aux patients stables à 1 an. Nous trouvons également dans le compartiment CD11c<sup>+</sup> une fréquence de LB PD-1<sup>+</sup> supérieure par rapport au compartiment CD11c<sup>-</sup>. Ces résultats indiquent un phénotype de LB en état d'exhaustion progressivement augmenté avec le temps post-transplantation chez les patients stables sous IS mais absent chez les patients tolérants. Ce phénotype rappelle à nouveau celui de plusieurs études où les LB CD11c<sup>+</sup> augmentés chez des patients atteints de maladie inflammatoire chronique présentent également un état d'exhaustion (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rincon-Arevalo et al., 2021). On retrouve notamment dans les LB CD11c<sup>+</sup> de patients atteints de SLE une expression réduite de l'ARNm d'*IL2RA* (CD25) et une expression accrue de PD-1 (Jenks et al., 2018; Rincon-Arevalo et al., 2021). Il a été observé que les LB CD11c<sup>+</sup> ne parvenaient pas à exprimer CD25 *in vitro* en réponse à une stimulation par le BCR et le CD40 (H. Li et al., 2016), chez des volontaires sains, des patients atteints de SLE (Jenks et al., 2018), de déficit immunitaire commun (CVID) et de polyarthrite rhumatoïde (RA) (Isnardi et al., 2010).

Il semblerait donc que les patients stables à long terme présentent une augmentation de LB atypiques CD11c<sup>+</sup> possédant des caractéristiques communes d'exhaustion avec ceux décrits dans la littérature comme augmentés dans des cas d'inflammation chronique.

En premier lieu nous devons préciser le phénotype de LB atypique chez les patients LTT. A partir de nouveaux échantillons de patients LTT, tolérants, stables à court terme et volontaires sains, nous validerons par cytométrie le phénotype de ces LB atypiques CD11c<sup>+</sup> sur leur

expression de T-Bet, FCRL4, FCRL5 et une expression réduite de CXCR5 pour constater si ils présentent un phénotype commun à celui décrit dans les cas de pathologies inflammatoires chronique (Holla et al., 2021; Jenks et al., 2018; King et al., 2021; Moir, Ho, et al., 2008; Sutton et al., 2021). De plus, associés aux marqueurs que nous avons-nous même décrits, plusieurs études ont montrées dans les LB CD11c<sup>+</sup> des patients une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs inhibiteurs de l'activation CD22, CD32, CD85, CD72, PDL1 et CD95 dont nous analyserons l'expression (Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; H. Li et al., 2016; Rincon-Arevalo et al., 2021; S. Wang et al., 2018).

En parallèle de son expression nous pourrions également mesurer l'apoptose induite par le récepteur Fas (CD95) en réponse au Fas-L pour évaluer si celle-ci est accrue dans les LB CD11c<sup>+</sup> des LTT comme cela a pu être constaté dans les LB CD11c<sup>+</sup> de patients atteint du VIH, de RA et de CVID (Austin et al., 2019; Isnardi et al., 2010).

Les études de cette population de LB CD11c<sup>+</sup> murins et humains ont montrées qu'ils répondaient peu aux stimuli classiques du BCR et de CD40, mais étaient capables de s'activer et de se différencier en réponse à d'autre stimulation notamment au TLR7 et TLR9 et était également particulièrement dépendant de la signalisation de l'IL-21R (Hao et al., 2011; Isnardi et al., 2010; Jenks et al., 2018; Rubtsov et al., 2011). Nous avons observé bien qu'en faible proportion une fréquence accrue de plasmablastes-plasmocytes dans le sang des patients LTT. Des études ont montré que les LB CD11c<sup>+</sup> de patients atteints de SLE et de pSS avaient une expression accrue de *BLIMP1* et *IRF4* impliqués dans la différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps et qu'ils étaient associés à un état actif de la pathologie ainsi que la sécrétion d'auto-anticorps (Jenks et al., 2018; Saadoun et al., 2013; S. Wang et al., 2018). A partir de LB CD11c<sup>+</sup> de patients LTT nous testerons un protocole d'activation classique utilisant une stimulation du BCR et du CD40 et une stimulation associant des stimuli innés tels que TLR7 et TLR9 afin d'analyser si les LB CD11c<sup>+</sup> réagissent préférentiellement aux deuxièmes stimuli. Une étude récente a étudié le compartiment B chez des receveurs développant un rejet humoral dans les 2 premières années de transplantation (Louis et al., 2021). Ils ont observés que les patients en rejet produisant des DSA avaient une fréquence augmentée de LB mémoires T-bet<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> activés (CD21<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) et atypiques (CD21<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) (Louis et al., 2021). Nous mesurerons la production et le type d'anticorps produits par les LB CD11c<sup>+</sup> stimulés *in vitro*. Par des méthodes de séquençage nous analysons également la clonalité de ces

populations (Jenks et al., 2018), et par des tests de type cross match nous étudierons la spécificité de ces anticorps pour déterminer notamment chez les patients ayant développés des DSA si la population de LB CD11c<sup>+</sup> sont impliqués dans la réponse allo-immune (Isnardi et al., 2010; Saadoun et al., 2013).

De plus amples études sont nécessaires pour caractériser cette population de LB CD11c<sup>+</sup> mais elle présage malheureusement d'une inflammation persistante chronique, contenue par les traitements IS chez les patients LTT. Cette hypothèse est permise par l'observation faite chez des sujets atteints de paludisme et de VIH chez qui les populations de LB CD11c<sup>+</sup> disparaissent une fois l'infection maîtrisée (Moir, Malaspina, et al., 2008; Sundling et al., 2019). En transplantation hépatique, le succès de l'arrêt des thérapies IS est corrélé au temps post greffe (Benítez et al., 2013; Feng et al., 2012). Les tentatives d'arrêt des thérapies IS en transplantation rénale montre des échecs en étant réalisées chez des patients transplantés moins de 6 ans après la greffe (Brar & Nader, 2014; Dugast et al., 2016; Ekberg et al., 2007; Masset et al., 2022). Les résultats de notre étude ne suggèrent pas de meilleures probabilités de succès d'arrêt des IS chez les receveurs transplantés à long terme. Ils confirment également les différences immunologiques entre les patients transplantés hépatiques et rénaux (Dumontet et al., 2016; Lozano et al., 2011).

## Conclusion

Dans ces deux études nous avons souligné parallèlement chez les patients transplantés rénaux stables à long terme sous IS et chez les patients tolérants que les lymphocytes B était chez ces patients différentiellement corrélés à l'homéostasie de la réponse allo-immune et la stabilité du greffon à long terme. Nous avons mis en évidence chez deux groupes de patients partageant un état durablement stable de leur greffe deux phénotypes de lymphocytes B diamétralement opposés. Un accroissement du nombre de LB totaux non différenciés chez les patients tolérants, et une diminution des LB totaux et l'acquisition d'un phénotype mémoire associé aux pathologies inflammatoires chroniques chez les patients stables à long terme sous IS.

Trouver le moyen d'induire une tolérance durable de l'hôte envers son greffon représente le graal en transplantation d'organes solides. En transplantation rénale notre étude sur les LB CD11c<sup>+</sup> rappelle l'importance des traitements IS qui à long terme permettent de contenir une

réponse allo-immune latente pouvant s'enflammer en cas de modification ou de mauvaise observance. Notre étude sur la découverte d'une population de LB naïfs  $TCL1A^{low}$  associée à l'état de tolérance apporte un nouvel argument à l'implication des LB dans le phénotype de la tolérance opérationnelle. L'émergence d'une telle population chez les patients qui développent une tolérance peut contribuer à maintenir un contrôle fin de l'homéostasie des LB, favorisant la stabilité à long terme du greffon.

Une caractérisation plus poussée de ces 2 populations de cellules B pourrait à terme être utile au suivi des patients stables à long terme et des patients tolérants dans la mesure où il s'agit de paramètres mesurables simplement dans le sang périphérique. En effet, en faisant l'hypothèse que la population de LB  $CD11c^+$  est associée à une réponse allo-immune chronique, sa mesure permettrait de stratifier les patients en fonction de leur risque de rejet chronique pour à la fois éviter une "sous-immunosuppression" chez des patients à risque de rejet et contrôler la stabilité des patients stables à long terme. A terme, l'association des cellules B  $CD11c^+$  et de critères cliniques pourrait ainsi permettre la caractérisation du phénotype des patients stables à long terme présentant un faible ou un haut risque immunologique. La caractérisation de la population  $TCL1A^{low}$  peut également dégager des perspectives intéressantes dans le champ de la tolérance en transplantation rénale. S'il s'avère que ces cellules sont actives dans le maintien de la tolérance, leur induction pourrait être envisagée dans le cadre d'une thérapie cellulaire d'induction de tolérance. La caractérisation de cette population  $TCL1A^{low}$  pourrait aussi mettre en lumière l'implication d'acteurs moléculaires spécifiques, jusqu'ici ignorés dans le processus de tolérance, pouvant devenir autant de cibles thérapeutiques dans la recherche sur l'induction de tolérance, qui reste aujourd'hui un idéal.

Andrews, S. F., Zhang, Q., Lim, S., Li, L., Lee, J. H., Zheng, N. Y., Huang, M., Taylor, W. M., Farris, A. D., Ni, D., Meng, W., Luning Prak, E. T., & Wilson, P. C. (2013). Global analysis of B-cell selection using an immunoglobulin light chain-mediated model of autoreactivity. *Journal of Experimental Medicine*, 210(1), 125–142. <https://doi.org/10.1084/jem.20120525>

Austin, J. W., Buckner, C. M., Kardava, L., Wang, W., Zhang, X., Melson, V. A., Swanson, R. G., Martins, A. J., Zhou, J. Q., Hoehn, K. B., Nicholas Fisk, J., Dimopoulos, Y., Chassiakos, A., O'Dell, S., Smelkinson, M. G., Seamon, C. A., Kwan, R. W., Sneller, M. C., Pittaluga, S., ... Moir, S. (2019). Overexpression of T-bet in HIV infection is associated with accumulation of B-cells outside germinal centers and poor affinity maturation. *Science Translational Medicine*, 11(520), 10–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax0904>

Azim, S., Zubair, H., Rousselle, T., McDaniels, J. M., Shetty, A. C., Kuscu, C., Kuscu, C., Talwar, M., Eason, J. D., Maluf, D. G., & Mas, V. R. (2023). Single-cell RNA sequencing reveals peripheral blood mononuclear immune cell landscape associated with operational tolerance in a kidney transplant recipient. *American Journal of Transplantation*, December 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.04.035>

Baron, D., Ramstein, G., Chesneau, M., Echassieriau, Y., Pallier, A., Paul, C., Degauque, N., Hernandez-Fuentes, M. P., Sanchez-Fueyo, A., Newell, K. A., Giral, M., Soullillou, J. P., Houlgatte, R., & Brouard, S. (2015). A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney International*, 87(5), 984–995. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.395>

Benítez, C., Londoño, M. C., Miquel, R., Manzia, T. M., Abrales, J. G., Lozano, J. J., Martínez-Llordella, M., López, M., Angelico, R., Bohne, F., Sese, P., Daoud, F., Larcier, P., Roelen, D. L., Claas, F., Whitehouse, G., Lerut, J., Pirenne, J., Rimola, A., ... Sánchez-Fueyo, A. (2013). Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*, 58(5), 1824–1835. <https://doi.org/10.1002/hep.26426>

Brar, J. E., & Nader, N. D. (2014). Immune minimization strategies in renal transplantation. *Immunological Investigations*, 43(8), 807–818. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.937492>

Braud, C., Baeten, D., Giral, M., Pallier, A., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Chevalier, C., Lebars, A., Léger, J., Moreau, A., Pechkova, E., Nicolini, C., Soullillou, J. P., & Brouard, S. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), 1681–1692. <https://doi.org/10.1002/jcb.21574>

Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S. C., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., Dupont, A., Pallier, A., Moreau, A., Louis, S., Ruiz, C., Salvatierra, O., Soullillou, J. P., & Sarwal, M. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15448–15453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705834104>

Calpe, E., Codony, C., Baptista, M. J., Abrisqueta, P., Carpio, C., Purroy, N., Bosch, F., & Crespo, M. (2011). ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*, 118(16), 4401–4410. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-333682>

Cheng, H., Wang, L., Yang, B., Li, D., Wang, X., Liu, X., Tian, N., Huang, Q., Feng, R., Wang, Z., Liang, R., Dai, S.-M., Lv, L., Wu, J., Zang, Y.-S., & Li, B. (2020). Cutting Edge: Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity Induces the Generation and Enhanced Suppressive Function of Human IL-10 + FOXP3 + -Induced Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 205(6), 1497–1502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000136>

- Chenouard, A., Chesneau, M., Braza, F., Dejoie, T., Cinotti, R., Roquilly, A., Brouard, S., & Asehnoune, K. (2015). Phenotype and functions of B-cells in patients with acute brain injuries. *Molecular Immunology*, 68, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.001>
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D. A., Degauque, N., Soullillou, J. P., Tarte, K., & Brouard, S. (2014). Unique B-cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 14(1), 144–155. <https://doi.org/10.1111/ajt.12508>
- Chesneau, Mélanie, Mai, H. Le, Danger, R., Le Bot, S., Nguyen, T.-V.-H., Bernard, J., Poullaouec, C., Guerrif, P., Conchon, S., Giral, M., Charreau, B., Degauque, N., & Brouard, S. (2020). Efficient Expansion of Human Granzyme B–Expressing B-cells with Potent Regulatory Properties. *The Journal of Immunology*, 205(9), 2391–2401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000335>
- Christakoudi, S., Runglall, M., Mobillo, P., Rebollo-Mesa, I., Tsui, T. L., Nova-Lamperti, E., Taube, C., Norris, S., Kamra, Y., Hilton, R., Augustine, T., Bhandari, S., Baker, R., Berglund, D., Carr, S., Game, D., Griffin, S., Kalra, P. A., Lewis, R., ... Hernandez-Fuentes, M. P. (2020). Development and validation of the first consensus gene-expression signature of operational tolerance in kidney transplantation, incorporating adjustment for immunosuppressive drug therapy. *EBioMedicine*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102899>
- Danger, R., Chesneau, M., Paul, C., Guérif, P., Durand, M., Newell, K. A., Kanaparthi, S., Turka, L. A., Soullillou, J. P., Houlgatte, R., Giral, M., Ramstein, G., & Brouard, S. (2017). A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney International*, 91(6), 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.020>
- Dilillo, D. J., Weinberg, J. B., Yoshizaki, A., Horikawa, M., Bryant, J. M., Iwata, Y., Matsushita, T., Matta, K. M., Chen, Y., Venturi, G. M., Russo, G., Gockerman, J. P., Moore, J. O., Diehl, L. F., Volkheimer, A. D., Friedman, D. R., Lanasa, M. C., Hall, R. P., & Tedder, T. F. (2013). Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B-cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*, 27(1), 170–182. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.165>
- Dilillo, David J., Matsushita, T., & Tedder, T. F. (2010). B10 cells and regulatory B-cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183(Table 1), 38–57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05137.x>
- Dugast, E., Soullillou, J. P., Foucher, Y., Papuchon, E., Guerif, P., Paul, C., Riochet, D., Chesneau, M., Cesbron, A., Renaudin, K., Dantal, J., Giral, M., & Brouard, S. (2016). Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 16(11), 3255–3261. <https://doi.org/10.1111/ajt.13946>
- Dujardin, A., Chesneau, M., Dubois, F., Danger, R., Bui, L., Kerleau, C., Guérif, P., Brouard, S., & Dantal, J. (2021). Clinical and immunological follow-up of very long-term kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors indicates dual phenotypes. *Kidney International*, 99(6), 1418–1429. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.09.036>
- Dumontet, E., Danger, R., Vagefi, P. A., Londoño, M. C., Pallier, A., Lozano, J. J., Giral, M., Degauque, N., Soullillou, J. P., Martínez-Llordella, M., Lee, H., Latournerie, M., Boudjema, K., Dulong, J., Tarte, K., Sanchez-Fueyo, A., Feng, S., Brouard, S., & Conchon, S. (2016). Peripheral phenotype and gene expression profiles of combined liver-kidney transplant patients. *Liver International*, 36(3), 401–409. <https://doi.org/10.1111/liv.12917>

Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, Š., Nashan, B., Gürkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyó, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloz, P., & Halloran, P. F. (2007). Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2562–2575. <https://doi.org/10.1056/nejmoa067411>

Feng, S., Ekong, U. D., Lobritto, S. J., Demetris, A. J., Roberts, J. P., Rosenthal, P., Alonso, E. M., Philogene, M. C., Ikle, D., Poole, K. M., Bridges, N. D., Turka, L. A., & Tchao, N. K. (2012). Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA*, 307(3), 283–293. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.2014>

Fulcher, D. A., & Basten, A. (1994). Reduced life span of anergic self-reactive B-cells in a double-transgenic model. *Journal of Experimental Medicine*, 179(1), 125–134. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.125>

Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., Trent, R. J., & Basten, A. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184), 676–682. <https://doi.org/10.1038/334676a0>

Hao, Y., O'Neill, P., Naradikian, M. S., Scholz, J. L., & Cancro, M. P. (2011). A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood*, 118(5), 1294–1304. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330530>

Holla, P., Dizon, B., Ambegaonkar, A. A., Rogel, N., Goldschmidt, E., Boddapati, A. K., Sohn, H., Sturdevant, D., Austin, J. W., Kardava, L., Yuesheng, L., Liu, P., Moir, S., Pierce, S. K., & Madi, A. (2021). Shared transcriptional profiles of atypical B-cells suggest common drivers of expansion and function in malaria, HIV, and autoimmunity. *Science Advances*, 7(22). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg8384>

Isnardi, I., Ng, Y. S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J. H., Cunningham-Rundles, C., & Meffre, E. (2010). Complement receptor 2/CD21- human naive B-cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood*, 115(24), 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243071>

Jenks, S. A., Cashman, K. S., Zumaquero, E., Marigorta, U. M., Patel, A. V., Wang, X., Tomar, D., Woodruff, M. C., Simon, Z., Bugrovsky, R., Blalock, E. L., Scharer, C. D., Tipton, C. M., Wei, C., Lim, S. S., Petri, M., Niewold, T. B., Anolik, J. H., Gibson, G., ... Sanz, I. (2018). Distinct Effector B-cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 49(4), 725-739.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>

Karnell, J. L., Kumar, V., Wang, J., Wang, S., Voynova, E., & Ettinger, R. (2017). Role of CD11c+ T-bet+ B-cells in human health and disease. *Cellular Immunology*, 321(May), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.008>

Kaser, A., Dunzendorfer, S., Offner, F. A., Ludwiczek, O., Enrich, B., Koch, R. O., Cruikshank, W. W., Wiedermann, C. J., & Tilg, H. (2000). B Lymphocyte-Derived IL-16 Attracts Dendritic Cells and Th Cells. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2474–2480. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2474>

King, H. W., Orban, N., Riches, J. C., Clear, A. J., Warnes, G., Teichmann, S. A., & James, L. K. (2021). Single-cell analysis of human B-cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Science Immunology*, 6(56). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe6291>

Kriss, C. L., Pinilla-Ibarz, J. A., Mailloux, A. W., Powers, J. J., Tang, C. H. A., Kang, C. W., Zanesi, N., Epling-Burnette, P. K., Sotomayor, E. M., Croce, C. M., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. A. (2012). Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, 120(5), 1027–1038. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394346>



Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G. P., Sheng, C., Phillips, T. M., Lipsky, P. E., & Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B-cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B-cell Collaboration. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5886–5896. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5886>

Le Berre, L., Chesneau, M., Danger, R., Dubois, F., Chaussabel, D., Garand, M., & Brouard, S. (2021). Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B-cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 5–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589786>

Le Gallou, S., Caron, G., Delalay, C., Rossille, D., Tarte, K., & Fest, T. (2012). IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK–ERK Signaling. *The Journal of Immunology*, 189(1), 161–173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200301>

Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S. L., Hess, D. M., Schwab, S. R., Shu, H. B., & Cyster, J. G. (2004). Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B-cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*, 20(4), 441–453. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00079-2)

Li, H., Borrego, F., Nagata, S., & Tolnay, M. (2016). Fc Receptor–like 5 Expression Distinguishes Two Distinct Subsets of Human Circulating Tissue–like Memory B-cells. *The Journal of Immunology*, 196(10), 4064–4074. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501027>

Li, Y., Li, Z., & Hu, F. (2021). Double-negative (DN) B-cells: an under-recognized effector memory B-cell subset in autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 205(2), 119–127. <https://doi.org/10.1111/cei.13615>

Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., & Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature*, 517(7533), 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature13803>

Louis, K., Bailly, E., Macedo, C., Lau, L., Ramaswami, B., Chang, A., Chandran, U., Landsittel, D., Gu, X., Chalasani, G., Zeevi, A., Randhawa, P., Singh, H., Lefaucheur, C., & Metes, D. (2021). T-bet+CD27+CD21- B-cells poised for plasma cell differentiation during antibody-mediated rejection of kidney transplants. *JCI Insight*, 6(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148881>

Lozano, J. J., Pallier, A., Martinez-Llordella, M., Danger, R., López, M., Giral, M., Londoño, M. C., Rimola, A., Souillou, J. P., Brouard, S., & Sánchez-Fueyo, A. (2011). Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *American Journal of Transplantation*, 11(9), 1916–1926. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x>

Masset, C., Dantal, J., Souillou, J. P., Walencik, A., Delbos, F., Brouard, S., & Giral, M. (2022). Case Report: Long-term observations from the tacrolimus weaning randomized clinical trial depicts the challenging aspects for determination of low-immunological risk patients. *Frontiers in Immunology*, 13(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021481>

Mcheik, S., Van Eeckhout, N., De Poorter, C., Galés, C., Parmentier, M., & Springael, J. Y. (2019). Coexpression of CCR7 and CXCR4 During B-cell Development Controls CXCR4 Responsiveness and Bone Marrow Homing. *Frontiers in Immunology*, 10(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02970>

Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A. C., O’Shea, M. A., Roby, G., Kottlil, S., Arthos, J., Proschan, M. A., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2008). Evidence for HIV-associated B-cell exhaustion in a dysfunctional memory B-cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1797–1805. <https://doi.org/10.1084/jem.20072683>

- Moir, S., Malaspina, A., Ho, J., Wang, W., DiPoto, A. C., O'Shea, M. A., Roby, G., Mican, J. A. M., Kottlilil, S., Chun, T. W., Proschan, M. A., & Fauci, A. S. (2008). Normalization of B-cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *Journal of Infectious Diseases*, 197(4), 572–579. <https://doi.org/10.1086/526789>
- Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L., & Garra, A. O. (2001). INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. *Molecular and Cellular Biology*, 1(1), 683–765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>
- Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., Hernandez-Fuentes, M. P., Turka, L. A., & Seyfert-Margolis, V. L. (2010). Identification of a B-cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1836–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI39933>
- Nova-Lamperti, E., Chana, P., Mobillo, P., Runglall, M., Kamra, Y., McGregor, R., Lord, G. M., Lechler, R. I., Lombardi, G., & Hernandez-Fuentes, M. P. (2017). Increased CD40 ligation and reduced bcr signalling leads to higher il-10 production in B-cells from tolerant kidney transplant patients. *Transplantation*, 101(3), 541–547. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001341>
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J. J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B-cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 78(5), 503–513. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.162>
- Pillai, S., & Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 767–777. <https://doi.org/10.1038/nri2656>
- Rincon-Arevalo, H., Wiedemann, A., Stefanski, A. L., Lettau, M., Szelinski, F., Fuchs, S., Frei, A. P., Steinberg, M., Kam-Thong, T., Hatje, K., Keller, B., Warnatz, K., Radbruch, A., Lino, A. C., Schrezenmeier, E., & Dörner, T. (2021). Deep Phenotyping of CD11c+ B-cells in Systemic Autoimmunity and Controls. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635615>
- Rubtsov, A. V., Rubtsova, K., Fischer, A., Meehan, R. T., Gillis, J. Z., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2011). Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood*, 118(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331462>
- Saadoun, D., Terrier, B., Bannock, J., Vazquez, T., Massad, C., Kang, I., Joly, F., Rosenzweig, M., Sene, D., Benech, P., Musset, L., Klatzmann, D., Meffre, E., & Cacoub, P. (2013). Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B-cells in sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis and Rheumatism*, 65(4), 1085–1096. <https://doi.org/10.1002/ART.37828>
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., Rovis, F., Jimenez, E., Ballow, A., Giral, M., Rebollo-Mesa, I., Le Moine, A., Braudeau, C., Hilton, R., Gerstmayr, B., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–1861. <https://doi.org/10.1172/JCI39922>
- Sailliet, N., Mai, H. Le, Dupuy, A., Tilly, G., Fourgeux, C., Braud, M., Giral, M., Robert, J. M., Degauque, N., Danger, R., Poschmann, J., & Brouard, S. (2023). Human granzyme B regulatory B-cells prevent effector CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism dependent from lymphotoxin alpha. *Frontiers in Immunology*, 14(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1183714>

- Shih, T., De, S., & Barnes, B. J. (2019). RNAi Transfection Optimized in Primary Naïve B-cells for the Targeted Analysis of Human Plasma Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 10(July), 1652. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01652>
- Silva, H. M., Takenaka, M. C. S., Moraes-Vieira, P. M. M., Monteiro, S. M., Hernandez, M. O., Chaara, W., Six, A., Avena, F., Sesterheim, P., Barbé-Tuana, F. M., Saitovitch, D., Lemos, F., Kalil, J., & Coelho, V. (2012). Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Molecular Medicine*, 18(5), 733–743. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00281>
- Sundling, C., Rönnerberg, C., Yman, V., Asghar, M., Jahnmatz, P., Lakshmikanth, T., Chen, Y., Mikes, J., Forsell, M. N., Sondén, K., Achour, A., Brodin, P., Persson, K. E. M., & Färnert, A. (2019). B-cell profiling in malaria reveals expansion and remodeling of CD11c+ B-cell subsets. *JCI Insight*, 4(9). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126492>
- Sutton, H. J., Aye, R., Idris, A. H., Vistein, R., Nduati, E., Kai, O., Mwacharo, J., Li, X., Gao, X., Andrews, T. D., Koutsakos, M., Nguyen, T. H. O., Nekrasov, M., Milburn, P., Eltahl, A., Berry, A. A., KC, N., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., ... Cockburn, I. A. (2021). Atypical B-cells are part of an alternative lineage of B-cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. *Cell Reports*, 34(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108684>
- Tabrizi, S. J., Niuro, H., Masui, M., Yoshimoto, G., Iino, T., Kikushige, Y., Wakasaki, T., Baba, E., Shimoda, S., Miyamoto, T., Hara, T., & Akashi, K. (2009). T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM + Memory B-cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1490–1499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1490>
- Thibault-Espitia, A., Foucher, Y., Danger, R., Migone, T., Pallier, A., Castagnet, S., G.-Gueguen, C., Devys, A., C.-Gautier, A., Giral, M., Soullillou, J. P., & Brouard, S. (2012). BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *American Journal of Transplantation*, 12(10), 2754–2762. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04194.x>
- Wakim, J., Arman, E., Becker-Herman, S., Kramer, M. P., Bakos, E., Shachar, I., & Elson, A. (2017). The PTPROt tyrosine phosphatase functions as an obligate haploinsufficient tumor suppressor in vivo in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 36(26), 3686–3694. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.523>
- Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J. J.-Y., & Yang-Yen, H.-F. (1999). The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6195–6206. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.6195>
- Wang, S., Wang, J., Kumar, V., Karnell, J. L., Naiman, B., Gross, P. S., Rahman, S., Zerrouki, K., Hanna, R., Morehouse, C., Holoweckj, N., Liu, H., Casey, K., Smith, M., Parker, M., White, N., Riggs, J., Ward, B., Bhat, G., ... Ettinger, R. (2018). IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c<sup>hi</sup>T-bet<sup>+</sup> B-cells in SLE. *Nature Communications*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>
- Wöhner, M., Tagoh, H., Bilic, I., Jaritz, M., Poliakova, D. K., Fischer, M., & Busslinger, M. (2016). Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B-cell and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine*, 213(7), 1201–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20152002>

# Annexe : Revue TCL1A, B cell regulation and tolerance in renal transplantation



Review

## TCL1A, B Cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation

François Brinas <sup>1,2</sup>, Richard Danger <sup>1,2,\*</sup> and Sophie Brouard <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France; Francois.Brinas@etu.univ-nantes.fr

<sup>2</sup> Labex IGO, F-44000 Nantes, France

<sup>3</sup> Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie, Centre de Ressources Biologiques (CRB), Labex IGO, F-44000 Nantes, France

\* Correspondence: Richard.Danger@univ-nantes.fr (R.D.); sophie.brouard@univ-nantes.fr (S.B.);  
Tel: +33-2-40-08-74-10 (R.D. & S.B.)

**Abstract:** Despite much progress in the management of kidney transplantation, the need for life-long immunosuppressive therapies remains a major issue representing many risks for patients. Operational tolerance, defined as allograft acceptance without immunosuppression, has logically been subject to many investigations with the aim of a better understanding of post-transplantation mechanisms and potentially how it would be induced in patients. Among proposed biomarkers, *T-cell Leukemia/Lymphoma protein 1A (TCL1A)* has been observed as overexpressed in the peripheral blood of operational tolerant patients in several studies. TCL1A expression is restricted to early B cells, also increased in the blood of tolerant patients, and showing regulatory properties, notably through IL-10 secretion for some subsets. TCL1A has first been identified as an oncogene, overexpression of which is associated to the development of T and B cell cancer. TCL1A acts as a coactivator of the serine threonine kinase Akt and through other interactions favoring cell survival, growth, and proliferation. It has also been identified as interacting with others major actors involved in B cells differentiation and regulation, including IL-10 production. Herein, we reviewed known interactions and functions of TCL1A in B cells which could involve its potential role in the set up and maintenance of renal allograft tolerance.

**Keywords:** TCL1A; kidney transplantation; tolerance; Breg; Akt; IL-10



Citation: Brinas, F.; Danger, R.; Brouard, S. TCL1A, B Cell Regulation and Tolerance in Renal Transplantation. *Cells* 2021, 10, 1367. <https://doi.org/10.3390/cells10061367>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 6 May 2021  
Accepted: 29 May 2021  
Published: 1 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Recently, transplantation has become the best treatment for end-stage renal disease. Continuous improvement in transplantation outcomes is due in part to better clinical management in the instauration of life-long immunosuppressive (IS) therapy, which is required to control recipients' alloimmune response and prevent graft rejection [1]. In addition, many attempts have been made to minimize IS treatments [2], which are still sources of important side effects, including infection, cancer, nephrotoxicity and metabolic complications [3–6] with insufficient benefits for long-term graft survival [7]. In this context, tolerance defined as allograft acceptance in the absence of immunosuppression represents the ultimate goal in solid organ transplantation, as it avoids IS treatment side effects and thereby improves the recipient's quality of life. Many attempts have been made in the field of tolerance induction since the first report of Billingham et al. [8–14]. In addition, the literature has also described patients who have shown graft stability even after a prolonged period without any IS or protocol for tolerance induction, although their proportion among transplantation patients is small [15–18]. These patients are considered as "operationally tolerant", a state defined on the basis of the clinical criterion of stable graft function in the absence of any immunosuppressive treatment for more than 1 year [17,18]. Immunosuppression withdrawal can result from spontaneous interruption in treatment, such as that caused by noncompliance of patients or medical decisions, especially in the case of lymphoproliferative posttransplantation disorders [17]. In kidney transplantation,

no clinical parameter has been found as associated with this state, but operationally tolerant patients remain immunocompetent and do not show greater susceptibility to opportunistic infections than healthy volunteers [17,19]. Few cases have been reported in kidney transplantation with an incidence that has been estimated inferior to 5% [16,17,20]. On the other hand, in liver transplantation, an operationally tolerant state is more likely, as shown by immunosuppression-weaning protocols' success rates of more than 40% with selected patients [21,22].

Hence, operationally tolerant patients have been subject to many investigations in recent decades with the aim of better understanding tolerance mechanisms and/or predicting when these mechanisms can be triggered. In the absence of graft biopsy in these operationally tolerant patients (TOL), investigations have focused on transcriptional and phenotypic analyses in peripheral blood. One objective is to design a tolerance-specific signature suitable for identifying patients likely to benefit from safe immunosuppression minimization or for identifying potent pharmacological targets for tolerance induction therapies [23–33].

## 2. *TCL1A*, a B Cell Biomarker of Tolerance Process

Even though little overlap of biomarkers has been found between all these studies, as illustrated by the meta-analysis of Baron et al. [31], some recurrent transcripts have been identified as tolerance markers, including *TCL1A*. The *TCL1A* gene was first identified as a potential biomarker of tolerance in kidney transplantation, being overexpressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of TOL compared to healthy volunteers (HVs), by 1.80 fold [23]. In 2010, Newell et al. reported that *TCL1A* was overexpressed with a mean change greater than 2-fold between TOL and stable patients with immunosuppression (STA) [25], and Sagoo et al. also found that two different probes targeting *TCL1A* were significantly overexpressed in TOL patients compared to STA and patients under chronic rejection (CR) (median log-fold change relative to the median of all samples with probe 1: TOL = 1.062, STA = -0.41, CR = 0.0965 and with probe 2: TOL = 0.994, STA = -0.38, CR = 0.121). This group also reported that both probes targeting *TCL1A* were part of the top 5 significant among 170 differentially expressed genes in two independent cohort of patients. These results were confirmed by qRT-PCR [27]. *MS4A1* gene coding for CD20 was also found as differentially over-expressed in these TOL, evidencing a B cell-related signature including *TCL1A* (23–25, 27). To find a common signature in TOL from these studies with a relatively low number of samples, Baron et al. performed a meta-analysis of previous studies by normalizing and merging their transcriptome data. Logically, *TCL1A* was found in the top 20 gene signatures that may discriminate TOL from STA patients with 91.7% accuracy, along with some B-cell related genes such as *MS4A1*, *CD40* and *C79B* [31]. Finally, this signature was refined in a composite signature of six genes, including *TCL1A* (plus *AKR1C3*, *CD40*, *CTLA4*, *ID3* and *MZB1*) and two clinical parameters that enabled the discrimination of TOL (42 TOL; 189 STA) with an area under the curve (AUC) of 0.973 and with negative and positive predictive values of 0.989 and 0.800, respectively [33].

These studies highlight the fact that *TCL1A* is a potent marker of tolerance in kidney transplantation but do not postulate on its potential role. As we shown later in the paper, *TCL1A* expression is closely related to B cells, specifically to early B cells before they move through germinal centers (GCs) [34,35]. Common augmentation patterns of total B cells and their proportion have been found in the peripheral blood of tolerant patients [25–27,36] in parallel with a transcriptional signature of tolerance that comprises B cell-related markers [23–25,33]. Studies reported phenotypes of early B cell populations and increased levels of naïve B cells (CD19<sup>+</sup>; CD20<sup>+</sup>; CD27<sup>-</sup>; IgM<sup>+</sup>; IgD<sup>+</sup>; CD24<sup>low</sup>; CD38<sup>low</sup>) and transitional B cells (CD19<sup>+</sup>; CD20<sup>+</sup>; CD27<sup>-</sup>; IgM<sup>+</sup>; IgD<sup>+</sup>; CD24<sup>high</sup>; CD38<sup>high</sup>) [25,26,30,36,37] associated with a decrease in plasma cells (CD19<sup>+</sup>; CD38<sup>+</sup>; CD138<sup>+</sup>) in the peripheral blood of TOL patients [30]. These studies indicate a higher proportion of immature than differentiated and activated B cells in the blood of TOL patients, which is consistent with the selective expression of *TCL1A*.



While B cells were initially considered in the context of renal transplantation as antibody-secreting cells, it has also been established that they have effects as antigen-presenting cells and cytokine producers [38,39]. Some B cell subsets with phenotypic diversity resulting from multiple stimuli (TLR [Toll-like receptor]; CD40; B-cell receptor [BCR]) have been identified [40,41], implying downregulation of the effector immune response in different contexts and through several mechanisms, including anti-inflammatory cytokine production, such as interleukine-10 (IL-10) [40,42] and transcriptional growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [41,43]. When studying the B cell phenotype of kidney transplant patients, Pallier et al. found that TOL patients presented an increased frequency and absolute value of B cells expressing CD1d<sup>+</sup> and CD5<sup>+</sup> compared to STA and CR patients [26]. Bhan and collaborators were the first to report the involvement of a B cell subset expressing high levels of CD1d and able to regulate Th2-mediated inflammation in a colitis mouse model through IL-10 production [44]. Another study highlighted the ability of a mouse model with a small spleen population of CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup> B cells to reduce the contact hypersensitivity response through IL-10 production. These splenic IL-10-producing CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup> regulatory B cells (Breg) cells were described as murine “B10 cells” [45]. The CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B cells found by Pallier et al. in blood from TOL patients exhibited a phenotype similar to that of the mouse B10 cells. However, the IL-10 expression level in these human B cells was not different between different groups of patients after stimulation [26]. Blair et al. characterized additional human Breg subsets. They found that immature CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> transitional B cells in the peripheral blood of HVs showed the greatest ability to produce IL-10 following stimulation and were able to suppress T cell proliferation in coculture assays in an IL-10 level-dependent manner [42], which was confirmed in further studies [46,47]. This immature population corresponded to populations described in several studies as increased in blood obtained from kidney transplanted TOL patients [25,30,36,37]. Additionally, Blair et al. found that a large proportion (71%) of the CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup> B cell subset identified by Pallier et al. was also evident in the CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cell population, indicating that it would correspond to a same Breg subset [26,42]. To more deeply characterize the function of these B cells, Newell et al. measured IL-10 expression in B cells following stimulation and found a significant, although low, increase in IL-10 expression in T1 and T2 transitional B cells (CD38<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) in TOL samples compared to its expression in HVs and STA kidney transplanted patients [25]. Similarly, Chesneau et al. found a significant increase in IL-10 production after a 4-day culture of B cells from TOL patients, compared to those from HVs and STA kidney transplanted patients, which was confirmed by intracellular staining [30]. These results matched Blair et al.’s observations [42] and were further confirmed by Cherukuri et al., who found that transitional CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells were the most IL-10 competent B cell subset and that these cells showed a decreased IL-10/TNF $\alpha$  ratio in patients with kidney graft dysfunction [48,49]. Nova-Lamperti et al. also recently showed that in kidney transplant patients, BCR signaling was reduced in TOL patients, compared to HVs, with a reduction in ERK phosphorylation, a downstream effector of mitogen-activated kinase (MAPK) that participates in the reduction of IgG1 levels in TOL patient serum, indicating a lack of B cell differentiation [30,50]. The same authors also pointed out that CD40 stimulation induced IL-10 production in transitional B cells in HVs and TOL patients, whereas dual stimulation of BCR+CD40 cells led to downregulated IL-10 production in HVs but not in TOL patients, indicating that reduced BCR signaling leads to IL-10 production by transitional B cells preferentially in TOL patients [50]. Taken together, these studies show that TOL have more peripheral B cells, specifically, more immature B cells, whose phenotype has been characterized as immunoregulatory, with a concordant transcriptional signature composed of several B cell-related genes, including *TCL1A*.

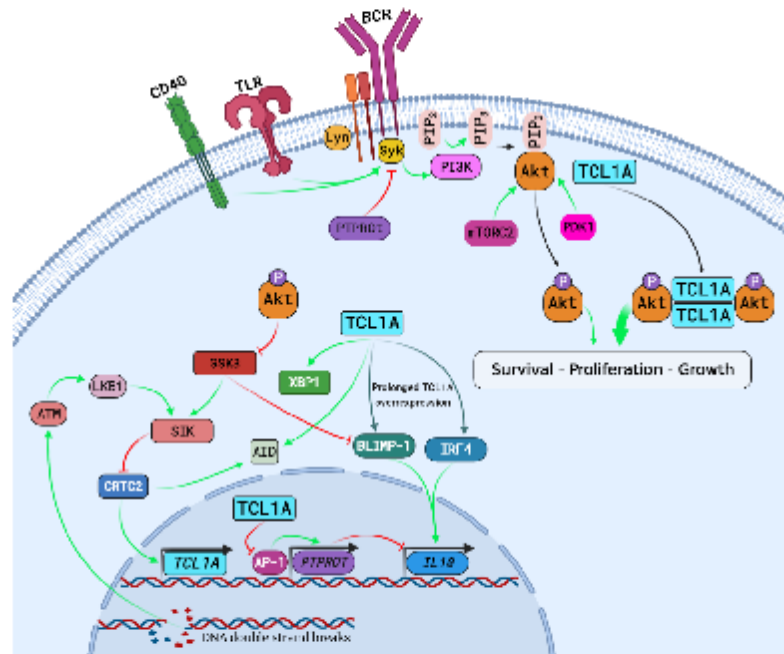
As indicated by Rebollo-Mesa et al., immunosuppressive therapies (especially prednisone and azathioprine) strongly impact the expression in kidney transplant patients of B cell-related genes and B cell subpopulations, particularly transitional CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells [51]. The increase in transitional B cells in TOL patients may be the result of immunosuppression waning, although it does not necessary preclude a role for this B cell

subpopulation in this process [51]. Christakoudi et al. recently attempted to identify a tolerance signature by taking into account the impact of immunosuppression using statistical adjustments [52]. They report that, even after statistical adjustments considering IS treatments, the expression level of *TCLIA* can be used to discriminate TOL from non-TOL patients [52]. Granata et al. also reported a decrease expression of *TCLIA* in total PBMC, isolated T cells and monocytes after 6 h in vitro incubation with everolimus, while it was overexpressed in B and T cells with high dose of tacrolimus, compared to cells from healthy individuals [53]. Finally, *TCLIA* is not merely a marker of renal transplantation tolerance. Viklicky et al. reported that *TCLIA*, *MS4A1* and *CD79B* were overexpressed in the blood of STAs kidney recipients during the first 6-month follow-up period compared to patients with a rejection episode [29]. Similarly, Heidt et al. reported increased *TCLIA* gene expression in blood and isolated B cells during the post-transplantation period in STA kidney transplant patients, but that it was profoundly decreased in patients with acute rejection. A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed a high discriminative capacity for predicting acute rejection by *TCLIA* (AUC = 0.86,  $p < 0.001$ ), and higher than for *CD79B* (AUC = 0.76,  $p = 0.01$ ) [32]. In lung transplantation, Danger et al. also described that the decrease of *TCLIA* blood expression predicts the chronic lung allograft dysfunction, the main cause of lung allograft loss [54]. *TCLIA* was, again, clustered with B cell-related genes such as *CD19*, *MS4A1*, *BANK1* and *CD40*.

*TCLIA* thus appears to be a strong marker for both immune system quiescence and rejection episodes after allograft transplantation. These studies evidenced *TCLIA* within B cell-related signatures, in addition to genes such as *MS4A1*, *CD40* and *CD79B*. However, how *TCLIA* is involved in B cell regulation and tolerance maintenance remain to be deciphered.

### 3. *TCLIA* and B Cell Biology

Human *TCLIA* is a 14 kDa protein containing 114 amino acids and shares 50% identity with murine *TCLIA* [55–57]. *TCLIA* encodes a small intracellular, nonenzymatic protein that acts as a coactivator of protein kinase B/Akt, a serine-threonine kinase central to many signaling pathways, with multiple effects, including cellular proliferation, growth and survival [58,59]. *TCLIA* structure is composed of a hydrophobic core surrounded by two 4-stranded  $\beta$ -sheets. One sheet is composed of shorter strands ( $\beta$ A- $\beta$ B and  $\beta$ E- $\beta$ F) and the other of longer strands ( $\beta$ C- $\beta$ D and  $\beta$ G- $\beta$ H). The two sheets are linked by a long and flexible loop between strands  $\beta$ D and  $\beta$ E, with an overall organization of a  $\beta$ -barrel [56]. *TCLIA* contains a homodimerization domain in the  $\beta$ c strands, which is required for effective Akt coactivation. Once dimerized, *TCLIA* can bind the three Akt isoforms through an interaction between the  $\beta$ a,  $\beta$ b,  $\beta$ e and  $\beta$ f strands with two Akt PH domains [56,60,61]. In B cells, the Akt signaling pathway is triggered by the activation of tyrosine kinase receptors, in particular BCR, inducing a phosphorylation cascade involving multiple agents and allowing Akt recruitment to the plasma membrane as mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and full activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), rapamycin-insensitive mTOR complex 2 (mTORC2) and other kinases [62–64]. Once activated, Akt detaches from the membrane and activates downstream pathways. In the *TCLIA*-Akt dimer configuration, *TCLIA* does not directly phosphorylate Akt but facilitates Akt interactions and phosphorylation at the membrane, blocking its inactivation and augmenting Akt activation, and promoting its translocation to the nucleus (cf. Figure 1) [58,60,61,63].



**Figure 1.** Schematic representation of TCL1A interactions in B cells. Stimulation of surface B cells' receptors (CD40, TLR, BCR) induces a phosphorylation cascade implying, notably, Lyn and Syk enzymes leading to PI3K activation. PI3K converts PIP<sub>2</sub> into PIP<sub>3</sub>, allowing Akt recruitment to the membrane and its full activation by mTORC2 and PDK1. Once phosphorylated, Akt activates downstream targets leading to B cell survival, growth, and proliferation. TCL1A homodimers complex with Akt allowing to increase its effects by favoring its phosphorylated state and its translocation to the nucleus. During GC transformations, AID generates DNA double strand breaks inducing CRTC2 inactivation by SIK through ATM and LKB1 leading to AID and TCL1A downregulation. TCL1A overexpression could lead to XBP1 and AID upregulation and in the long term of BLIMP-1 and IRF4, both transcription factors involved in B cell differentiation and IL-10 expression. TCL1A also impairs PTPROt expression through AP-1 inhibition while PTPROt downregulation increase IL-10 expression. Phosphorylated Akt also inactivate GSK3 which favors IL-10 expression through BLIMP-1. Created with BioRender.com (accessed on 20 May 2021).

As reviewed recently by Paduano et al., TCL1A has been found to interact and regulate many pathways independent of its interaction with Akt [65]. Notable interaction partners include DNA methyltransferase A (DNMT3A) and B [66], receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) [67], and heat shock protein 70 (Hsp70) [68]. These Akt-independent interactions have been characterized as impacting TCL1A-induced oncogenesis but may also be involved in other processes.

TCL1A was first identified as an oncogene involved in the development of T-cell leukemia [35,69,70]. In humans, TCL1A is located on chromosome 14q32.1 and belongs to a family consisting of five genes, *TCL1A*, *TCL1B*, *TNG1*, *TNG2* and *MTCP1* [71–73]. TCL1A is expressed in the fetal liver, fetal spleen, fetal kidney, tonsils, testis and peripheral blood lymphocytes [72–74]. Its expression has also been detected in plasmacytoid dendritic cells [75]. Under physiological conditions, TCL1A is implicated in embryogenesis and lymphopoiesis [74]. Only immature CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells express TCL1A, which is silenced in mature T cells [35]. In B cells, TCL1A expression is primed in pro-B cells with a peak intensity in pre-B cells and persists in IgM<sup>+</sup> naïve B cells. It is also expressed in mantle



zone B cells but strongly repressed in marginal zone and germinal center (GC) B cells and completely silenced in post-GC memory and plasma cells [34,35,76]. Low expression levels have been detected in differentiated plasmacytoid cells in vitro [34]. Dysregulated *TCL1A* expression in animal models impairs the ability of an embryo to develop toward the morula stage [74]. It also leads to impaired lymphopoiesis and increased sensitivity to receptor-mediated apoptosis in immature cells undergoing positive and negative clonal selection, underlying the major role of *TCL1A* in lymphocyte development [76]. In contrast, *TCL1A* overexpression is identified as a cause of T and B lymphocyte malignancies in humans. The *TCL1A* gene has been discovered in thymocytes in abnormal chromosomal rearrangements with inversion or translocation of *TCL1A* with either the  $\alpha/\delta$  or  $\beta$ -chain locus of the T cell receptor (TCR). This leads to its overexpression through TCR enhancers and the development of T cell leukemias [70,77]. *TCL1A* overexpression also occurs in B lineage cells and can lead to multiple types of lymphoma arising from pre-GC differentiation stages [78,79].

The mechanisms of *TCL1A*-mediated lymphomagenesis and its post-GC repression are not yet fully understood. The smallness of the group of cells expressing *TCL1A* seems to indicate that physiological regulation and pathological overexpression in B cells may occur at the transcriptional level [35,76]. Several cis-regulatory elements have been identified in the *TCL1A* promoter. The transcription factor Nur77 may regulate *TCL1A* expression through the nerve growth factor-responsive element in a negative retroactive loop that is dependent on Nur77 phosphorylation by Akt [80]. Researchers have identified Sp1-binding sites in the *TCL1A* core promoter region and demonstrated its implication in *TCL1A* transactivity in vivo [81]. Other mechanisms for *TCL1A* regulation have been proposed, such as regulation by microRNAs miR-29 and miR-181 [82,83] or epigenetic modification [84,85], but even taken together, these proposed mechanisms cannot fully explain physiological *TCL1A* repression or pathological overexpression.

Kuraishy et al. identified a CREB responsive element (CRE)-like half site within the *TCL1A* promoter region activated by phosphorylation of its Ser-133 (pCREB-133). CREB activation is mediated by cAMP and PKA activation [86]. In HEK293 cells, *TCL1A* expression is cAMP-dependent. Inducing CREB overexpression with a transgene induced a 3-fold increase in *TCL1A* expression, which was not observed in cells with a CRE half-site mutation [85]. *TCL1A* expression was not dependent on pCREB-133 but was dependent on cooperation between CREB and transducer of regulated CREB protein 2 (TORC2) or CRTC2 [87]. AICAR (an AMP analog) induced CRTC2 phosphorylation and inactivation, leading to dose-dependent repression of *TCL1A*, indicating collaboration between CREB and CRTC2 to induce *TCL1A* expression. Moreover, CRTC2 siRNA induced 40% *TCL1A* repression in Nalm6 cells. These results show that CRTC2 could be involved in the physiological and pathological regulation of *TCL1A* in B cells [85].

Interestingly, both BCR and CD40 stimulation induces CRTC2 cytoplasmic retention and *TCL1A* repression and increases cell apoptosis, whereas cAMP allowed translocation of CRTC2 to the nucleus, restored *TCL1A* expression and prevented the apoptosis of Ramos cells [85]. These results suggest that *TCL1A* expression relies heavily on BCR and CD40 stimulation, with its repression beginning in GC and relying to a certain extent on CRTC2 phosphorylation, with a signaling hierarchy that notably implicates cAMP.

#### 4. *TCL1A* and B Cell Survival

The PI3K-Akt signaling pathway axis exhibits many functions in B cells, notably promoting survival through several target and transcription factors [88–94]. Multiple pro-survival signaling pathways and *TCL1A*-Akt coactivation may partially explain the impact of B cell overexpression of *TCL1A* on their oncogenesis [35,84,95]. In addition, Akt has been characterized as preferentially inducing the expression of Bcl-2 antiapoptotic family member Mcl-1 upon IL-3 stimulation, with transcription depending in part on cAMP response element-binding protein (CREB) binding to CRE-2 in the Mcl-1 promoter region [96,97]. In 2009, Tabrizi et al. focused on the role of the BCR signaling cascade

in the apoptosis of B cells with naïve or memory phenotypes. After 2 days of culture, both subsets underwent spontaneous apoptosis, with BCR stimulation rescuing the naïve B cells but not the memory B cells. Following BCR stimulation, high Mcl-1 expression and a 10-fold increase in TCL1A mRNA level were found in the naïve B cells but were unchanged in the memory B cells. After inducing its expression in memory B cells through transgene activation, TCL1A restored Mcl-1 expression and protected memory B cells from apoptosis. These results indicate that TCL1A is implicated in Mcl-1 expression and differentially regulated in early and mature B cells at the transcriptional level, depending on BCR stimulation. Nonetheless, TCL1A protein was only detected in the naïve B cells, and irrespective of BCR stimulation its expression decreased over time, suggesting potent posttranscriptional regulation of TCL1A expression [98]. Opposite effects have been reported for Galectin-1 protein (Gal-1) and TCL1A expression, with distinct BCR signaling that was reduced in naïve B cells compared to memory B cells, leading to TCL1A expression and the survival of one B cell subset and to Gal-1 expression and apoptosis for another B cell subset [98]. This result was similar to that of reduced BCR signaling in TOL patients with reduced ERK phosphorylation, which led to preferential IL-10 production upon BCR+CD40 stimulation [50]. This TCL1A effect on early B cell survival was also consistent with their increased proportion in TOL patients.

Perkarsky et al. were the first to characterize NF- $\kappa$ B enhancement by TCL1A independent of Akt [99]. Indeed, TCL1A interacted with I $\kappa$ B $\alpha$ , participating in the I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B complex and allowing NF- $\kappa$ B sequestration and inactivation in the cytoplasm [100,101]. TCL1A also physically interacts with ATM (ataxia telangiectasia mutated), a serine-threonine kinase triggered by DNA strand breaks [102]. In E $\mu$ -TCL1A mice, TCL1A overexpression led to upregulated ATM, a protein known as a tumor suppressor, and downregulated TCL1A in the DNA damage repair process in B cells undergoing GC transformation [103,104]. In TCL1A-Transgenic (Tg) mice, ATM upregulation was also associated with I $\kappa$ B downregulation, which may have been the result of I $\kappa$ B phosphorylation by ATM [104]. ATM also inhibits apoptosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome by increasing I $\kappa$ B degradation, favoring NF- $\kappa$ B activation [105]. The authors hypothesized that TCL1A interaction with both I $\kappa$ B $\alpha$  and ATM may have increased ATM-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , which may partially explain TCL1A Akt-independent NF- $\kappa$ B activation, reinforcing its impact on B cell survival [104]. Moreover, Gaudio et al. recently showed that TCL1A interacted with the AP-1 consensus region of the TP63 promoter, an oncogene implied in lymphomagenesis [106]. In vitro, TCL1A expression enhanced the transcriptional activity of the TP63 promoter, and inhibition of the expression of both proteins markedly reduced Akt phosphorylation and Raji cell survival. These results revealed another interaction by which TCL1A may prevent B cell apoptosis [107].

### 5. TCL1A, Cell Proliferation and Differentiation

Cell growth and proliferation are positively regulated by the PI3K-Akt pathway. Akt might promote proliferation by inhibiting GSK3 (glycogen synthase kinase 3) activity, preventing ubiquitination and degradation of CyclinD and c-Myc [108,109]. Akt also directly activates mTORC1, whose serine/threonine kinase activity promotes growth and biogenesis through activation of the p70 S6 kinase and inhibition of the translational repressor 4E-BP1 [110,111]. Different models have been used to decipher the role of TCL1A in these processes. E $\mu$ -TCL1A transgenic mice in which the TCL1A gene was under the control of a VH promoter-IgH-E $\mu$  enhancer exhibited TCL1A expression enhancement in immature and mature B cells, serving as a model of human B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) physiopathology. These mice showed polyclonal expansion of CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> B220<sup>int</sup> B cells in primary and secondary lymphoid tissues at approximately 4 and 8 months of age [112–114]. In a mouse model of GC-derived lymphoma, there was an increase in the proliferation of B cells under BCR stimulation compared to that in wild-type mice [115]. In another TCL1A-Tg mouse model (E $\mu$ -TCL1FL), B cells developed a CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cancerous phenotype at approximately 16–20 months of age. In this model,

TCL1A-Tg B cells displayed increased proliferation compared with wild-type B cells, even without stimulation. The level of phospho-Akt was significantly higher in the malignant and total B cells in TCL1A-Tg mice than in the B cells of the spleen in wild-type mice with or without PMA stimulation [83]. Similarly, in cultures of primary B-CLL cells under several stimulation conditions, BCR responsiveness was positively correlated with TCL1A expression, with a robust growth response associated with fast and strong Akt phosphoactivation in B-CLL cells with high TCL1A levels. These cells also presented robust growth *in vivo* and poor response to therapies [116]. These findings are consistent with observations of TOL patients in which high TCL1A expression is associated to an increase in total B cell count and high early B cell proportion.

TCL1A expression may influence B cell differentiation through several factors. The expression of activation-induced deaminase (AID) is critical for class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) of immunoglobulins (Ig) in B cells [117]. *IRF4* and *PRDM1*, which encode BLIMP-1, are two major genes involved in B cell maturation, notably in Ig production, and are mandatory for B cell differentiation into plasmablasts and plasma cells [118,119]. IRF4 and BLIMP-1 also both upregulate *XBP1*, another mandatory gene for Ig production is implicated in the endoplasmic reticulum stress response and the establishment of B cell Ig secretion [118–120]. XBP-1 was also implicated in the effectiveness of BCR signaling and may upregulate AID expression [121]. Strong PI3K-Akt signaling in B cells favored their early differentiation into antibody-secreting cells, not into class switch antibody secreting cells [122,123]. This fate was notably influenced by Akt activation, which increased BLIMP-1 expression, acting itself as an AID repressor [122,123], and through other factors [122,124–126]. Using an E $\mu$ -TCL1A transgenic mouse model and 3 days of LPS stimulation, Kriss et al. showed that CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells from 2-month-old mice overexpressing TCL1A presented increased expression of XBP-1, PAX5 and AID [114], in accordance with increased expression of *Aicda* gene, coding for the AID protein previously identified in the E $\mu$ -TCL1A mice [115]; these mice also presented reduced expression of IRF4 and BLIMP-1 compared to wild-type mice at 2 months. After 8 months, the transgenic mice developed a CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B cell cancer phenotype, and ectopic PAX5 expression and a profound increase in IRF4 and BLIM-1 expression were evident compared to the corresponding levels in the wild-type mice. However, despite this expression profile, these mice did not acquire a CD138<sup>+</sup> B cell immunophenotype, indicating a defect in late B cell differentiation. These cells also had increased XBP-1 and AID expression compared with CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B cells. Surprisingly, after 8 months, these CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B cells also showed a substantial reduction in Akt expression, with altered BCR signaling, which was becoming constitutively active, and the BCR transducer CD79A being phosphorylated without the BCR stimulation associated with reduced p-Akt and p-ERK expression [114]. This dysregulated and persistent BCR signaling was consistent with findings on TCL1A-mediated oncogenesis [116,127]. This outcome may have been linked to XBP-1 overexpression since a lack of XBP-1 has been associated with default BCR activation with reduced CD79a, CD79b and Syk phosphorylation [121]. Furthermore, in addition to increasing XBP-1 expression, TCL1A could interact directly with XBP-1, leading to questions on its role in CLL development [114]. In that respect, TCL1A-mediated B-CLL development begins by an increased XBP-1 and AID expression, evolving in 8 months to malignant cells with increased IRF4 and BLIMP-1 expression, associated with reduced Akt expression, which may indicate other ways for TCL1A than Akt coactivation in CLL development (cf. Figure 1) [114].

In GC, AID promotes CSR by generating DNA strand breaks in cells undergoing high rates of proliferation [117]. Sheirman et al. showed that DNA double-strand breaks reduced the association of the TCL1A transcription factor CRT2 with the *TCL1A* promoter and repressed TCL1A expression [85,103]. This process relied on ATM activation of LKB1, a kinase mediating the activation of AMP-activated protein kinases, including SIK kinase, which is known to phosphorylate and inactivate CRT2 (cf. Figure 1) [103]. They showed that CRT2 upregulates several genes in GC B cells that are downregulated in post-GC



B cells, including *MYC* and *AID* [103,120], two genes that were overexpressed in *TCL1A*-Tg mice [114,115]. *CRTC2* inactivation was required for plasma cell differentiation since *CRTC2* overactivation decreased *BLIMP-1* expression and promoted the expression of B cell proliferation factors such as *BCL6* [103]. A similar effect on *BLIMP-1* expression was found in 2-month *CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> TCL1A*-Tg mice [114]. These results confirm the implication of *TCL1A* and other co-expressed genes in B cell proliferation and point to the need for their repression to promote B cell differentiation starting during GC transformation.

#### 6. *TCL1A* and IL-10, Factors of B Cell Regulation

In naïve B cells, IL-10 production is first initiated by TLR stimulation, allowing further robust IL-10 production through both BCR and CD40 stimulation [128–130]. IL-10 expression through TLR4 stimulation requires Syk, an essential kinase in the BCR signalosome. Syk deficiency causes dysregulated TLR4-dependent IL-10 secretion and a lack of CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> IL-10 competent B cells. IL-10 production following TLR4 stimulation requires the presence of both BCR and Syk, leading notably to Akt activation [131]. Adding the PI3K inhibitor LY290042 or the Akt inhibitor triciribine to culture medium significantly reduced IL-10 production in B cells *in vitro*. Mice deficient in phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), a known inhibitor of the PI3K-Akt pathway, harbored a markedly increased proportion of B10 cells compared to wild-type mice and exhibited significantly reduced contact hypersensitivity and an increased proportion of regulatory T cells in lymphoid organs [132]. Taken together, these findings indicate that the PI3K-Akt pathway may participate in IL-10 B cell competency and reinforce the postulate suggesting that increased *TCL1A* expression favors B10 cell development. However, the mechanisms by which the PI3K-Akt pathway may promote IL-10 expression are unclear, since the activation of this pathway could interfere with the function of many factors known to govern IL-10 expression in B cells, including *STAT3*, *IRF4*, *NFAT* or *C-Maf* [130,133–135]. *GSK3*, inhibited directly by the PI3K-Akt pathway [136], has been suggested to play an important role in tolerant phenotype development in several hematopoietic cell subsets. In several T cell subsets, *GSK3* inhibition led to promoted IL-10 expression through methylation changes in the *IL10* promoter region and increases in IL-10 transcription factors such as *Sp1*, *c-Maf* and *BLIMP-1* [137,138]. Moreover, it has been shown that in B cells, isoprenylation factors, notably geranylgeranyl pyrophosphate, and the enzymatic activity of geranylgeranyltransferase (*GGTase*) were required for effective TLR9-dependent IL-10 production in several B cell subsets [139]. This TLR9 pathway is Ras-dependent and implies the PI3K-Akt pathway. *GGTase* inhibition reduced IL-10 expression and increased *GSK3* activation, while direct *GSK3* inhibition restored IL-10 expression in B cells. Similar to its effect in T cells, *GSK3* inhibition allows the expression of *BLIMP-1*, which was identified in a previous study as an important transcription factor for IL-10 in activated B10 cells (cf. Figure 1) [140]. *BLIMP-1* was highly upregulated by TLR9 stimulation in several B cell subsets, including naïve and CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells, with siRNA-mediated *BLIMP-1* knockdown reducing B cell IL-10 expression by 50 to 90% [139]. These findings are very important as they explain PI3K-Akt-mediated IL-10 production in B cells and reveal a potential link between *TCL1A* and IL-10 B cell competency. In addition, *GSK3* is implicated in the expression and signaling of IL-10 in multiple hematopoietic cell lineages, representing an important checkpoint for cell phenotype orientation [141,142]. Interestingly, the *CREB/CRTC2* complex implicated in B cell *TCL1A* expression also participated in IL-10 expression in dendritic cells in response to zymosan and autocrine production of prostaglandin E2 [143]. *CRTC3* has also been identified as an IL-10 transcription factor in macrophages [144,145]. As previously stated, *CRTC2* and *CRTC3* are inactivated by SIK kinases, which are inactivated by PKA and activated by *GSK3* (cf. Figure 1) [146–149].

Given the extent to which *TCL1A* has been implicated in several human B cell CLLs [78,116], Dilillo et al. tested whether *TCL1A* expression is correlated with IL-10 expression and, using samples from 52 patients with overt CLL, found that *TCL1A* expression positively correlated with IL-10 expression. Moreover, *TCL1A* expression was

significantly higher in the IL-10<sup>+</sup> than in the IL-10<sup>-</sup> CLL cells from the same patients, indicating that TCL1A overexpression may play a role in the development of IL-10 competency in CLL cells [113]. To investigate this question in depth, these authors studied IL-10 competency in CLL cells obtained from Eμ-TCL1A mice. The vast majority (50–90%) of the B cells from Eμ-TCL1A mice older than 12 months were IL-10 competent, while the proportion of IL-10 competent B cells in the wild-type mice was not increased with age. However, some TCL1A-Tg mice through to 16 months of age retained normal frequencies and absolute numbers of IL-10<sup>+</sup> B cells, demonstrating that TCL1A expression alone is not sufficient to induce B cell IL-10 competency [113]. *In vivo*, in aged TCL1A-Tg mice, low-dose LPS treatment induced high levels of IL-10 production, with an IL-10 level 159-fold higher in the TCL1A-Tg mice than in the wild-type mice. *In vitro*, TCL1A-Tg CLL cells possessed regulatory properties and could significantly inhibit macrophage TNF-α production upon activation in coculture assays [113]. These results indicate that sustained TCL1A expression may favor the orientation of B cells to acquire a regulatory phenotype through IL-10 expression.

Studying Eμ-TCL1A mice, Kriss et al. showed that, on the one hand, CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells from 2-month-old TCL1A-Tg mice that had not yet developed a cancerous phenotype presented reduced expression of IRF4 and BLIMP-1 compared to those from wild-type mice after 3 days of LPS stimulation. On the other hand, with the same stimulation, the CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cells of 8-month-old mice, corresponding to the development of IL-10 cell competency [113], presented markedly increased expression of these two transcription factors compared to those of wild-type mice, which seems to confirm their importance for IL-10 expression [114]. More surprisingly, this IL-10 competency may also be related to a marked decrease in Akt expression, with altered BCR signaling becoming constitutively active. Pathologically prolonged TCL1A expression in mice is associated with enhanced IRF4, BLIMP-1 and IL-10 expression, according to a mechanism that may not necessarily require the Akt pathway [114].

Other studies have also recently investigated pathways implicated in IL-10 production in Eμ-TCL1A mice. Alhakeem et al. first detected that BCR signaling was implicated in IL-10 expression by using inhibitors of Src, Syk and Btk kinase and thereby reducing IL-10 mRNA levels. They postulated that IL-10 expression was regulated at a transcriptional level. Using Syk inhibitors, they noted a decrease in Akt phosphorylation and postulated that the PI3K-Akt pathway may play a role in IL-10 expression [150]. They further investigated this subject in another study using the same kinase inhibitors and noted BCR involvement in IL-10 expression with a decrease in ERK1/2 phosphorylation. Investigating a potential downstream transcription factor that may be activated by ERK1/2, they found that Sp1 was the only transcription factor enhanced by BCR signaling and reduced by Syk inhibition. Moreover, they found that mithramycin A, a Sp1 inhibitor, reduced IL-10 protein levels in a dose-dependent manner. Additionally, their Chromatin Immunoprecipitation assays revealed an 8-fold enrichment in the binding of Sp1 to the IL-10 promoter in CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B cells of Eμ-TCL1A mice. These results were further supported in primary human CLL samples in which Syk inhibitors reduced ERK1/2 phosphorylation and Sp1 and IL-10 levels [151]. These results were consistent with the implication of a particular BCR signaling pathway being activated in Eμ-TCL1A CD5<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B cells participating in IL-10 expression [114]. They were also consistent with other studies implicating Sp1 in IL-10 expression in regulatory T cells in response to GSK3 inhibition [138], also favoring IL-10 expression in B cells through BLIMP-1 [139]. Notably, Sp1 may regulate the expression of both IL-10 and TCL1A in B cells [81,151].

In addition to Akt coactivation, TCL1A acts as a transcriptional regulator. Pekarsky et al. showed that TCL1A physically interacts with several factors of the transcriptional complex AP-1, notably c-Jun and c-Fos, and acts as an inhibitor of the AP-1 complex [99]. TCL1A also represses the expression of truncated receptor-type protein tyrosine phosphatase (PTPROt), a phosphatase expressed in naïve B cells that represses lymphoma in Eμ-TCL1A mice, and regulates BCR signals by modulating the activity of tyrosine kinases,

including Lyn, Syk and ZAP70 [152–155]. The inhibition of PTPROt occurs early and at the transcriptional level. PTPROt transcription is dependent on the AP-1 complex elements c-fos and c-jun, and TCL1A impairs AP-1 complex activity by repressing c-fos and inhibiting c-jun phosphorylation. These results were confirmed in B-CLL cell lines and primary cells, showing that PTPROt promoter activity depends on the AP-1 complex and that its inhibition is correlated with TCL1A expression [155]. Using a double transgenic mouse model overexpressing PTPROt and TCL1A, the same team that discovered TCL1A repression of PTPROt highlighted that PTPROt overexpression had a tumor suppressor effect *in vivo*, which had been previously identified in other studies [153,156]. In contrast, this same group studied the effect of PTPROt downregulation in E $\mu$ -TCL1A mice by inactivating a single (heterozygous knockout [HET]) or both (homozygous knockout [ROKO]) PTPROt alleles in wild-type (WT) and E $\mu$ -TCL1A mice to determine how it impacts CLL onset in these mice. Deleted PTPROt did not alter BCR signaling pathways, as indicated by WT, HET and ROKO mice presenting similar basal levels of Lyn, Syk, p-Akt and p-ERK. In E $\mu$ -TCL1A mice, PTPROt may be considered a tumor repressor when one allele is deleted and, unexpectedly, may be a tumor promoter when both alleles are deleted [157]. IL-10 expression was higher in the tumor cells from the HET/E $\mu$ -TCL1A mice and even higher in the ROKO/E $\mu$ -TCL1A mice than in WT/E $\mu$ -TCL1A mice, suggesting that PTPROt decreases enhanced IL-10 expression. In tumor cells, higher expression of IL-10R1 was observed in HET and ROKO/E $\mu$ -TCL1A mice, consistent with higher phosphorylation of STAT3 activated by the IL-10 receptor [157]. In addition, this finding needs to be specifically extended to understand how PTPROt expression may influence that of IL-10; it may also have a link to the higher IL-10 potency found in WT/TCL1A mice [113], which may be explained partially by TCL1A repression of PTPROt and acquisition of a B10 phenotype.

## 7. Conclusions

In summary, we first see that TCL1A may participate in the increase in the proportion of immature B cells in TOL patients, considering its effects on B cell survival, proliferation, growth and differentiation. Several studies also pointed to a potential link between TCL1A expression and the development of a Breg phenotype, notably through IL-10 expression. However, TCL1A expression in mice is not mandatory for the development of B cell IL-10 competency since some E $\mu$ -TCL1A mice retained normal frequencies and absolute numbers IL-10 competent B cells [113], with a B cell clonal variation in their basal levels of the IL-10 produced [150]. Moreover, mature subsets of IL-10 competent B cells, such as CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> memory [158] and CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>int</sup> plasmablasts in humans [135], are known to physiologically repress TCL1A. This also indicates that TCL1A expression is dispensable for IL-10 B cell competency. Nonetheless, TCL1A overexpression in human and mouse B cells strongly correlates with an enhancement of IL-10<sup>+</sup> B cells. TCL1A may favor orientation of B cells to an IL-10 production phenotype, by a mechanistic remaining elusive, but needed to be considered notably in immature B cell populations of tolerant renal transplant patients expressing both TCL1A and IL-10. In addition to these observations, TCL1A overexpression in B cells from TOL patients may also be derived from an independent increase in immature B cells, which are known to express this protein. More investigation is thus required to determine whether TCL1A overexpression represents a condition suitable for the development of renal transplantation tolerance. This will be deciphered using *in vitro* models of induction of regulatory B cells, such as B10 and GZMB-producing cells, from TOL and no-TOL kidney transplant patients. In these cells, TCL1A interactions described in this work would systematically be analyzed at transcriptomic and proteomic levels regarding to their effects towards regulatory process, including IL-10 expression. The use of animal models described above in the settings of transplantation models will also evidence TCL1A's key role in immune mechanisms. These experiments would provide a clearer picture of TCL1A involvement in kidney tolerance and foster its use as biomarker or potential therapeutic target.



**Author Contributions:** F.B., R.D. and S.B. drafted and revised the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** F.B. was funded within the EU-TRAIN project from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No. 754995 and the the LabEx IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). RD was supported by a Marie Skłodowska-Curie fellowship (IF-EF) from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No. 706296. This work was performed in the context of the IHU-Cesti project (ANR-10-IBHU-005), DHU Oncogeffe, ANR project PRELUD (ANR-18-CE17-0019), ANR project BIKET (ANR-17-CE17-0008) and ANR project KYD-innov (ANR-17-RHUS-0010) thanks to French government financial support managed by the National Research Agency. The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. The laboratory received funding from the Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (IRSR-PL) with the support of the Fonds de Recherche en Santé Respiratoire (66 Bd St-Michel, 75006 Paris) under the patronage of the Fondation du Souffle. The authors thank the cluster LUNG innOvatiOn (LUNG O2).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

AID	activation-induced deaminase;
ATM	ataxia telangiectasia mutated;
B-CLL	B chronic lymphocytic leukemia;
BCR	B-cell receptor;
Breg	regulatory B cells;
CR	chronic rejection;
CREB	cAMP response element-binding protein;
CRTC2	transducer of regulated CREB protein 2;
CSR	class switch recombination;
Galectin-1	Gal-1;
GC	Germinal Center;
GGTase	geranylgeranyltransferase;
GSK3	glycogen synthase kinase 3;
HV	healthy volunteers;
Ig	Immunoglobulin;
IS	Immunosuppression;
MAPK	Mitogen activated kinase;
mTORC2	rapamycin-insensitive mTOR complex 2;
PBMC	peripheral blood mononuclear cells;
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1;
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase;
PIP2	phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate;
PIP3	phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate;
PTPROt	truncated receptor-type protein tyrosine phosphatase;
SHM	somatic hypermutation;
STA	stable patients with immunosuppression;
TCR	T cell receptor;
Tg	Transgenic;
TLR	Toll-like receptor;
TOL	tolerant.

### References

1. Pascual, M.; Theruvath, T.; Kawai, T.; Yolloff-Rubin, N.; Cosimi, A.B. Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 580–590.
2. Brar, J.E.; Nader, N.D. Immune minimization strategies in renal transplantation. *Immunol. Investig.* **2014**, *43*, 807–818.

3. Wimmer, C.D.; Rentsch, M.; Crispin, A.; Illner, W.D.; Arbogast, H.; Graeb, C.; Jauch, K.-W.; Guba, M. The janus face of immunosuppression—De novo malignancy after renal transplantation: The Exp. of the Transplantation Center Munich. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 1271–1278. [\[CrossRef\]](#)
4. Fishman, J.A. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 2601–2614. [\[CrossRef\]](#)
5. Campo, A. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2563–2565.
6. Ghisdal, L.; Van Laecke, S.; Abramowicz, M.J.; Vanholder, R.; Abramowicz, D. New-onset diabetes after renal transplantation: Risk assessment and management. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 181–188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Dantal, J.; Pohanka, E. Malignancies in renal transplantation: An unmet medical need. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 4–10. [\[CrossRef\]](#)
8. Billingham, R.E.; Brent, L.; Medawar, P.B. Actively acquired immunological tolerance of foreign cells. *Nature* **1953**, *172*, 603–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Ildstad, S.T.; Sachs, D.H. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* **1984**, *307*, 168–170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Xu, H.; Ildstad, S.T. Transplantation: Is donor T-cell engraftment a biomarker for tolerance? *Nat. Rev. Nephrol.* **2012**, *8*, 560–561. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Leventhal, J.; Abecassis, M.; Miller, J.; Gallon, L.; Ravindra, K.; Tollerud, D.J.; King, B.; Elliott, M.J.; Herzig, G.; Herzig, R.; et al. Chimerism and Tolerance Without GVHD or Engraftment Syndrome in HLA-Mismatched Combined Kidney and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 124ra28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kawai, T.; Cosimi, A.B.; Spitzer, T.R.; Folkoff-Rubin, N.; Suthanthiran, M.; Saidman, S.L.; Shaffer, J.; Pfeffer, E.I.; Ding, R.; Sharma, V.; et al. HLA-Mismatched Renal Transplantation without Maintenance Immunosuppression. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 353–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Scandling, J.D.; Busque, S.; Shizuru, J.A.; Lowsky, R.; Hoppe, R.; Dejbakhsh-Jones, S.; Jensen, K.; Shori, A.; Strober, J.A.; Lavori, P.; et al. Chimerism, Graft Survival, and Withdrawal of Immunosuppressive Drugs in HLA Matched and Mismatched Patients After Living Donor Kidney and Hematopoietic Cell Transplantation. *Am. J. Transp. Archaeol. Eplantigr.* **2015**, *15*, 695–704. [\[CrossRef\]](#)
14. Romano, M.; Fanelli, G.; Albany, C.J.; Giganti, G.; Lombardi, G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 10–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Ramos, H.; Reyes, J.; Abu-Elmagd, K.; Zeevi, A.; Reinsmoen, N.; Yzakis, A.; Demetris, A.J.; Fung, J.J.; Flynn, B.; McMichael, J.; et al. Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation* **1995**, *57*, 212–217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Massart, A.; Pallier, A.; Pascual, J.; Viklicky, O.; Budde, K.; Spasovski, G.; Klinger, M.; Sever, M.S.; Sørensen, S.S.; Hadaya, K.; et al. The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, *31*, 1002–1013. [\[CrossRef\]](#)
17. Brouard, S.; Pallier, A.; Renaudin, K.; Foucher, Y.; Danger, R.; Devys, A.; Cesbron, A.; Guillot-Guegen, C.; Ashton-Chess, J.; Le Roux, S.; et al. The Natural History of Clinical Operational Tolerance After Kidney Transplantation Through Twenty-Seven Cases. *Arab. Archaeol. Epigr.* **2012**, *12*, 3296–3307. [\[CrossRef\]](#)
18. Roussey-Kesler, G.; Giral, M.; Moreau, A.; Subra, J.-F.; Legendre, C.; Noël, C.; Pillebout, E.; Brouard, S.; Souillou, J.-P. Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation. *Arab. Archaeol. Epigr.* **2006**, *6*, 736–746. [\[CrossRef\]](#)
19. Ballet, C.; Roussey-Kesler, G.; Aubin, J.Y.; Brouard, S.; Giral, M.; Miqueu, P.; Louis, S.; Van Der Werf, S.; Souillou, J.-P. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am. J. Transplant.* **2006**, *6*, 2796–2801. [\[CrossRef\]](#)
20. Orlando, G.; Hematti, P.; Stratta, R.J.; Burke, G.W.; Di Cocco, P.; Pisani, F.; Soker, S.; Wood, K. Clinical operational tolerance after renal transplantation: Current status and future challenges. *Ann. Surg.* **2010**, *252*, 915–928. [\[CrossRef\]](#)
21. Sánchez-Fueyo, A.; Strom, Y.B. Immunological tolerance and liver transplantation. *J. Hepatol.* **2004**, *41*, 698–705. [\[CrossRef\]](#)
22. Benítez, C.; Londoño, M.C.; Miquel, R.; Marzia, T.M.; Abalde, J.G.; Lozano, J.J.; Martínez-Llordella, M.; Lopez, M.; Angelico, R.; Bohne, F.; et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* **2013**, *58*, 1824–1835. [\[CrossRef\]](#)
23. Brouard, S.; Mansfield, E.; Braud, C.; Li, L.; Giral, M.; Hsieh, S.-C.; Baeten, D.; Zhang, M.; Ashton-Chess, J.; Braudeau, C.; et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15448–15453. [\[CrossRef\]](#)
24. Braud, C.; Baeten, D.; Giral, M.; Pallier, A.; Ashton-Chess, J.; Braudeau, C.; Chevalier, C.; Lebars, A.; Léger, J.; Moreau, A.; et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. blood gene expression statistical analysis. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *103*, 1681–1692. [\[CrossRef\]](#)
25. Newell, K.A.; Asare, A.; Kirk, A.D.; Gislis, Y.D.; Bourcier, K.; Suthanthiran, M.; Burlingham, W.J.; Marks, W.H.; Sarz, I.; Lechler, R.I.; et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1836–1847. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Pallier, A.; Hillion, S.; Danger, R.; Giral, M.; Racapé, M.; Degauque, N.; Dugast, E.; Ashton-Chess, J.; Pettré, S.; Jos, J.; et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 503–513. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



27. Sagoo, P.; Perucha, E.; Sawitzki, B.; Tomiuk, S.; Stephens, D.; Miquieu, P.; Chapman, S.; Craciun, L.; Sergeant, R.; Brouard, S.; et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 1848–1861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lozano, J.J.; Pallier, A.; Martínez-Llordella, M.; Danger, R.; López, M.; Giral, M.; Londoño, M.C.; Rimola, A.; Souillou, J.P.; Brouard, S.; et al. Comparison of Transcriptional and Blood Cell-Phenotypic Markers Between Operationally Tolerant Liver and Kidney Recipients. *Arab. Archaeol. Epigr.* **2011**, *11*, 1916–1926. [[CrossRef](#)]
29. Vklický, O.; Krystufková, E.; Brabcová, I.; Sekerková, A.; Wohlfahrt, P.; Hřibová, P.; Wohlfahrtová, M.; Sawitzki, B.; Slatinská, J.; Striz, I.; et al. B-Cell-Related Biomarkers of Tolerance are Up-Regulated in Rejection-Free Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* **2013**, *95*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Chesneau, M.; Pallier, A.; Braza, F.; Lacombe, G.; Le Gallou, S.; Baron, D.; Giral, M.; Danger, R.; Guérif, P.; Aubert-Wastiaux, H.; et al. Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients. *Arab. Archaeol. Epigr.* **2013**, *14*, 144–155. [[CrossRef](#)]
31. Baron, D.; Ramstein, G.; Chesneau, M.; Echassieriau, Y.; Pallier, A.; Paul, C.; Degauque, N.; Hernandez-Fuentes, M.P.; Sanchez-Fueyo, A.; Newell, K.A.; et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int.* **2015**, *87*, 984–995. [[CrossRef](#)]
32. Heidt, S.; Vergunst, M.; Anholts, J.D.; Reinders, M.E.; De Fijter, J.W.; Eikmans, M.; Claas, F.H. B Cell Markers of Operational Tolerance Can Discriminate Acute Kidney Allograft Rejection From Stable Graft Function. *Transplantation* **2015**, *99*, 1058–1064. [[CrossRef](#)]
33. Danger, R.; Chesneau, M.; Paul, C.; Guérif, P.; Durand, M.; Newell, K.A.; Kanaparthi, S.; Turka, L.A.; Souillou, J.-P.; Houllgate, R.; et al. A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* **2017**, *91*, 1473–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Said, J.W.; Hoyer, K.K.; French, S.W.; Rosenfelt, L.; Garcia-Lloret, M.; Koh, P.J.; Cheng, T.-C.; Sulur, G.G.; Pinkus, G.S.; Kuehl, W.M.; et al. TCL1 Oncogene Expression in B Cell Subsets from Lymphoid Hyperplasia and Distinct Classes of B Cell Lymphoma. *Lab. Investig.* **2001**, *81*, 555–564. [[CrossRef](#)]
35. Virgilio, L.; Narducci, M.G.; Isobe, M.; Billips, L.G.; Cooper, M.D.; Croce, C.M.; Russo, G. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12530–12534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Newell, K.A.; Asare, A.L.; Sarz, I.; Wei, C.; Rosenberg, A.; Gao, Z.; Kanaparthi, S.; Asare, S.M.; Lim, N.; Stahly, M.; et al. Longitudinal Studies of a B Cell-Derived Signature of Tolerance in Renal Transplant Recipients. *Arab. Archaeol. Epigr.* **2015**, *15*, 2908–2920. [[CrossRef](#)]
37. Silva, H.M.; Takenaka, M.C.S.; Moraes-Vieira, P.M.M.; Monteiro, S.M.; Hernandez, M.O.; Chaara, W.; Six, A.; Aghena, F.; Sesterheim, P.; Barbe-Yuana, F.M.; et al. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med.* **2012**, *18*, 733–743. [[CrossRef](#)]
38. Swain, S.L.; Dutton, R.W. Consequences of the Direct Interaction of Helper T Cells with B Cells presenting Antigen. *Immunol. Rev.* **1987**, *99*, 263–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Harris, D.P.; Haynes, L.; Sayles, P.C.; Duso, D.K.; Eaton, S.M.; Lepak, N.M.; Johnson, L.L.; Swain, S.L.; Lund, F.E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **2000**, *1*, 475–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mauri, C.; Bosma, A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2012**, *30*, 221–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Parekh, V.V.; Prasad, D.V.R.; Banerjee, P.P.; Joshi, B.N.; Kumar, A.; Mishra, G.C. B Cells Activated by Lipopolysaccharide, But Not By Anti-Ig and Anti-CD40 Antibody, Induce Anergy in CD8 + T Cells: Role of TGF- $\beta$ 1. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 5897–5911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Blair, P.A.; Noreña, L.Y.; Flores-Borja, F.; Rawlings, D.J.; Isenberg, D.A.; Ehrenstein, M.R.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* **2010**, *32*, 129–140. [[CrossRef](#)]
43. Josien, R.; Douillard, P.; Guillot, C.; Müschen, M.; Anegón, I.; Chetritt, J.; Menoret, S.; Vignes, C.; Souillou, J.-P.; Cuturi, M.-C.; et al. A critical role for transforming growth factor- $\beta$  in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1920–1926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mizoguchi, A.; Mizoguchi, E.; Takedatsu, H.; Blumberg, R.S.; Bhan, A.K. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity* **2002**, *16*, 219–230. [[CrossRef](#)]
45. Yanaba, K.; Bouaziz, J.-D.; Haas, K.M.; Poe, J.C.; Fujimoto, M.; Tedder, T.F. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* **2008**, *28*, 639–650. [[CrossRef](#)]
46. Das, A.; Ellis, G.; Pallant, C.; Lopes, A.R.; Khanna, P.; Peppas, D.; Chen, A.; Blair, P.; Dusheiko, G.M.; Gill, U.; et al. IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 3925–3935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Flores-Borja, F.; Bosma, A.; Ng, D.; Reddy, V.; Ehrenstein, M.R.; Isenberg, D.A.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 173ra23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cherukuri, A.; Rothstein, D.M.; Clark, B.; Carter, C.R.; Davison, A.; Hernandez-Fuentes, M.; Hewitt, E.; Salama, A.D.; Baker, R.J. Immunologic Human Renal Allograft Injury Associates with an Altered IL-10/TNF- $\alpha$  Expression Ratio in Regulatory B Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *25*, 1575–1585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Cherukuri, A.; Salama, A.D.; Mehta, R.; Mohib, K.; Zheng, L.; Magee, C.; Harber, M.; Stauss, H.; Baker, R.J.; Tevar, A.; et al. Transitional B cell cytokines predict renal allograft outcomes. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabe4929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lamperti, E.A.N.; Chana, P.; Mobillo, P.A.; Runglall, M.; Kamra, Y.K.; McGregor, R.H.C.; Lord, G.M.; Lechler, R.I.; Lombardi, G.; Fuentes, M.P.H. Increased CD40 Ligation and Reduced BCR Signalling Leads to Higher IL-10 Production in B Cells From Tolerant Kidney Transplant Patients. *Transplantation* **2017**, *101*, 541–547. [[CrossRef](#)]
51. Rebollo-Mesa, I.; Nova-Lamperti, E.; Mobillo, P.; Runglall, M.; Christakoudi, S.; Norris, S.; Smallcombe, N.; Kamra, Y.; Hilton, R.; Indices of Tolerance EU Consortium; et al. Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *Am. J. Transplant.* **2016**, *16*, 3443–3457. [[CrossRef](#)]
52. Christakoudi, S.; Runglall, M.; Mobillo, P.; Rebollo-Mesa, I.; Tsui, Y.-L.; Nova-Lamperti, E.; Taube, C.; Norris, S.; Kamra, Y.; Hilton, R.; et al. Development and validation of the first consensus gene-expression signature of operational tolerance in kidney transplantation, incorporating adjustment for immunosuppressive drug therapy. *EBioMedicine* **2020**, *58*, 102899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Granata, S.; Santoro, G.; Signorini, L.; Malerba, G.; Patuzzo, C.; Gambaro, G.; Stallone, G.; Zaza, G. Comparative transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells in renal transplant recipients in everolimus- and tacrolimus-based immunosuppressive therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *859*, 172494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Danger, R.; Royer, P.-J.; Reboulleau, D.; Durand, E.; Loy, J.; Yissot, A.; Lacoste, P.; Roux, A.; Reynaud-Gaubert, M.; Gomez, C.; et al. Blood Gene Expression Predicts Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1841. [[CrossRef](#)]
55. Hoh, F.; Yang, Y.-S.; Guignard, L.; Padilla, A.; Stern, M.-H.; Lhoste, J.-M.; Van Tilbeurgh, H. Crystal structure of p147YCL1, an oncogene product involved in T-cell prolymphocytic leukemia, reveals a novel  $\beta$ -barrel topology. *Structure* **1998**, *6*, 147–155. [[CrossRef](#)]
56. Petock, J.M.; Torshin, I.Y.; Wang, Y.-F.; Du Bois, G.C.; Croce, C.M.; Harrison, R.W.; Weber, I.T. Structure of murine Ycl1 at 2.5 Å resolution and implications for the YCL oncogene family. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 1545–1551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Künstle, G.; Laine, J.; Pierron, G.; Si, S.-I.K.; Nakajima, H.; Hoh, F.; Roumestand, C.; Stern, M.-H.; Noguchi, M. Identification of Akt Association and Oligomerization Domains of the Akt Kinase Coactivator YCL1. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1513–1525. [[CrossRef](#)]
58. Pekarsky, Y. Ycl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3028–3033. [[CrossRef](#)]
59. Laine, J.; Künstle, G.; Obata, Y.; Sha, M.; Noguchi, M. The Protooncogene YCL1 Is an Akt Kinase Coactivator. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 395–407. [[CrossRef](#)]
60. Auguin, D.; Barthe, P.; Royer, C.; Stern, M.-H.; Noguchi, M.; Arold, S.Y.; Roumestand, C. Structural Basis for the Co-activation of Protein Kinase B by T-cell Leukemia-1 (YCL1) Family Proto-oncoproteins. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35890–35902. [[CrossRef](#)]
61. Laine, J.; Künstle, G.; Obata, Y.; Noguchi, M. Differential Regulation of Akt Kinase Isoforms by the Members of the YCL1 Oncogene Family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3743–3751. [[CrossRef](#)]
62. Walker, K.S.; Deak, M.; Paterson, A.; Hudson, K.; Cohen, P.; Alessi, D.R. Activation of protein kinase B  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: Comparison with protein kinase B  $\alpha$ . *Biochem. J.* **1998**, *331*, 299–308. [[CrossRef](#)]
63. Jacinto, E.; Facchinetti, V.; Liu, D.; Soto, N.; Wei, S.; Jung, S.Y.; Huang, Q.; Qin, J.; Su, B. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* **2006**, *127*, 125–137. [[CrossRef](#)]
64. Werner, M.; Hobeika, E.; Jumaa, H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol. Rev.* **2010**, *237*, 55–71. [[CrossRef](#)]
65. Paduano, F.; Gaudio, E.; Mensah, A.A.; Pinton, S.; Bertoni, F.; Trapasso, E. T-Cell Leukemia/Lymphoma 1 (YCL1): An Oncogene Regulating Multiple Signaling Pathways. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Palamarchuk, A.; Yan, P.S.; Zanesi, N.; Wang, L.; Rodrigues, B.; Murphy, M.; Balatti, V.; Bottoni, A.; Nazaryan, N.; Alder, H.; et al. Ycl1 protein functions as an inhibitor of de novo DNA methylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2555–2560. [[CrossRef](#)]
67. Widhopf, G.F.; Cui, B.; Ghia, E.M.; Chen, L.; Messer, K.; Shen, Z.; Briggs, S.P.; Croce, C.M.; Kipps, T.J. ROR1 can interact with YCL1 and enhance leukemogenesis in E-YCL1 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *111*, 793–798. [[CrossRef](#)]
68. Gaudio, E.; Paduano, F.; Ngarkeu, A.; Lovat, F.; Fabbri, M.; Sun, H.-L.; Gasparini, P.; Efanov, A.; Peng, Y.; Zanesi, N.; et al. Heat shock protein 70 regulates Ycl1 expression in leukemia and lymphomas. *Blood* **2013**, *121*, 351–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Virgilio, L.; Isobe, M.; Narducci, M.G.; Carotenuto, P.; Camerini, B.; Kurosawa, N.; Ar-Rushdi, A.; Croce, C.M.; Russo, G. Chromosome walkline on the YCL1 locus involved in T-cell neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9275–9279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Russo, G.; Isobe, M.; Gatti, R.; Finan, J.; Batuman, O.; Huebner, K.; Nowell, P.C.; Croce, C.M. Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 602–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Stern, M.-H.; Soulier, J.; Rosenzweig, M.; Nakahara, K.; Canki-Klain, N.; Aurias, A.; Sigaux, F.; Kirsch, I.R. MYCP-1: A novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor alpha/delta locus in mature T cell proliferations. *Oncogene* **1993**, *8*, 2475–2483. [[PubMed](#)]



72. Pekarsky, Y.; Hallas, C.; Isobe, M.; Russo, G.; Croce, C.M. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2949–2951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Hallas, C.; Pekarsky, Y.; Itoyama, Y.; Varnum, J.; Bichi, R.; Rothstein, J.L.; Croce, C.M. Genomic analysis of human and mouse TCL1 loci reveals a complex of tightly clustered genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14418–14423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Narducci, M.G.; Fionzenza, M.T.; Kang, S.-M.; Bevilacqua, A.; Di Giacomo, M.; Remotti, D.; Picchio, M.C.; Fidanza, V.; Cooper, M.D.; Croce, C.M.; et al. TCL1 participates in early embryonic development and is overexpressed in human seminomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 11712–11717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Herling, M.; Teitell, M.A.; Shen, R.R.; Medeiros, L.J.; Jones, D. TCL1 expression in plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and the related CD4+ CD56+ blastic tumors of skin. *Blood* **2003**, *101*, 5007–5009. [[CrossRef](#)]
76. Narducci, M.G.; Pescarmona, E.; Lazzeri, C.; Signoretti, S.; Lavinia, A.M.; Remotti, D.; Scala, E.; Baroni, C.D.; Stoppacciaro, A.; Croce, C.M.; et al. Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2095–2100.
77. Narducci, M.G.; Stoppacciaro, A.; Imada, K.; Uchiyama, Y.; Virgilio, L.; Lazzeri, C.; Croce, C.M.; Russo, G. TCL1 is overexpressed in patients affected by adult T-cell leukemias. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5452–5456.
78. Herling, M.; Patel, K.A.; Hsi, E.D.; Chang, K.-C.; Rassidakis, G.Z.; Ford, R.; Jones, D. TCL1 in B-cell Tumors Retains its Normal B-cell Pattern of Regulation and is a Marker of Differentiation Stage. *Am. J. Surg. Pathol.* **2007**, *31*, 1123–1129. [[CrossRef](#)]
79. Aggarwal, M.; Villuendas, R.; Gomez, G.; Rodriguez-Pinilla, S.M.; Sanchez-Beato, M.; Alvarez, D.; Martinez, N.; Rodriguez, A.; Castillo, M.E.; Camacho, F.I.; et al. TCLA1 expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod. Pathol.* **2008**, *22*, 206–215. [[CrossRef](#)]
80. Hiromura, M.; Suizu, F.; Narita, M.; Kinowaki, K.; Noguchi, M. Identification of Nerve Growth Factor-responsive Element of the TCLA1 Promoter as a Novel Negative Regulatory Element. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27753–27764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. French, S.W.; Malone, C.S.; Shen, R.R.; Renard, M.; Henson, S.E.; Miret, M.; Wall, R.; Teitell, M.A. Sp1 Transactivation of the TCLA1 Oncogene. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 948–955. [[CrossRef](#)]
82. Pekarsky, Y.; Santanam, U.; Cimmino, A.; Palamarchuk, A.; Efanov, A.; Maximov, V.; Volinia, S.; Alder, H.; Liu, C.-G.; Rassenti, L.; et al. Tc1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11590–11593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Efanov, A.; Zanasi, N.; Nazaryan, N.; Santanam, U.; Palamarchuk, A.; Croce, C.M.; Pekarsky, Y. CD5+CD23+ leukemic cell populations in TCLA1 transgenic mice show significantly increased proliferation and Akt phosphorylation. *Leukemia* **2010**, *24*, 970–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yuille, M.R.; Condie, A.; Stone, E.M.; Wilsher, J.; Bradshaw, P.S.; Brooks, L.; Catovsky, D. TCLA1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. *Genes Chromosom. Cancer* **2001**, *30*, 336–341. [[CrossRef](#)]
85. Kurashy, A.I.; French, S.W.; Sherman, M.; Herling, M.; Jones, D.; Wall, R.; Teitell, M.A. TORC2 regulates germinal center repression of the TCLA1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10175–10180. [[CrossRef](#)]
86. Mayr, B.; Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 599–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Conkright, M.D.; Canetti, G.; Sreaton, R.; Guzman, E.; Miraglia, L.; Hogenesch, J.B.; Montminy, M. TORCs: Transducers of regulated CREB activity. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 413–423. [[CrossRef](#)]
88. Datta, S.R.; Katsav, A.; Hu, L.; Petros, A.; Fesik, S.W.; Yaffe, M.B.; Greenberg, M.E. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 41–51. [[CrossRef](#)]
89. Dijkers, P.F.; Medema, R.H.; Lammers, J.-W.J.; Koenderman, L.; Coffey, P.J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 1201–1204. [[CrossRef](#)]
90. Paik, J.-H.; Kollipara, R.; Chu, G.; Ji, H.; Xiao, Y.; Ding, Z.; Miao, L.; Tothova, Z.; Horner, J.W.; Carrasco, D.R.; et al. FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* **2007**, *128*, 309–323. [[CrossRef](#)]
91. Romashkova, J.A.; Makarov, S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **1999**, *401*, 86–90. [[CrossRef](#)]
92. Ozes, O.N.; Mayo, L.D.; Gustin, J.A.; Pfeffer, S.R.; Pfeffer, L.M.; Donner, D.B. NF-kB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **1999**, *401*, 82–85. [[CrossRef](#)]
93. Kane, L.P.; Shapiro, V.S.; Stokoe, D.; Weiss, A. Induction of NF-kB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 601–604. [[CrossRef](#)]
94. Dolcet, X.; Llobet, D.; Pallares, J.; Matias-Guiu, X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* **2005**, *446*, 475–482. [[CrossRef](#)]
95. Fulda, S. Synthetic lethality by co-targeting mitochondrial apoptosis and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Mitochondrion* **2014**, *19*, 85–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Wang, J.-M.; Chao, J.-R.; Chen, W.; Kuo, M.-L.; Yen, J.J.-Y.; Yang-Yen, H.-F. The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 6195–6206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Du, K.; Montminy, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32377–32379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

98. Tabrizi, S.J.; Niuro, H.; Masui, M.; Yoshimoto, G.; Iino, T.; Kikushige, Y.; Wakasaki, Y.; Baba, E.; Shimoda, S.; Miyamoto, Y.; et al. T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM + Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 1490–1499. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Pekarsky, Y.; Palamarchuk, A.; Maximov, V.; Efanov, A.; Nazaryan, N.; Santanam, U.; Rassenti, L.; Kipps, T.; Croce, C.M. Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19643–19648. [\[CrossRef\]](#)
100. Hayden, M.S.; Ghosh, S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344–362. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Ropars, V.; Despout, G.; Stern, M.H.; Benichou, S.; Roumestand, C.; Arold, S.T. The TCL1A oncoprotein interacts directly with the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B. *PLoS ONE* **2009**, *4*, 3–9. [\[CrossRef\]](#)
102. Kastan, M.B.; Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **2004**, *432*, 316–323. [\[CrossRef\]](#)
103. Sherman, M.H.; Kuraishy, A.I.; Deshpande, C.; Hong, J.S.; Cacalano, N.A.; Gatti, R.A.; Manis, J.P.; Damore, M.A.; Pellegrini, M.; Teitell, M.A. AID-Induced Genotoxic Stress Promotes B Cell Differentiation in the Germinal Center via ATM and LKB1 Signaling. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 873–885. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Gaudio, E.; Spizzo, R.; Paduano, E.; Luo, Z.; Efanov, A.; Palamarchuk, A.; Leber, A.S.; Kaou, M.; Zanesi, N.; Bottoni, A.; et al. Tcl1 interacts with Atm and enhances NF- $\kappa$ B activation in hematologic malignancies. *Blood* **2012**, *119*, 180–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Grosjean-Raillard, J.; Tailler, M.; Adès, L.; Perfettini, J.L.; Fabre, C.; Braun, Y.; De Botton, S.; Fenaux, P.; Kroemer, G. ATM mediates constitutive NF- $\kappa$ B activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* **2009**, *28*, 1099–1109. [\[CrossRef\]](#)
106. Fukushima, N.; Satoh, Y.; Sueoka, N.; Sato, A.; Ide, M.; Hisatomi, T.; Kuwahara, N.; Tomimasu, R.; Tsuneyoshi, N.; Funai, N.; et al. Clinico-pathological characteristics of p63 expression in B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 1050–1055. [\[CrossRef\]](#)
107. Gaudio, E.; Paduano, E.; Pintor, S.; D'Agostino, S.; Rocca, R.; Costa, G.; Ngankeu, A.; Aqeilan, R.L.; Croce, C.M.; Bertoni, E.; et al. TCL1A interacts with TP63 and enhances the survival of Raji Burkitt lymphoma cell line. *Br. J. Haematol.* **2017**, *183*, 509–512. [\[CrossRef\]](#)
108. Jellusova, J.; Cato, M.H.; Apgar, J.R.; Ramezani-Rad, P.; Leung, C.R.; Chen, C.; Richardson, A.D.; Conner, E.M.; Benschop, R.J.; Woodgett, J.R.; et al. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 303–312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Köhler, S.; Havranek, O.; Seyfried, F.; Hurtz, C.; Coffey, G.P.; Kim, E.; Hacken, E.T.; Jäger, U.; Vanura, K.; O'Brien, S.; et al. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* **2016**, *30*, 1246–1254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Brunn, G.J.; Williams, J.; Sabers, C.; Wiedemacht, G.; Lawrence, J.C.; Abraham, R.T. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5256–5267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Navé, B.T.; Ouwers, D.M.; Withers, D.J.; Alessi, D.R.; Shepherd, P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: Identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 427–431. [\[CrossRef\]](#)
112. Bichi, R.; Shinton, S.A.; Martin, E.S.; Koval, A.; Calin, G.A.; Cesari, R.; Russo, G.; Hardy, R.R.; Croce, C.M. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6955–6960. [\[CrossRef\]](#)
113. DiLillo, D.J.; Matsushita, Y.; Tedder, T.F. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. New York Acad. Sci.* **2010**, *1183*, 38–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Kriss, C.L.; Pinilla-Ibarz, J.A.; Mailloux, A.W.; Powers, J.J.; Tang, C.H.A.; Kang, C.W.; Zanesi, N.; Epling-Burnette, P.K.; Sotomayor, E.M.; Croce, C.M.; et al. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood* **2012**, *120*, 1027–1038. [\[CrossRef\]](#)
115. Shen, R.R.; Ferguson, D.O.; Renard, M.; Hoyer, K.K.; Kim, U.; Hao, X.; Alt, F.W.; Roeder, R.G.; Morse, H.C.; Teitell, M.A. Dysregulated TCL1 requires the germinal center and genome instability for mature B-cell transformation. *Blood* **2006**, *108*, 1991–1998. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Herling, M.; Patel, K.A.; Weit, N.; Lilienthal, N.; Hallek, M.; Keating, M.J.; Jones, D. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2009**, *114*, 4675–4686. [\[CrossRef\]](#)
117. Muramatsu, M.; Kinoshita, K.; Fagarasan, S.; Yamada, S.; Shinkai, Y.; Honjo, T. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* **2000**, *102*, 553–563. [\[CrossRef\]](#)
118. Klein, U.; Yu, Y.; Stolovitzky, G.A.; Keller, J.L.; Haddad, J.; Miljkovic, V.; Cattoretti, G.; Califano, A.; Dalla-Favera, R. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2639–2644. [\[CrossRef\]](#)
119. Minnich, M.; Tagoh, H.; Bönel, P.; Axelsson, E.; Fischer, M.; Cebolla, B.; Tarakhovskiy, A.; Nutt, S.L.; Jaritz, M.; Busslinger, M. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 331–343. [\[CrossRef\]](#)
120. Shaffer, A.; Shapiro-Shelef, M.; Iwakoshi, N.N.; Lee, A.-H.; Qian, S.-B.; Zhao, H.; Yu, X.; Yang, L.; Yan, B.K.; Rosenwald, A.; et al. XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **2004**, *21*, 81–93. [\[CrossRef\]](#)
121. Hu, C.-C.A.; Dougan, S.K.; McGehee, A.M.; Love, J.C.; Ploegh, H.L. XBP1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1624–1636. [\[CrossRef\]](#)



122. Omori, S.A.; Cato, M.H.; Anzelon-Mills, A.; Puri, K.D.; Shapiro-Shelef, M.; Calame, K.; Rickert, R.C. Regulation of Class-Switch Recombination and Plasma Cell Differentiation by Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Immunity* **2006**, *25*, 545–557. [\[CrossRef\]](#)
123. Setz, C.S.; Hug, E.; Khadour, A.; Abdelrasoul, H.; Bilal, M.; Hobeika, E.; Jumaa, H. PI3K-Mediated Blimp-1 Activation Controls B Cell Selection and Homeostasis. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 391–405. [\[CrossRef\]](#)
124. Belletti, B.; Prisco, M.; Morrione, A.; Valentini, B.; Navarro, M.; Baserga, R. Regulation of Id2 Gene Expression by the Insulin-like Growth Factor I Receptor Requires Signaling by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13867–13874. [\[CrossRef\]](#)
125. Gonda, H.; Sugai, M.; Nambu, Y.; Katakai, T.; Agata, Y.; Mori, K.J.; Yokota, Y.; Shimizu, A. The Balance Between Pax5 and Id2 Activities Is the Key to AID Gene Expression. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1427–1437. [\[CrossRef\]](#)
126. Medvedovic, J.; Ebert, A.; Tagoh, H.; Busslinger, M. Pax5: A Master Regulator of B Cell Development and Leukemogenesis. *Adv. Immunol.* **2011**, *11*, 179–206.
127. Yan, X.-J.; Albesiano, E.; Zanesi, N.; Yancopoulos, S.; Sawyer, A.; Romano, E.; Petlickovski, A.; Efremov, D.G.; Croce, C.M.; Chiorazzi, N. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11713–11718. [\[CrossRef\]](#)
128. Lampropoulou, V.; Hoehlig, K.; Roch, Y.; Neves, P.; Gómez, E.C.; Sweeney, C.H.; Hao, Y.; Freitas, A.A.; Steinhoff, U.; Anderton, S.M.; et al. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4763–4773. [\[CrossRef\]](#)
129. Yanaba, K.; Bouaziz, J.-D.; Matsushita, T.; Tsubata, T.; Udder, I.F. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 7459–7472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
130. Matsumoto, M.; Fujii, Y.; Baba, A.; Hikida, M.; Kurosaki, T.; Baba, Y. The Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Control B Cell Regulatory Function through Interleukin-10 Production. *Immunity* **2011**, *34*, 703–714. [\[CrossRef\]](#)
131. Schweighoffer, E.; Nys, J.; Vaneš, L.; Smithers, N.; Tybulewicz, V.L. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 1269–1280. [\[CrossRef\]](#)
132. Matsushita, T.; Le Huu, D.; Kobayashi, T.; Hamaguchi, Y.; Hasegawa, M.; Naka, K.; Hirao, A.; Muramatsu, M.; Takehara, K.; Fujimoto, M. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 1170–1182. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Jin, G.; Hamaguchi, Y.; Matsushita, T.; Hasegawa, M.; Le Huu, D.; Ishiura, N.; Naka, K.; Hirao, A.; Takehara, K.; Fujimoto, M. 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.* **2013**, *131*, 1674–1682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Liu, M.; Zhao, X.; Ma, Y.; Zhou, Y.; Deng, M.; Ma, Y. Transcription factor c-Maf is essential for IL-10 gene expression in B cells. *Scand. J. Immunol.* **2018**, *88*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
135. Matsumoto, M.; Baba, A.; Yokota, T.; Nishikawa, H.; Ohkawa, Y.; Kayama, H.; Kallies, A.; Nutt, S.L.; Sakaguchi, S.; Takeda, K.; et al. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* **2014**, *41*, 1040–1051. [\[CrossRef\]](#)
136. Maurer, U.; Charvet, C.; Wagman, A.S.; Dejardin, E.; Green, D.R. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 749–760. [\[CrossRef\]](#)
137. Hill, E.V.; Ng, Y.H.S.; Burton, B.R.; Oakley, C.M.; Malik, K.; Wraith, D.C. Glycogen synthase kinase-3 controls IL-10 expression in CD4+ effector T-cell subsets through epigenetic modification of the IL-10 promoter. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 1103–1115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
138. Cheng, H.; Wang, L.; Yang, B.; Li, D.; Wang, X.; Liu, X.; Tian, N.; Huang, Q.; Feng, R.; Wang, Z.; et al. Cutting Edge: Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity Induces the Generation and Enhanced Suppressive Function of Human IL-10+ FOXP3+ Induced Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1497–1502. [\[CrossRef\]](#)
139. Bibby, J.A.; Purvis, H.A.; Hayday, T.; Chandra, A.; Okkenhaug, K.; Rosenzweig, S.; Aksentijevich, I.; Wood, M.; Lachmann, H.J.; Kemper, C.; et al. Cholesterol metabolism drives regulatory B cell IL-10 through provision of geranylgeranyl pyrophosphate. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3412. [\[CrossRef\]](#)
140. Wang, Y.-H.; Tsai, D.-Y.; Ko, Y.-A.; Yang, T.-Y.; Lin, I.-Y.; Hung, K.-H.; Lin, K.-I. Blimp-1 Contributes to the Development and Function of Regulatory B Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1909. [\[CrossRef\]](#)
141. Zhou, K.; Zhong, Q.; Wang, Y.C.; Xiong, X.Y.; Meng, Z.Y.; Zhao, Y.; Zhu, W.-Y.; Liao, M.-F.; Wu, L.-R.; Yang, Y.-R.; et al. Regulatory T cells ameliorate intracerebral hemorrhage-induced inflammatory injury by modulating microglia/macrophage polarization through the IL-10/GSK3 $\beta$ /PTEN axis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 967–979. [\[CrossRef\]](#)
142. Zouali, M. Transcriptional and metabolic pre-B cell receptor-mediated checkpoints: Implications for autoimmune diseases. *Mol. Immunol.* **2014**, *62*, 315–320. [\[CrossRef\]](#)
143. Alvarez, Y.; Municio, C.; Alonso, S.; Crespo, M.S.; Fernández, N. The Induction of IL-10 by Zymosan in Dendritic Cells Depends on CREB Activation by the Coactivators CREB-Binding Protein and TORC2 and Autocrine PGE2. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 1471–1479. [\[CrossRef\]](#)
144. Clark, K.; MacKenzie, K.F.; Petkevicius, K.; Kristariyanto, Y.; Zhang, J.; Choi, H.G.; Pegg, M.; Plater, L.; Pedrioli, P.G.A.; McIver, E.; et al. Phosphorylation of CRTCL3 by the salt-inducible kinases controls the interconversion of classically activated and regulatory macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16986–16991. [\[CrossRef\]](#)

145. MacKenzie, K.F.; Clark, K.; Naqvi, S.; McGuire, V.; Nöehnen, G.; Kristariyanto, Y.; Bosch, M.V.D.; Mudaliar, M.; McCarthy, P.C.; Pattison, M.J.; et al. PGE2 Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A-SIK-CRTC3 Pathway. *J. Immunol.* **2012**, *190*, 565–577. [[CrossRef](#)]
146. Katoh, Y.; Takemori, H.; Lin, X.-Z.; Yamura, M.; Muraoka, M.; Satoh, T.; Tsuchiya, Y.; Min, L.; Doi, J.; Miyauchi, A.; et al. Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. *FEBS J.* **2006**, *273*, 2730–2748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Sreanor, R.A.; Conkright, M.D.; Katoh, Y.; Best, J.L.; Canetti, G.; Jeffries, S.; Guzman, E.; Niessen, S.; Yates III, J.R.; Takemori, H.; et al. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* **2004**, *119*, 61–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Bittinger, M.A.; McWhinnie, E.; Meltzer, J.; Iourgenko, V.; Latario, B.; Liu, X.; Chen, C.H.; Song, C.; Garza, D.; Labow, M. Activation of cAMP Response Element-Mediated Gene Expression by Regulated Nuclear Transport of TORC Proteins. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 2156–2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Hashimoto, Y.K.; Satoh, T.; Okamoto, M.; Takemori, H. Importance of autophosphorylation at Ser186 in the A-loop of salt inducible kinase 1 for its sustained kinase activity. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 1724–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Alhakeem, S.; Sindhava, V.J.; McKenna, M.K.; Gachuki, B.W.; Byrd, J.C.; Muthusamy, N.; Bondada, S. Role of B cell receptor signaling in IL-10 production by normal and malignant B-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1362*, 239–249. [[CrossRef](#)]
151. Alhakeem, S.; McKenna, M.K.; Oben, K.Z.; Noothi, S.K.; Rivas, J.R.; Hildebrandt, G.C.; Fleischman, R.A.; Rangnekar, V.M.; Muthusamy, N.; Bondada, S. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 4180–4189. [[CrossRef](#)]
152. Aguiar, R.C.T.; Yakushijin, Y.; Kharbanda, S.; Tiwari, S.; Freeman, G.J.; Shipp, M.A. PTPROT: An alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood* **1999**, *94*, 2403–2413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Chen, L.; Juszczyński, P.; Takeyama, K.; Aguiar, R.C.T.; Shipp, M.A. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood* **2006**, *108*, 3428–3433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Motiwala, Y.; Datta, J.; Kutay, H.; Roy, S.; Jacob, S.T. Lyn kinase and ZAP70 are substrates of PTPROT in B-cells: Lyn inactivation by PTPROT sensitizes leukemia cells to VEGF-R inhibitor pazopanib. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *110*, 846–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Motiwala, Y.; Zanesi, N.; Datta, J.; Roy, S.; Kutay, H.; Checovich, A.M.; Kaou, M.; Zhong, Y.; Johnson, A.J.; Lucas, D.M.; et al. AP-1 elements and YCL1 protein regulate expression of the gene encoding protein tyrosine phosphatase PTPROT in leukemia. *Blood* **2011**, *118*, 6132–6140. [[CrossRef](#)]
156. Motiwala, Y.; Kutay, H.; Zanesi, N.; Frisora, F.W.; Mo, X.; Muthusamy, N.; Jacob, S.T. PTPROT-mediated regulation of p53/Foxm1 suppresses leukemic phenotype in a CLL mouse model. *Leukemia* **2015**, *29*, 1350–1359. [[CrossRef](#)]
157. Wakim, J.; Arman, E.; Becker-Herman, S.; Kramer, M.P.; Bakos, E.; Shachar, I.; Elson, A. The PTPROT tyrosine phosphatase functions as an obligate haploinsufficient tumor suppressor in vivo in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **2017**, *36*, 3686–3694. [[CrossRef](#)]
158. Iwata, Y.; Matsushita, T.; Horikawa, M.; DiLillo, D.J.; Yanaba, K.; Venturi, G.M.; Szabolcs, P.M.; Bernstein, S.H.; Magro, C.M.; Williams, A.D.; et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **2011**, *117*, 530–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Titre :** Implication des cellules B dans l'homéostasie du système immunitaire en transplantation rénale

**Mots clés :** transplantation rénale, tolérance, cellule B, TCL1A

**Résumé :** La transplantation rénale est le traitement de référence de l'insuffisance rénale terminale. Les progrès en terme d'immunosuppression et de prise en charge permettent aujourd'hui une bonne survie à court terme des greffons avec la volonté d'améliorer les résultats sur le long terme. L'étude du système immunitaire chez des receveurs présentant une stabilité durable de leur fonction rénale, peut permettre l'identification de biomarqueurs et de populations cellulaires clés dans la survie du greffon, utiles à la création de nouveaux éléments de diagnostics et de traitements pour la survie à long terme des greffons. Les cellules B ont été montrées comme associées à l'état de tolérance opérationnelle en transplantation rénale défini par la stabilité durable du greffon en l'absence de traitement immunosupresseur.

Dans ce travail, le phénotypage des cellules B de patients stables à long terme avec et sans traitement immunosupresseur a permis de mettre en évidence chez les patients traités une proportion accrue de cellules B CD11c<sup>+</sup> évoquant une activation chronique de la réponse immunitaire, et parallèlement, une proportion accrue de B totaux et de B naïfs TCL1A<sup>low</sup> chez les patients tolérants, dont le profil évoque une possible participation à la quiescence de la réponse immunitaire de ces patients. L'émergence d'une telle population de cellules B chez les patients tolérants n'a encore jamais été décrite mais elle est cohérente avec les connaissances établies. Sa caractérisation pourrait permettre d'avancer dans la compréhension du phénotype de tolérance ainsi que la mise en évidence de nouveaux outils diagnostics et thérapeutiques.

**Title :** B cells involvement in immune system homeostasis in kidney transplantation

**Keywords :** kidney transplantation, tolerance, B cell, TCL1A

**Abstract:** Renal transplantation is the gold standard treatment for end-stage renal disease. Advances in immunosuppression and management now enable good short-term graft survival, with the aim of improving long-term outcomes. The study of the immune system in recipients with long-term stable renal function may enable the identification of biomarkers and key cell populations in graft survival, useful for the creation of new diagnostic and therapeutic elements for long-term graft survival. B cells have been shown to be associated with the state of operational tolerance in kidney transplantation, defined as lasting graft stability in the absence of immunosuppressive therapy. In this work, phenotyping of B cells from long-term stable patients with and without

immunosuppressive treatment revealed an increased proportion of CD11c<sup>+</sup> B cells in treated patients, suggesting chronic activation of the immune response, and, in parallel, an increased proportion of total B cells and naive TCL1A<sup>low</sup> B cells in tolerant patients, whose profile suggests a possible participation in quiescence of the immune response in these patients. The emergence of such a B cell population in tolerant patients has yet never been described, but is consistent with established knowledge. Its characterization could lead to advances in our understanding of the tolerance phenotype, as well as the development of new diagnostic and therapeutic tools.