

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Florian DUBOIS

Caractérisation et génération des lymphocytes B régulateurs à partir de cellules souches pluripotentes

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 22 Juin 2020
Unité de recherche : CRTI, INSERM UMR 1064
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Nuala Mooney Directeur de recherche, Institut de Recherche Saint Louis, Paris
Flora Zavala Directeur de recherche, Institut Necker Enfants Malades, Paris

Composition du Jury :

| | | |
|-----------------|-----------------|--|
| Président : | Dany Anglicheau | PU-PH, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris |
| Examineurs : | Sophie Hillion | MCU-PH, Université Bretagne Occidentale, Brest |
| | Dany Anglicheau | PU-PH, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris |
| Dir. de thèse : | Sophie Brouard | Directeur de recherche, CRTI, Nantes |
| Co-encadrant : | Richard Danger | Post-doctorant, CRTI, Nantes |

À mes parents
À mes frangins

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Régis Josien pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U1064 du CRTI et les Dr Flora Zavala et Olivier Thaunat pour leur participation à mes comités de thèse.

Durant ces années de thèse j'ai eu la chance de travailler avec le Dr Sophie Brouard qui a encadré ce projet. Je te remercie vivement Sophie pour m'avoir toujours guidé et soutenu et ainsi d'avoir permis le bon déroulement de ce projet. Merci aussi pour ta disponibilité, pour la qualité de la formation scientifique que tu m'as apportée et surtout pour ta patience à toutes épreuves. Cela fait plus de 5 ans que l'on travaille ensemble, depuis mon premier stage de M1 et j'ai toujours apprécié ton encadrement et ta bienveillance. J'ai vraiment adoré étudié les Tregs, Tfh et Bregs en transplantation, merci pour toute cette richesse scientifique !

J'ai également eu la chance de travailler avec Richard Danger, mon mentor en bio-informatique mais aussi mon co-encadrant. Apprendre et être formé par tes soins sur R, et tous les outils qui y sont associés, était un réel plaisir. Merci pour tous tes conseils, ta disponibilité et ton soutien. Je referais bien un ou deux tests de normalisation !

Je remercie toute l'équipe du projet IPS, Laurent David, Sophie Conchon et Fabienne Haspot pour avoir porté et dirigé ce projet avec nous. Mais aussi Laurent Tesson et Jean-Marie Heslan de la plateforme GenoCellEdit pour le design des outils CRISPR/Cas9 et leurs conseils avisés.

Je remercie toutes les personnes de la plateforme IPS qui m'ont aidé à avancer dans ce projet et aux cotés de qui j'ai appris les ficelles de la différenciation. Merci vivement à Anne qui m'a fourni les meilleures cellules et à Léa pour m'avoir prêté mains fortes en cas de coups dur.

Je remercie tous mes collègues du laboratoire avec qui c'était un plaisir de travailler au quotidien. À tous mes collègues doctorants, mais également à Sarah et Mélanie qui étaient toujours présentes pour une boutade ou deux !

Merci à toute l'équipe 4 et notamment Mélanie et Ludmilla pour leur aide multiple tout au long de ma thèse, ce fut un plaisir de travailler avec vous sur les Bregs.

Remerciement spécial pour Alexandra qui a toujours été là pour les moindres questions et vers qui j'ai pu me tourner pour tous problèmes au labo.

REMERCIEMENTS

A Jérémy, cet Homme mi-médecin, ce fut un plaisir d'échanger avec toi sur de grands sujets, tu étais un super camarade, bon courage à toi pour la suite de ton cursus !

À Cha-Cha, c'était super de t'avoir comme voisine de bureau, c'est passé tellement vite depuis notre emménagement dans le coin hivernal ! Je te souhaite le meilleur pour ta famille et pour la poursuite de ta carrière.

À mes voisins du bel open space. Merci Aurore pour tes touches décoratives, j'espère que la baleine sera toujours fièrement exposée ! Kévin, Marion et Alice, vous en avez fait un bordel c'était un plaisir de partager ce ZOO avec vous ;)

Aux 3 lurons, Pierre, Malo et Alex avec qui c'était un plaisir de partager nos passions respectives pour la musique, les jeux et surtout les boissons houblonnées autour d'une flèche ! Je vous souhaite le meilleur les gars.

Un grand thanks à Maxim et Carole qui m'ont beaucoup aidé en début de thèse.

Tiens tiens tiens, voilà my beda, mon camarade de culture, que de partage entre les joies d'une diff pas trop mal gérée et la déception des autres. On en a raconté des conneries et je vais reprendre tes mots, t'étais le pire ! J'espère le mieux pour toi, je ne me fais pas de trop de soucis pour ça, you know di way. À Malika, toujours présente, et le mot est pesé, merci beaucoup pour toute ton aide ! Que c'était bien travailler à vos côtés, je regrette de ne pas avoir débarqué plus tôt dans cette merveilleuse salle de culture !

Merci à mes 2 Bro Anthony et Romu d'avoir suivi mon avancé dans la recherche et de m'avoir soutenu continuellement, vous êtes les meilleurs !

Je remercie également mes parents, mes frangins ainsi que toute ma famille qui ont été là, derrière moi, et m'ont soutenu au quotidien. Sans vous jamais je ne serais arrivé là, merci d'avoir tout fait pour que j'y parvienne.

Enfin, à toi qui m'as encouragé, soutenu et à tout fait au quotidien pour que je réussisse quoi qu'il arrive. Depuis notre rencontre des plus improbable, merci d'avoir tenu bon alors que j'étais dans le rush de la deuxième année. Merci vivement à toute ta famille pour son soutien, c'était un environnement des plus agréable et chaleureux pour travailler. Aujourd'hui, ma thèse s'est bien achevée, et c'est grâce à toi qui était là et a embelli toutes mes journées. Je t'aime ma chérie.

AVANT-PROPOS

La transplantation rénale demeure la solution thérapeutique de choix dans de nombreuses pathologies et est l'ultime traitement en cas d'insuffisance rénale au stade terminale. Avec 90 306 transplantations rénales réalisées en 2017 à travers le monde (3 567 en France en 2018), la greffe de rein représente 2/3 des transplantations d'organe solide totales (Newsletter Transplant 2019). Malgré les améliorations chirurgicales et des traitements d'inductions pré-greffe et immunosuppresseurs post-greffe, le taux de rejet à 10 ans reste de 60% (Agence de la biomédecine). En effet, bien que les traitements immunosuppresseurs aient considérablement réduit le taux de rejets aigus, leur efficacité est modérée face à la mise en place d'une immunité adaptative et du rejet chronique. De plus, ces traitements immunosuppresseurs lourds pour les patients entraînent de nombreux effets indésirables tels que la néphrotoxicité à long terme, l'augmentation de l'incidence des infections et le développement de cancer viro-induits (Fishman, 2017; Stallone et al., 2009; Touraine and Traeger, 1987). Ainsi, le graal en transplantation serait la création d'une tolérance du receveur envers son greffon rénal qui le dispenserait de la prise de tels traitements.

Il existe justement de très rares patients qui gardent une fonction stable de leur greffon et ceci malgré l'absence de traitement immunosuppresseur, on parle alors de tolérance opérationnelle. Notre équipe travaille depuis plus de 10 ans sur ces patients tolérants transplantés rénaux afin d'identifier les mécanismes qui régissent cette tolérance opérationnelle. Ainsi, en s'appuyant sur leurs différences avec les patients transplantés rénaux stables sous traitement immunosuppresseur et des volontaires sains, nous avons identifié une signature lymphocytaire B particulière. En effet, les patients tolérants présentent un défaut de différenciation des lymphocytes B (Chesneau et al., 2014) ainsi qu'un nombre plus élevé de lymphocytes B exprimant le granzyme B (GZMB⁺) dans leur sang périphérique (Chesneau et al., 2015) comparés aux patients stables et aux volontaires sains. De plus, ces lymphocytes B GZMB⁺ présentent une fonction suppressive envers des lymphocytes T activé *in vitro* qui est en partie dépendante du GZMB et du contact entre le lymphocyte B et sa cible. Ces lymphocytes B régulateurs (Bregs) GZMB⁺, qui ne représentent qu'un sous-type de la famille des lymphocytes B régulateurs, ont été décrits dans d'autres pathologies notamment en cancérologie (Jahrsdorfer et al., 2006; Lindner et al., 2013), en virologie (Kaltenmeier et al.,

2015) et en auto-immunité (Hagn et al., 2010). Etant donné leur fort pouvoir régulateur et leur large champ d'intérêt, les Bregs GZMB⁺ présentent un fort potentiel d'utilisation en clinique.

Lors de ma thèse, j'ai étudié les lymphocytes B régulateurs GZMB⁺ avec pour objectif de les amener vers une utilisation en clinique. Malgré leur capacité d'expansion *in vitro*, les Bregs GZMB⁺ ne perdurent pas longtemps et voient leurs fonctions régulatrices diminuer rapidement en culture. C'est à partir de ces notions que j'ai développé mon projet consistant à générer des Bregs GZMB⁺ avec une expression répressible du GZMB à partir de cellules souches pluripotentes (hPSC). J'ai ainsi i) travaillé sur la génération de lymphocytes B à partir de cellules souches pluripotentes et ii) mis au point les outils de génie génétique permettant l'expression constitutive et répressible du GZMB.

Différents types de lymphocytes B régulateurs sont décrits dans plusieurs pathologies avec différents mécanismes de suppression. Cependant, aucun phénotype commun ni facteur de transcription n'ont été mis en évidence ce qui rend leur étude compliquée. C'est pourquoi j'ai réalisé une méta-analyse de toutes les données transcriptomiques chez l'Homme et chez la souris comparant les lymphocytes B régulateurs aux lymphocytes B non-régulateurs afin de mieux les caractériser et d'identifier une signature commune des Bregs.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| AVANT-PROPOS | 3 |
| SOMMAIRE | 5 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 7 |
| LISTE DES FIGURES | 8 |
| LISTE DES TABLEAUX | 9 |
| INTRODUCTION | 10 |
| I. Les lymphocytes B régulateurs | 10 |
| 1) La mise en évidence des Bregs | 11 |
| 2) Les fonctions des Bregs | 14 |
| a) Leurs implications cliniques..... | 14 |
| i. Auto-immunité | 14 |
| ii. Infection | 17 |
| iii. Allergie..... | 18 |
| iv. Transplantation | 19 |
| v. Cancer..... | 20 |
| b) Les mécanismes d'action des Bregs | 22 |
| i. La production de cytokines..... | 22 |
| ii. Le contact cellulaire..... | 23 |
| iii. L'induction de Tregs..... | 24 |
| c) La caractérisation des Bregs..... | 26 |
| 3) Ontogénie des lymphocytes B régulateurs | 29 |
| a) L'activation des Bregs | 29 |
| b) Modèles de développement des Bregs | 34 |
| II. L'hématopoïèse | 39 |
| 1) La mise en place de l'hématopoïèse au stade embryonnaire..... | 39 |
| a) L'embryogenèse | 39 |
| b) L'hématopoïèse primitive..... | 41 |
| c) L'hématopoïèse définitive | 41 |

| | |
|--|------------|
| 2) L'hématopoïèse chez l'adulte..... | 43 |
| a) Les cellules souches hématopoïétiques | 43 |
| b) Les modèles de différenciation hématopoïétique | 46 |
| i. Le modèle classique..... | 46 |
| ii. Révision du modèle classique | 47 |
| 3) Les modèles de différenciation hématopoïétique <i>in vitro</i> | 49 |
| a) Les cellules souches pluripotentes | 49 |
| i. Les différents types de cellules souches | 49 |
| ii. Les cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines (hESC) | 50 |
| iii. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) | 51 |
| b) Les modèles de différenciation hématopoïétique <i>in vitro</i> | 53 |
| i. Coculture avec des cellules stromales | 53 |
| ii. Formation de corps embryonnaires..... | 53 |
| 4) La lymphopoïèse B..... | 55 |
| a) Les progéniteurs des lymphocytes B | 55 |
| b) Les mécanismes de la lymphopoïèse B | 58 |
| i. Les niches hématopoïétiques | 58 |
| ii. Les facteurs intracellulaires | 61 |
| OBJECTIFS DE LA THÈSE | 64 |
| RÉSULTATS | 66 |
| I. Génération de Bregs GZMB⁺ à partir d'hiPSC..... | 66 |
| 1) Article n°1 | 66 |
| 2) Intégration de l'expression du GZMB dans les hiPSC..... | 93 |
| a) Matériel et méthodes..... | 93 |
| b) Résultats | 94 |
| i. Etape du KO pour le gène GZMB | 94 |
| ii. Etape de l'insertion de la cassette d'expression du GZMB | 100 |
| iii. Conclusions..... | 102 |
| II. Article n°2 | 103 |
| DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES..... | 143 |
| ANNEXES | 157 |
| RÉFÉRENCES | 158 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------|---|
| ABM | Agence de biomédecine |
| AGM | Aorta-Gonad-Mesonephros |
| AhR | Aryl-hydrocarbon receptor |
| AICD | Activation-induced cell death |
| Bregs | Lymphocytes B régulateurs |
| CFC | Colony forming cell |
| CIA | Arthrite induite par le collagène |
| CLP | Progéniteurs communs à la lignée lymphoïde |
| CMP | Progéniteurs communs à la lignée myéloïde |
| CpG ODN | CpG oligodeoxynucleotides |
| CSH | Cellules souches hématopoïétiques |
| CTD | Cancers thyroïdiens différenciés |
| DC | Cellules dendritiques |
| EAE | Encéphalomyélite auto-immune expérimentale |
| EAU | Uvéite auto-immune expérimentale |
| EB | Corps embryonnaires |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GvHD | Maladie du greffon contre l'hôte |
| GZMB | Granzyme B |
| HE | Hemogenic Endothelium |
| HEA | Albumine d'œuf de poule |
| hESC | Cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines |
| hiPSC | Cellules souches pluripotentes induites humaines |
| hPSC | Cellules souches pluripotentes humaines |
| HV | Volontaires sains |
| IFN- γ | Interféron gamma |
| IgH | Chaines lourdes des immunoglobulines |
| IgH | Chaines légère des immunoglobulines |
| KO | Knock-out |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M6P | Mannose-6-phosphate |
| M-CSF | Macrophage colony stimulating factor |
| MOG | Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein |
| MPP | Progéniteurs multipotents |
| NOD | Nonobese diabetic |
| PABA | Para-aminobenzoic acid |
| Pb | Paires de base |
| SEP | Sclérose en plaque |
| TLSP | Thymic stromal lymphopietin |
| TNF- α | Tumor necrosis factor alpha |
| Tregs | Lymphocytes T régulateurs |
| UCB | Sang de cordon umbilical |
| WT | Wild type |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Mécanismes immunosuppresseurs des Bregs | 26 |
| Figure 2 : Génération des Bregs aux cours de la différenciation des lymphocytes B | 38 |
| Figure 3 : Formation des 3 feuillets embryonnaires chez l'humain | 40 |
| Figure 4 : Modèle de génération des cellules hématopoïétiques par un intermédiaire endothélial HE | 43 |
| Figure 5 : Division asymétrique des cellules souches | 44 |
| Figure 6 : Hématopoïèse : modèle classique | 47 |
| Figure 7 : Différenciation hématopoïétique : révision du modèle classique | 48 |
| Figure 8 : Les différents types de cellules souches | 50 |
| Figure 9 : Les cellules souches pluripotentes et la génération de modèles pathologiques | 51 |
| Figure 10 : Différenciation hématopoïétique <i>in vitro</i> à partir de cellules souches pluripotentes | 54 |
| Figure 11 : Les différents stades et facteurs de la lymphopoïèse B..... | 55 |
| Figure 12 : La moelle osseuse contient les niches hématopoïétiques..... | 59 |
| | |
| Résultats 1 - Figure 1 : Schéma de la réalisation du KO du <i>GZMB</i> endogène..... | 95 |
| Résultats 1 - Figure 2 : Séquençage de l'exon 2 du <i>GZMB</i> des hPSC | 96 |
| Résultats 1 - Figure 3 : Génération du plasmide CRIPS/Cas9..... | 98 |
| Résultats 1 - Figure 4 : Design de l'oligonucléotide | 99 |
| Résultats 1 - Figure 5 : Transfection des hPSC avec un plasmide contrôle..... | 100 |
| Résultats 1 - Figure 6 : Insertion d'un système Tet-Off pour une expression réversible du GZMB | 101 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Identification des Bregs chez la souris..... | 28 |
| Tableau 2: Identification des Bregs chez l'Homme | 29 |
| Tableau 3 : Mécanismes d'activation des Bregs | 33 |

INTRODUCTION

I. Les lymphocytes B régulateurs

Le système immunitaire dispose de mécanismes complexes et finement régulés afin de maintenir l'équilibre sain de l'organisme. Lorsque ce dernier est infecté par un pathogène (bactérie, virus, parasite ou champignon), la réponse immunitaire se met en place et entraîne l'activation et la prolifération des cellules immunitaires qui deviennent capables d'éliminer le pathogène sur son lieu d'infection. Cependant, cette prolifération cellulaire doit être contrôlée pendant la réponse immunitaire, et après lorsque l'inflammation se résorbe pour revenir à l'état d'homéostasie. En effet, une prolifération exacerbée des cellules immunitaires est problématique et pathologique si elle persiste car elle conduit à une inflammation chronique avec l'accumulation des produits de la réponse effectrice qui deviennent néfastes pour l'organisme. C'est le cas des anticorps et des cytokines pro-inflammatoires qui soutiennent l'inflammation et entraînent une fibrose.

Les processus régissant l'homéostasie sont multiples et indispensables pour maintenir un équilibre sain. Ils peuvent être intrinsèques aux populations effectrices qui s'autorégulent par contact cellulaire au moyen de récepteurs de mort qui induisent leur apoptose (AICD). Mais aussi extrinsèques, en faisant intervenir des populations cellulaires spécifiques dont le rôle est la régulation de la réponse immunitaire. Les premières cellules régulatrices ayant été observées sont les lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4⁺ qui ont la particularité d'exprimer le facteur de transcription FOXP3 (Sakaguchi et al., 2008). Certaines cellules dendritiques, qualifiées de tolérogènes, et certains macrophages présentent également des rôles immunosuppresseurs (Di Benedetto et al., 2019; Hu and Wan, 2011). Enfin, bien que les lymphocytes B soient connus pour leur fonction de production d'anticorps et de présentation d'antigènes aux lymphocytes T, certains lymphocytes B présentent un rôle régulateur de la réponse immunitaire. Dans ce travail de thèse, nous focalisons nos études sur ces lymphocytes B régulateurs (Bregs).

1) La mise en évidence des Bregs

La présence de lymphocytes B au pouvoir régulateur a été mise en évidence pour la première fois en 1974 par Katz *et al.* dans un modèle d'hypersensibilité retardée chez le cochon d'Inde (Katz et al., 1974). Dans ce modèle, ils ont injecté de la cyclophosphamide à des cochons d'Inde receveurs, qui entraîne une déplétion des lymphocytes B sans altérer les lymphocytes T, 3 jours avant leur sensibilisation par injection d'ovalbumine. 8 jours après cette sensibilisation, un transfert adoptif de cellules spléniques provenant de cochons d'Inde sensibilisés à l'ovalbumine est réalisé chez les cochons d'Inde receveurs. Katz *et al.* ont montré que ce transfert adoptif supprime la réponse cutanée retardée de la même manière que le transfert de cellules spléniques enrichies à 20% en lymphocytes B. Cependant, le transfert de cellules spléniques déplétées en lymphocytes B ne permet pas de supprimer cette réponse, montrant ainsi l'importance des lymphocytes B dans la suppression de l'hypersensibilité retardée. Neta et Salvin ont également mis en évidence en 1974, un rôle suppresseur des lymphocytes B dans un modèle d'hypersensibilité retardée chez le cochon d'Inde (Neta and Salvin, 1974). La sensibilisation par injection de PABA (para-aminobenzoic acid) conjugué au HEA (albumine d'œuf de poule) entraîne une hypersensibilité retardée qui est naturellement réduite chez le cochon d'Inde. Neta et Salvin ont réalisé des expériences de transfert adoptif pour mieux comprendre cette diminution de l'hypersensibilité retardée. Dans leur étude, les cochons d'Inde donneurs sont préalablement sensibilisés par injection du conjugué PABA-HEA. Les cochons d'Inde receveurs sont sensibilisés par injection de HEA 4 jours avant le transfert adoptif de lymphocytes des cochons d'Inde donneurs. Une injection intradermique est réalisée 1 jour après le transfert adoptif pour analyser la réponse cutanée retardée. Dans ces expériences, ils ont montré que le transfert de lymphocytes de la rate, qui sont majoritairement des lymphocytes B, entraîne une diminution de la réponse cutanée retardée contrairement au transfert de lymphocytes d'exsudat péritonéal qui sont majoritairement des lymphocytes T (Neta and Salvin, 1974). De plus, ils ont montré que l'injection préalable de cyclophosphamide, qui entraîne une déplétion des lymphocytes B sans altérer les lymphocytes T, induit une persistance de l'hypersensibilité retardée après sensibilisation par injection de HEA. Ces résultats ont donc mis en évidence l'importance des lymphocytes B dans la suppression de l'hypersensibilité retardée.

L'activité régulatrice des lymphocytes B a ensuite été suggérée en 1996 par Wolf *et al.* dans un modèle murin de sclérose en plaque (SEP) : l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Wolf *et al.*, 1996). Il s'agit d'une maladie auto-immune du système nerveux central caractérisée par des zones de démyélinisation et d'inflammation. Le modèle murin d'EAE peut être mis en place chez plusieurs souris, telles que les souris B10.PL, dont le fond génétique est susceptible de développer la maladie après injection de la protéine basique de myéline (MBP) en présence d'adjuvant CFA (Wolf *et al.*, 1996). Suite à cette immunisation, une réponse auto-immune des lymphocytes T est engagée conduisant à la démyélinisation. Puis, les souris entrent en rémission spontanément 7 à 10 jours après l'apparition des premiers symptômes (Martin *et al.*, 1992). Dans leurs travaux, Wolf *et al.* ont montré que les souris déficientes en lymphocytes B (souris μ MT) ne rentrent pas spontanément en rémission contrairement aux souris non déficientes, démontrant un rôle protecteur des lymphocytes B dans le modèle d'EAE (Wolf *et al.*, 1996).

Les travaux suivants ont consisté à décrire cette population de lymphocytes B capable de limiter l'action suppressive des lymphocytes T autoréactifs dans le modèle EAE. Fillatreau *et al.* ont confirmé que l'EAE fait intervenir une réponse T de type Th1 avec la présence de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α tandis que la rémission est associée à la production des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et plus particulièrement de l'IL-10 dont la production est dépendante du signal CD40-CD40L (Fillatreau *et al.*, 2002). En effet, une déficience en IL-10 (IL-10^{-/-}) chez les souris entraîne la même incapacité de rémission procurée par une déficience en lymphocytes B et la déficience en CD40 ne permet pas la production d'IL-10 en réponse à l'immunisation. De plus, ils ont montré que les splénocytes des souris déficientes en lymphocytes B produisent plus d'IFN- γ comparés aux splénocytes de souris non déficientes, 30 jours après l'induction de l'EAE, suggérant l'implication des lymphocytes B dans le contrôle de la réponse Th1. Enfin, ils ont réalisé des souris chimériques à partir de souris non déficientes qui ont été irradiées puis reconstituées avec de la moelle osseuse provenant à 80% de souris déficientes en lymphocytes B et à 20% de souris déficientes en IL-10 ou en CD40 (Fillatreau *et al.*, 2002). Ces deux modèles possèdent un compartiment en lymphocytes B totalement reconstitué et essentiellement IL-10^{-/-} ou CD40^{-/-} et ces souris ne présentent pas de rémission après induction de l'EAE. Ils ont ainsi montré que la présence de lymphocytes B seule ne suffit pas à la rémission de l'EAE mais que celle-ci nécessite l'apport du signal CD40

des lymphocytes B, et donc leur interaction avec les lymphocytes T, et leur production en IL-10.

Les lymphocytes B au pouvoir régulateur ont également été mis en évidence dans un modèle de colite chez la souris (Mizoguchi et al., 1997). Les souris knock-out (KO) pour le TCR α ont des lymphocytes T périphériques ne disposant pas d'un TCR complet mais d'un TCR $\alpha\beta^+$ ou d'un pre-TCR ce qui entraîne le développement spontané de cette maladie inflammatoire de l'intestin (Mombaerts et al., 1993). Il en est de même des souris KO pour l'IL-2 ou l'IL-10 et lorsque ces modèles sont déficients en lymphocytes B (après croisement avec des souris Ig μ^-), montrant ainsi que les lymphocytes B n'interviennent pas dans la phase d'induction du modèle de colite (Davidson et al., 1996; Ma et al., 1995). Les lymphocytes B présentent un rôle régulateur dans ce modèle car le croisement des souris TCR α^- avec les souris Ig μ^- est associé à des symptômes plus sévères que ceux des souris KO pour le TCR α uniquement (Mizoguchi et al., 1997). Dans leurs études suivantes, Mizoguchi *et al.* ont confirmé que les souris KO pour le CD1d (CD1DKO) ne développent pas de colite spontanément et ils montrent à l'inverse une colite chez les souris doubles KO pour le CD1d et le TCR α (α CD1DKO) (Mizoguchi et al., 2002). Les symptômes des souris α CD1DKO, sont semblables à ceux des souris simples KO TCR α KO, avec cependant une accélération dans leur progression après 6 mois. Cette progression plus sévère est marquée par une plus grande inflammation chez les souris α CD1DKO, comparée à celle des souris TCR α KO, avec ulcération et augmentation de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Les souris TCR α KO présentant une colite ont une up-régulation de l'expression de CD1d sur les lymphocytes B des ganglions mésentériques par rapport aux souris sans colite. Le transfert des lymphocytes B de ganglions mésentériques de souris TCR α KO chez une souris α CD1DKO irradiée permet de diminuer la sévérité des symptômes, tandis que le transfert de lymphocytes B provenant de ganglions mésentériques de souris CD1DKO ne le permet pas. Ces résultats montrent l'implication des lymphocytes B CD1d^{hi} dans le contrôle de la pathologie qui est médié par l'IL-10 car leur fonction régulatrice est inhibée par la neutralisation de l'IL-10 *in vivo* (Mizoguchi et al., 2002). Cette étude est la première à caractériser une population de lymphocytes B au pouvoir régulateur avec l'expression du marqueur CD1d^{hi} et à employer le terme de « lymphocytes B régulateurs ».

Chez l'homme, les Bregs ont été identifiés pour la première fois chez des patients atteints de sclérose en plaque (SEP) et infectés par un helminthe (Correale et al., 2008). Les patients SEP infectés par les helminthes présentent une meilleure évolution de leur pathologie qui est associée à un plus grand nombre de cellules produisant l'IL-10 comparés aux patients SEP non infectés (Correale and Farez, 2007). Correale *et al.* ont identifié ces cellules comme étant des Bregs producteurs d'IL-10 et exprimant plus fortement le CD1d en comparaison aux lymphocytes B IL-10⁻. Ils ont également étudié la réponse T envers le peptide MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) du système nerveux central dans des expériences de coculture entre lymphocytes T, préalablement stimulés par la présentation de MOG, et lymphocytes B autologues. Ils observent ainsi que la présence de lymphocytes B provenant de patients SEP infectés ou d'individus sains, inhibent la réponse T proliférative et sécrétrice d'IFN- γ , tandis que les lymphocytes B de patients SEP non infectés n'ont pas d'effet (Correale and Farez, 2007). De plus, cette inhibition par les Bregs est dépendante de l'IL-10 car le blocage de son expression par siRNA restaure la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T.

2) Les fonctions des Bregs

a) Leurs implications cliniques

Depuis leur découverte, les Bregs ont été identifiés dans plusieurs pathologies et utilisent différents mécanismes d'action.

i. Auto-immunité

Les processus de tolérance centrale qui ont lieu dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B et dans le thymus pour les lymphocytes T permettent d'éliminer la génération de lymphocytes spécifiques du soi. Cependant, certains lymphocytes autoréactifs parviennent à y échapper et les mécanismes de tolérance périphérique entrent en jeu pour empêcher leur activation. Parmi ces mécanismes, on distingue l'anergie qui empêche l'activation des lymphocytes, la délétion clonale et l'induction de cellules régulatrices. Un défaut de ces processus ou une régulation insuffisante d'une réponse lymphocytaire autoréactive conduit à de graves pathologies auto-immunes.

Les lymphocytes B régulateurs sont impliqués dans ces processus. En effet, dans le modèle murin EAE de la pathologie auto-immune SEP, une déficience en lymphocytes B et particulièrement en lymphocytes B IL-10^{-/-} entraîne une incapacité de rémission de la pathologie (Fillatreau et al., 2002). Les mécanismes des Bregs qui y sont associés sont la production d'IL-10 et de TGF- β qui induisent l'inhibition des réponses Th1 et Th17 et des capacités d'activation et de présentation des cellules dendritiques. En effet, l'inhibition de la réponse Th1 dans le modèle EAE est due aux Bregs CD1d^{hi}CD5⁺ qui inhibent la production d'IFN- γ par les lymphocytes T autoréactifs activés *in vitro* et cela, via leur production d'IL-10 (Matsumoto et al., 2014; Matsushita et al., 2010). Dans des expériences de coculture, Matsushita *et al.* ont mis des Bregs CD1d^{hi}CD5⁺ ou des lymphocytes B non régulateurs CD1d^{lo}CD5⁻ activés *in vitro*, provenant de souris EAE, avec des cellules dendritiques et en présence d'antigène MOG (Matsushita et al., 2010). Lorsque ces cellules dendritiques sont ensuite cultivées avec des lymphocytes T CD4 ayant un TCR transgénique spécifique de MOG, ils observent que celles qui ont été préalablement cultivées avec les Bregs permettent une plus faible prolifération des lymphocytes T CD4. Matsushita *et al.* ont ainsi montré l'action suppressive des Bregs dans l'EAE sur les capacités de priming des lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques. De plus, cette action suppressive est dépendante de l'IL-10 étant donné l'absence d'inhibition lors de la coculture des cellules dendritiques avec des lymphocytes B CD1d^{hi}CD5⁺ déficients en IL-10 (Matsushita et al., 2010). Les Bregs inhibent également les réponses Th1 et Th17 impliquées dans l'EAE via la production de TGF- β . En effet, Bjarnadottir *et al.* ont montré que les souris dont les lymphocytes B sont déficients en TGF- β , présentent une plus grande susceptibilité à l'EAE et une accélération de leur pathologie qui est associée à une plus grande infiltration de cellules Th1 et Th17 dans la moelle épinière comparées aux souris WT (Bjarnadottir et al., 2016). Ils ont montré que cet effet sur les cellules Th1 et Th17 est médié par une diminution des capacités de priming des cellules dendritiques. En effet, les souris EAE dont les lymphocytes B sont déficients en TGF- β , présentent une augmentation de la proportion des cellules dendritiques et de leur expression en molécule de CMH-II et de costimulation CD86 comparées à des souris EAE non déficientes. La production d'IL-35 par les Bregs est également responsable de l'inhibition de la réponse Th1 et Th17 dans l'EAE. En effet, les souris ayant leurs lymphocytes B déficients en IL-35 (B-P35^{-/-}) présentent une forme exacerbée de l'EAE contrairement aux souris non déficientes (Shen et al., 2014). Cette forme exacerbée est associée à une augmentation de la production d'IFN- γ et d'IL-17 après

stimulation *in vitro* des splénocytes provenant de souris B-P35^{-/-} en présence d'antigène MOG comparée à une stimulation de splénocytes provenant de souris non déficientes. Dans l'EAE, l'induction de Tregs dépendants de l'expression de GITRL et de la production d'IL-35 par les Bregs est également impliquée dans le contrôle de la pathologie (Ray et al., 2012; Shen et al., 2014; van Olfen et al., 2009).

Dans le modèle murin NOD (nonobese diabetic), les souris développent spontanément le diabète de type 1 avec une autoréactivité des lymphocytes T envers les Ag des cellules β . Le double rôle des lymphocytes B est particulièrement représenté dans l'établissement de ce modèle. En effet, bien que les lymphocytes B soient essentiels dans le développement spontané des lymphocytes T autoréactifs et donc dans le déclenchement de la pathologie (Tian et al., 2006), ils sont également impliqués dans l'inhibition de sa progression (Tian et al., 2001). Les lymphocytes B des souris NOD sécrètent du TGF- β après activation par du LPS (lipopolysaccharide) et leur administration à des souris NOD prévient le déclenchement de la pathologie à travers la sécrétion de TGF- β qui inhibe l'activité des cellules présentatrices d'antigènes (Tian et al., 2001).

Les Bregs sont également impliqués dans le développement de l'arthrite auto-immune. Evans *et al.* ont montré que dans la rate de souris naïves ou de souris développant l'arthrite induite par le collagène (CIA), les cellules qui expriment l'IL-10 sont majoritairement les lymphocytes B transitionnels de la zone marginale (T2-MZP) CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}CD1d^{hi}. De plus, ces cellules sont présentes en plus grand nombre chez les souris en rémission que chez les souris en CIA aiguë et leur transfert adoptif prévient l'induction de la CIA (Evans et al., 2007). Les mécanismes utilisés dans cette prévention correspondent à l'inhibition de l'orientation Th1 et de la production d'IFN- γ via la production d'IL-10. En effet, l'absence de production d'IL-10 par les T2-MZP transférés entraîne une augmentation de la sévérité de la CIA associée à une augmentation de la réponse Th1. (Evans et al., 2007). Le rôle des Bregs dans la prévention de l'arthrite auto-immune implique également l'inhibition de la réponse Th17 de manière dépendante de l'IL-10 (Carter et al., 2011; Yang et al., 2012). De plus, les Bregs IL-10⁺ semblent agir sur les Tregs CD4⁺FOXP3⁺. En effet, Carter *et al.* ont observé que, dans le modèle murin d'arthrite auto-immune, une déficience en lymphocytes B est associée à une diminution du nombre de Tregs Foxp3⁺, tandis qu'une reconstitution avec des Bregs T2-MZP et non avec des lymphocytes B folliculaires ou de la zone marginale permet une

augmentation du nombre de Tregs (Carter et al., 2011). Cette augmentation des Tregs est dépendante de l'IL-10 car elle n'est pas induite lors d'une reconstitution avec des lymphocytes T2-MZP IL-10^{-/-}. Ces résultats montrent donc que les Bregs IL-10⁺ sont responsables du maintien du nombre de Tregs *in vivo*.

ii. Infection

Lors d'une infection, les bactéries sont capables de manipuler le système immunitaire afin de lui échapper, notamment en induisant la production d'IL-10 chez son hôte régulant ainsi la réponse de plusieurs populations immunitaires (Horikawa et al., 2013). En effet, Horikawa *et al.* ont montré que l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes* entraîne chez la souris le développement de Bregs CD1d^{hi}CD5⁺ producteurs d'IL-10 associé à une faible élimination bactérienne. De plus, la déficience en lymphocytes B producteurs d'IL-10 permet une meilleure activation des macrophages qui se traduit par l'augmentation de leur phagocytose et leur production d'IFN- γ et une plus grande élimination bactérienne (Horikawa et al., 2013). Lee *et al.* ont montré une plus grande résistance des souris déficientes en lymphocytes B durant les 3 premiers jours suite à l'infection par *L. monocytogenes* comparée aux souris WT (Lee and Kung, 2012). Ces résultats sont associés à une corrélation positive entre la production d'IL-10 et la charge bactérienne dans la rate à 1,5 jours et à 3 jours après l'infection de souris WT par *L. monocytogenes*. Ces derniers montrent également par transfert adoptif que cette résistance est conférée par les lymphocytes B de la zone marginale et non par les lymphocytes B folliculaires.

Lors de l'infection par la bactérie *Salmonella*, une augmentation de la production d'IL-10 par les lymphocytes B CD138⁺ est constatée (Neves et al., 2010). De plus, Neves *et al.* ont montré que les souris dont les lymphocytes B sont IL-10^{-/-}, présentent une meilleure survie comparées aux souris non déficientes. Enfin, la déficience en lymphocytes B producteurs d'IL-10 permet une augmentation de la production de TNF- α et d'IFN- γ dès le deuxième jour suite à l'infection par une souche virulente, ce qui n'est pas le cas chez les souris non déficientes (Neves et al., 2010). Les Bregs produisant de l'IL-35 participent également à cette résistance. En effet, les souris transgéniques possédant des lymphocytes B p35^{-/-}, qui ne pourront donc pas produire d'IL-35, présentent une meilleure résistance à l'infection par *Salmonella* comparées aux souris WT (Shen et al., 2014). Ces résultats attestent du développement rapide

des Bregs suite à une infection bactérienne qui confère à la bactérie une résistance en début d'infection.

Lors d'un contact avec le parasite *L. major* LV39, les souris déficientes en lymphocytes B et les souris WT reconstituées après irradiation avec des lymphocytes B IL-10^{-/-} sont résistantes à l'infection contrairement aux souris WT reconstituées avec des lymphocytes B WT (Ronet et al., 2010). Cette résistance à l'infection parasitaire des souris aux lymphocytes B IL-10^{-/-} est accompagnée d'une augmentation de la réponse Th1 qui se traduit par une plus grande production d'IFN- γ par les cellules des ganglions. Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris WT et activées par *L. major in vitro* produisent de l'IL-12 en présence de surnageant de culture de lymphocytes B IL-10^{-/-} activés avec *L. major*. Cependant, cette expression d'IL-12 est inhibée en présence de surnageant de culture de lymphocytes B WT activés avec *L. major* (Ronet et al., 2010). La production d'IL-12 par les cellules dendritiques étant responsable de l'orientation Th1 (Sallusto, 2016), ces résultats démontrent le rôle suppresseur des Bregs sur la réponse Th1 qui est engendré indirectement par l'inhibition des cellules dendritiques via la production d'IL-10.

iii. Allergie

Les Bregs sont également impliqués dans la tolérance aux allergènes. En effet, les patients présentant un asthme allergique (AA) ont un nombre et une proportion plus faible de leurs lymphocytes B CD24^{hi}CD27⁺, connus pour leur fonctions régulatrices (Iwata et al., 2011), comparés aux individus sains (van der Vlugt et al., 2014). De plus, les Bregs CD24^{hi}CD27⁺ des patients asthmatiques acquièrent moins d'expression de l'IL-10 après stimulation avec du LPS *in vitro* comparés à ceux des individus sains.

Dans un modèle murin dont l'allergie inflammatoire a été induite par contact avec des extraits d'acariens, notre équipe a montré un plus faible nombre de Bregs IL-10⁺ dans les poumons de ces souris comparé aux souris WT (Braza et al., 2015). Les splénocytes des souris allergiques produisent moins d'IL-10 après stimulation par du LPS *in vitro* comparés aux souris WT. Dans cette étude nous avons identifié une population de Bregs CD9⁺ qui est enrichie en lymphocytes B IL-10⁺ et qui contrôle l'inflammation allergique. En effet, le transfert adoptif de ces cellules dans les souris allergiques inhibe l'asthme et entraîne une diminution du nombre de neutrophiles et d'éosinophiles de manière dépendante de l'IL-10 car l'injection de

lymphocytes B CD9⁺ provenant de souris IL-10^{-/-} n'empêche pas l'allergie et ne permet pas cette diminution. De la même manière, contrairement à un transfert adoptif avec des lymphocytes B CD9⁺ IL-10^{-/-}, le transfert de lymphocytes B CD9⁺ permet une diminution des réponses Th2 et Th17 avec une plus faible proportion d'expression d'IL-4 et d'IFN- γ parmi les lymphocytes T CD4⁺ du poumon de souris allergiques (Braza et al., 2015).

iv. Transplantation

En transplantation, le système immunitaire met en place une réponse allogénique envers la greffe conduisant à une fibrose et à son rejet. Notre équipe a récemment identifié un plus grand nombre de Bregs GZMB⁺ dans le sang périphérique chez des patients transplantés tolérants un greffon rénal en l'absence de traitement immunosuppresseur, comparés aux patients transplantés stables sous traitement et aux volontaires sains (Chesneau et al., 2015). De plus, ces Bregs GZMB⁺ sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T autologues et allogéniques activés *in vitro*. Cette inhibition est en partie dépendante du GZMB et du contact cellulaire car l'ajout d'inhibiteurs du GZMB ou la réalisation de la coculture en puits séparés (transwell) restituent respectivement cette prolifération.

Dans un modèle expérimental, Ding *et al.* ont greffé des îlots pancréatiques de souris C57BL/6 à des souris BALB/c et traitent les souris greffées avec un anticorps anti-TIM-1 permettant une survie prolongée de la greffe (Ding et al., 2011). Ce traitement permet un taux de survie du greffon de 40% à plus de 110 jours post-greffe contrairement aux souris non traitées qui rejettent toutes leur greffe à 15 jours. Cependant, une déplétion des lymphocytes B ne permet pas cette prolongation. De même, l'établissement du modèle de greffe chez des souris déficientes en lymphocytes B ne permet pas une survie supérieure à 20 jours en présence du traitement, tandis que l'administration de lymphocytes B WT syngéniques accompagnées du traitement permet une survie de la greffe de 20% à 50 jours. Ainsi, les lymphocytes B sont impliqués dans la survie de la greffe médiée par TIM-1. Un des mécanismes expliquant cette meilleure survie est l'orientation vers une réponse Th2 qui se traduit par une diminution de l'expression d'IFN- γ et une augmentation de l'expression de l'IL-4 par les T CD4 des souris traitées. De plus, cette orientation est dépendante des lymphocytes B qui augmentent leur expression de TIM-1 en réponse au traitement ainsi que leur expression

en IL-4 et IL-10. Enfin, ils montrent chez des souris non traitées que le transfert adoptif de ces Bregs TIM-1⁺ permet une prolongation de la survie d'une manière dépendante de l'IL-10 (Ding et al., 2011).

Dans un modèle expérimental de greffe de peau, Minagawa *et al.* ont étudié les mécanismes impliqués dans l'induction d'une tolérance par l'infusion pré-greffe de lymphocytes T du donneur (Minagawa et al., 2004). Ils ont ainsi montré que la survie prolongée de la greffe lors de cette induction de tolérance est dépendante des Bregs FASL⁺. Ces études montrent donc que les Bregs jouent un rôle dans la mise en place d'un environnement tolérogène favorable à la survie de la greffe.

v. Cancer

Le développement tumoral est accompagné par la mise en place de mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des Bregs dans l'échappement tumoral.

L'injection de cellules d'une lignée cancéreuse issues d'une glande mammaire de BALB/c induit des métastases chez la souris. Olkhanud *et al.* ont montré par déplétion que les lymphocytes B CD25⁺ sont indispensables à la présence de ces métastases dans les poumons (Olkhanud et al., 2011). Les Bregs CD25⁺ préalablement mis en coculture avec les cellules tumorales, sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T activés *in vitro*. De plus, ce mécanisme de suppression des lymphocytes T par les Bregs est dépendant du contact cellulaire induisant le développement de Tregs et il n'est pas observé lorsque les lymphocytes B n'ont pas été traités en présence de cellules tumorales. Olkhanud *et al.* ont montré que cette induction de Tregs est dépendante du TGF- β et a également lieu *in vivo*. En effet, l'injection de lymphocytes B traités avec les cellules tumorales augmente le nombre de Tregs dans le sang de souris WT comparée à l'injection de lymphocytes B non traités. Enfin, contrairement aux lymphocytes B non traités, l'injection des Bregs entraîne une augmentation de la taille et du nombre de métastases dans les poumons.

Un des traitements courant du lymphome non-Hodgkinien est la déplétion des lymphocytes B par traitement anti-CD20 (Smith, 2003). Une étude a montré l'implication des lymphocytes B endogènes d'une souris ayant développé expérimentalement un lymphome

provenant d'une autre souris syngénique, dans l'inhibition de la déplétion de ce dernier par traitement anti-CD20 (Horikawa et al., 2011). Horikawa *et al.* ont montré que la présence de Bregs CD1d^{hi}CD5⁺ et leur production d'IL-10 inhibe fortement la déplétion du lymphome et que ces Bregs IL-10⁺ sont capables de réguler les macrophages *in vitro* et *in vivo*. Étant donné que les macrophages sont les premiers médiateurs de la déplétion du lymphome par l'anti-CD20, l'action régulatrice des Bregs sur les macrophages explique leur implication dans l'inhibition de ce traitement (Horikawa et al., 2013).

Chez l'Homme, l'expression du GZMB par les lymphocytes B de la leucémie lymphoïde chronique a été montrée après leur activation *in vitro* avec de l'IL-21 et du CpG ODN (CpG oligodeoxynucleotides) (Jahrsdorfer et al., 2006). Ces lymphocytes B cancéreux GZMB⁺ acquièrent ainsi un pouvoir cytotoxique envers les cellules cancéreuses adjacentes qui meurent par apoptose et sont ainsi régulées par effet by-stander. Lindner *et al.* ont montré que les lymphocytes GZMB⁺ en coculture avec les lymphocytes T CD4⁺ activés sont capables d'inhiber la prolifération de ces derniers (Lindner et al., 2013). De plus, cette inhibition est dépendante du GZMB car l'ajout d'inhibiteur du GZMB restaure leur prolifération. Ils identifient également par microscopie la présence de ces Bregs GZMB⁺ au sein de différents environnements tumoraux tels que les tumeurs mammaires, ovariennes, cervicales, colorectales et prostatiques (Lindner et al., 2013). L'infiltration de telles cellules au pouvoir régulateur pourrait donc être impliquée dans l'échappement tumoral.

Une population de Bregs transitionnels CD24^{hi}CD38^{hi} producteurs d'IL-10 a été montrée comme impliquée dans l'inhibition de la production d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T CD4⁺ dans des cas de cancer gastrique chez l'Homme (Wang et al., 2015). Un des mécanismes décrit est celui de l'induction de Tregs FOXP3⁺. De plus, il existe une corrélation entre le taux de Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} dans les PBMC et le taux de Tregs FOXP3⁺ (Wang et al., 2015). Wang *et al.* ont montré que la coculture de ces Bregs avec des lymphocytes T naïfs CD4⁺CD25⁻ induit une augmentation de la proportion en Tregs FOXP3⁺ comparée à une culture sans lymphocytes B ou avec des lymphocytes B non régulateurs CD24^{int}CD38^{int}. Enfin, cette action des Bregs sur l'induction de Tregs est dépendante du TGF- β et non de l'IL-10 car seul l'ajout d'anticorps neutralisant le TGF- β inhibe l'induction de Tregs.

Une population de lymphocytes B PD-1⁺ a été identifiée dans le sang périphérique des patients atteints de cancer thyroïdien différencié (CTD) (Wang et al., 2019). L'expression de

PD-L1 est très concentrée chez les lymphocytes PD-1⁺ comparée aux PD-1⁻, à la fois chez les patients CTD et chez les volontaires sains. De plus, les lymphocytes PD-1⁺ de patients CTD ou de volontaires sains inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés *in vitro*. Cette inhibition par les Bregs PD-1⁺ est dépendante de PD-L1 car son blocage restaure la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Ces études montrent l'implication des Bregs dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale et dans la protection du lymphome lors du traitement anti-CD20. De plus, la présence de Bregs dans l'infiltrat tumoral suggère le développement d'une réponse immunosuppressive *in situ* participant à l'échappement tumoral.

b) Les mécanismes d'action des Bregs

Les Bregs ont ainsi été identifiés dans plusieurs pathologies et utilisent différents mécanismes d'action comprenant la production de cytokines immunosuppressives, le contact cellulaire et l'induction de Tregs (**Figure 1**).

i. La production de cytokines

Le premier mécanisme de suppression des lymphocytes B décrit chez la souris et chez l'Homme est la production de cytokine IL-10. En effet, l'IL-10 pouvant être produite par la majorité des cellules immunitaires possède un effet immunosuppresseur envers les cellules de l'immunité innée et adaptative (Saxena et al., 2015). La production d'IL-10 par les Bregs a été mise en évidence dans plusieurs pathologies et correspond au mécanisme suppresseur le plus décrit pour les Bregs. L'IL-10 entraîne une diminution de la différenciation des lymphocytes T en Th1 et Th17 qui sont respectivement impliqués dans la production des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et IL-17 (Sallusto, 2016).

Les Bregs possèdent également des mécanismes immunosuppresseurs indépendant de l'IL-10 faisant intervenir la production de TGF- β , d'IL-35 et de GZMB. La production de TGF- β par les Bregs conduit à une diminution des capacités de priming des lymphocytes T par les cellules dendritiques et à l'inhibition des réponses Th1 et Th17 dans l'EAE (Bjarnadottir et al., 2016). Chez les souris WT, le TGF- β produit par les lymphocytes B activés avec du LPS induit l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ activés avec un anti-CD3 et l'ajout d'anti-TGF- β restaure leur

capacité d'activation (Parekh et al., 2003). La production d'IL-35 par les Bregs entraînant l'inhibition de la réponse Th1 et Th17 a été montrée dans l'EAE et dans un modèle expérimental auto-immun d'uvéïte (EAU, inflammation de la membrane de l'œil) (Shen et al., 2014; Wang et al., 2014). L'expression du GZMB associée à la fonction régulatrice des Bregs sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ a été montrée en situation cancéreuse, en condition saine et en transplantation (Chesneau et al., 2015; Jahrsdorfer et al., 2006; Lindner et al., 2013). De plus, les Bregs GZMB⁺ ont été retrouvés en plus grand nombre dans le sang périphérique de patients atteints de HIV comparés aux volontaires sains (Kaltenmeier et al., 2015). Dans cette étude, Kaltenmeier *et al.* ont montré que les lymphocytes B des patients HIV et non ceux des volontaires sains dégradent la chaîne γ du TCR *in vitro*. Enfin, cette dégradation de la chaîne γ est dépendante du GZMB car elle est empêchée lors d'ajout d'inhibiteur du GZMB (Kaltenmeier et al., 2015).

ii. Le contact cellulaire

Le contact cellulaire est un autre mécanisme immunosuppresseur utilisé par les Bregs. Le récepteur FAS est un récepteur de mort exprimé par les lymphocytes T activés. Ce récepteur transmembranaire possède un domaine de mort DD intra-cytoplasmique induisant un signal apoptotique passant par l'activation des caspases suite à son interaction avec son ligand FASL (Fesik, 2000). La voie d'activation FAS-FASL est importante dans la suppression des lymphocytes T et B autoréactifs lors du développement du système immunitaire mais également lors du maintien de l'homéostasie au cours des réponses immunitaires (Volpe et al., 2016). En effet, après activation antigénique, les lymphocytes T prolifèrent puis subissent une phase de contraction due à leur mort cellulaire (AICD) impliquant en partie la voie FAS/FASL (Puliaeva et al., 2008). Ce mécanisme a été montré chez les lymphocytes B murins qui expriment le FASL après activation *in vitro* par PMA/ionomycine ou LPS, contrairement aux lymphocytes B non activés. Ces lymphocytes B FASL⁺ sont capables de tuer des cellules B de lymphome murin exprimant FAS (Hahne et al., 1996). Suite à ce premier constat, d'autres études ont montré l'expression constitutive de FASL par les lymphocytes B d'une lignée B-CLL (Leucémie lymphoïde chronique) et de patients atteints de B-CLL (Tinhofer et al., 1998). Dans cette étude Tinhofer *et al.* montrent que ces lymphocytes B FASL⁺ tuent *in vitro* les lymphocytes T d'une lignée T-ALL (Leucémie lymphoïde aigue) d'une manière dépendante du

FASL. Wang *et al.* ont montré que le LPS stimule *in vitro* l'induction de Bregs FASL⁺ murins au sein des CD1d^{hi} CD5⁺ et que ces CD1d^{hi}CD5⁺ inhibent la prolifération *in vitro* des lymphocytes T CD4⁺ en partie via le signal FAS/FASL (Wang et al., 2017). Les lymphocytes B FASL⁺ possédant une action apoptotique sur les lymphocytes T et B ont également été identifiés lors d'infections virales par l'EBV (Tanner and Alfieri, 1999) et le VIH (Samuelsson et al., 1997) et lors d'infections rétrovirales (Rich et al., 2006).

PD-1 est un récepteur exprimé par les lymphocytes T activés mais également par les lymphocytes B, les cellules NK, les monocytes et les cellules dendritiques (Keir et al., 2008). A l'inverse du signal de costimulation B7/CD28, la liaison de PD-1 avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 induit un signal d'inhibition des lymphocytes T lors de la reconnaissance antigénique. PD-L1 et FASL sont exprimés par des lymphocytes B IgA⁺ induits par la stimulation avec le ligand APRIL (Fehres et al., 2019). Fehres *et al.* ont montré que cette population Breg IgA⁺ exprime l'IL-10 et qu'elle possède un phénotype différent de celui des autres populations Bregs IL-10⁺ déjà décrites chez l'Homme. Enfin, ces Bregs n'ont pas d'effet sur l'orientation en Th1, Th2 ou Th17 des T CD4⁺ autologues *in vitro* mais inhibent leur production d'IFN- γ d'une manière dépendante de PD-L1 et de l'IL-10.

iii. L'induction de Tregs

En plus d'inhiber directement les réponses effectrices, les Bregs possèdent également une action immunosuppressive indirecte via l'induction de Tregs. En premier lieu, il a été montré que les lymphocytes B sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie des Tregs. En effet, les souris μ MT déficientes en lymphocytes B présentent une diminution du développement des Tregs lors d'induction d'une tolérance orale comparées aux souris WT (Sun et al., 2008). De même, le développement de Tregs et la croissance tumorale après implantation de cellules d'adénocarcinomes sont diminués lors d'une déficience en lymphocyte B chez la souris (Tadmor et al., 2011). Carter *et al.* ont ensuite démontré chez les souris CIA que les Bregs IL-10⁺ sont responsables du maintien des Tregs (Carter et al., 2011). Ce mécanisme dépendant de l'IL-10 est également montré *in vitro* chez la souris WT par coculture de Bregs IgA⁺ et de lymphocytes T CD4⁺ autologues qui permet l'induction de Tregs CD4⁺Foxp3⁺ d'une manière dépendante de l'IL-10 (Hua et al., 2016). Plus récemment, Fehres *et al.* ont montré que le ligand APRIL induit l'expression de PD-L1 et FASL par des lymphocytes

B IgA⁺ pouvant inhiber la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ *in vitro* d'une manière dépendant de PD-L1 et de l'IL-10 (Fehres et al., 2019).

L'activation de l'axe GITR/GITRL est un autre mécanisme d'induction des Tregs par les lymphocytes B. GITRL est exprimé par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B (Nocentini and Riccardi, 2009). Dans un modèle murin transgénique où les lymphocytes B expriment constitutivement GITRL, Olffen *et al.* observent une diminution de l'expression du récepteur GITR à la surface des lymphocytes T, montrant ainsi que l'interaction entre lymphocytes T et lymphocytes B GITRL⁺ est fonctionnelle (van Olffen et al., 2009). De plus, ils ont montré une augmentation du nombre de Tregs Foxp3⁺ chez les souris transgéniques associée à un retard dans l'induction de l'EAE et à un meilleur score de la pathologie. Ray *et al.* ont ensuite montré qu'une déficience en lymphocytes B dans le modèle EAE entraîne une diminution du nombre de Tregs CD4⁺Foxp3⁺ dans la rate (Ray et al., 2012). Le transfert de lymphocytes B permet de restaurer le nombre de Tregs spléniques contrairement au transfert de lymphocytes B dont le GITRL a été préalablement inhibé par anticorps bloquants anti-GITRL. L'expression du GITRL par les Bregs est donc important dans le maintien des Tregs et dans la prévention des maladies auto-immunes (Ray et al., 2012).

Le TGF- β produit par les Bregs agit également sur l'induction de lymphocytes T régulateurs. Ce mécanisme a été montré dans des cas de cancer gastrique chez l'Homme par les Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} et dans l'induction de métastases chez la souris par les Bregs CD25⁺ (Olkhanud et al., 2011; Wang et al., 2015).

L'induction de Tregs par les Bregs permet ainsi d'augmenter le pool de cellules régulatrices afin de préserver une balance effecteur/régulateur du système immunitaire indispensable au maintien de l'équilibre sain de l'organisme et à l'inhibition des réactions auto-immunes.

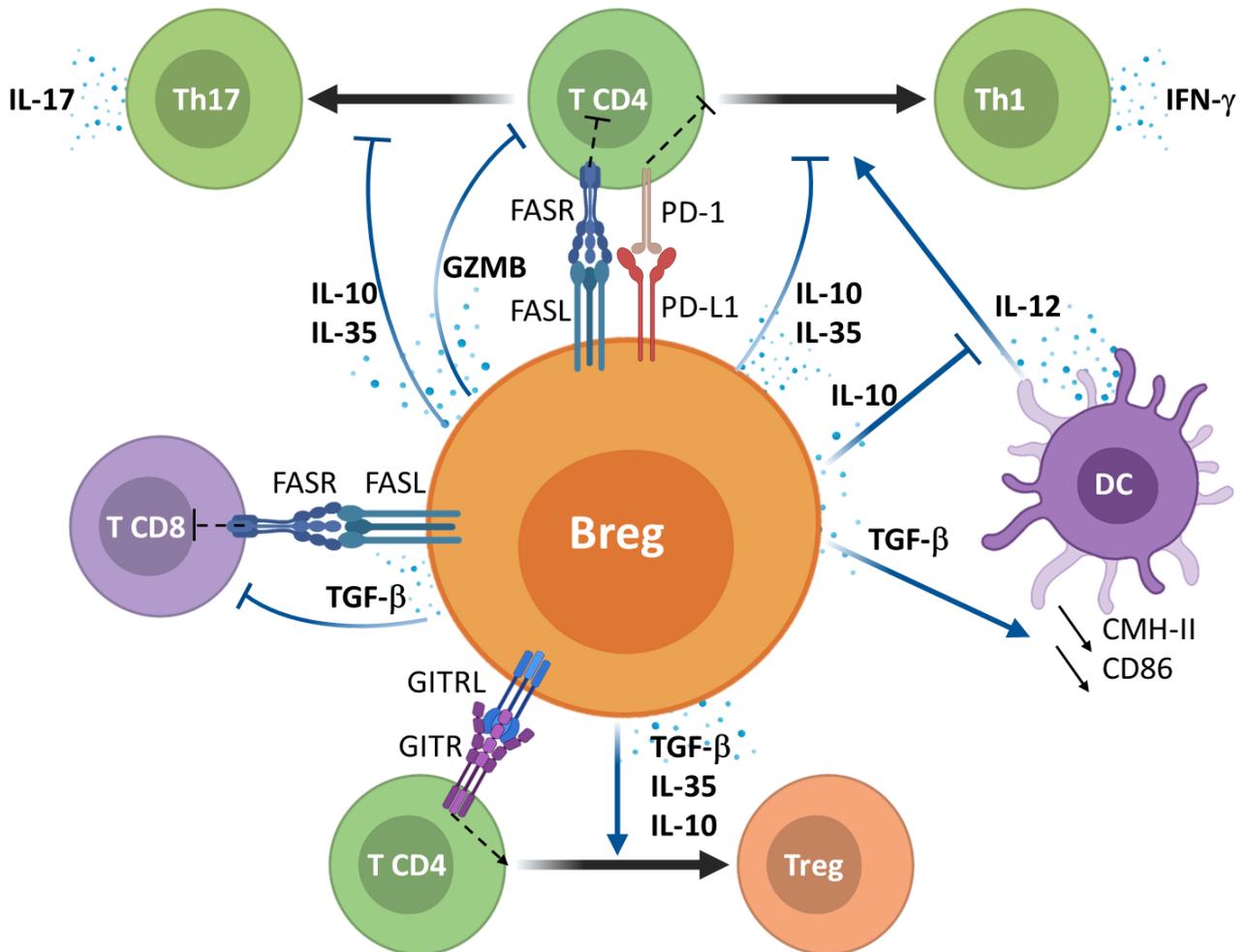


Figure 1 : Mécanismes immunosuppresseurs des Bregs

c) La caractérisation des Bregs

Depuis l'identification de lymphocytes B aux fonctions régulatrices chez la souris, plusieurs études ont essayé de les caractériser en se reposant sur l'identification de marqueurs membranaires. De ces études résulte une hétérogénéité des Bregs. En effet, les Bregs sont notamment enrichis chez la souris dans les populations $CD1d^{hi}$, $CD1d^{hi}CD5^{+}$ également appelées « cellules B10 » pour leur propriété de production d'IL-10, dans les populations $CD9^{+}$, $CD138^{+}$ et parmi les lymphocytes B transitionnels T2-MZP $CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}CD1d^{hi}$ (Tableau 1). De même, chez l'Homme, les Bregs ont été identifiés dans différentes populations telles que les lymphocytes B $CD1d^{hi}$, les $CD24^{hi}CD38^{hi}$ et les lymphocytes B exprimant le PD1 (Tableau 2).

Comme abordé précédemment, les Bregs jouent un rôle important dans l'homéostasie immunitaire, dans la protection contre le développement des maladies auto-immunes mais également dans l'établissement d'un environnement pro-toléro-génique en situation allergique et d'allogreffe. Cependant, en situation infectieuse et tumorale, les Bregs peuvent participer à l'échappement au système immunitaire favorisant l'infection et le développement tumoral. L'identification des Bregs et de leurs marqueurs membranaires a permis de définir progressivement ces différents profils phénotypiques. Cependant, ces profils restent limités et ne permettent qu'un enrichissement des Bregs. Il est donc important de définir précisément les populations Bregs afin de mieux les identifier et étudier leurs fonctions et leurs rôles dans les différentes pathologies.

Tableau 1 : Identification des Bregs chez la souris

| Phénotypes | Mécanismes d'action | Cellules cibles | Pathologies (Références) |
|--|---------------------|---|---|
| CD1d ^{hi} | IL-10 | ? | Colite (Mizoguchi et al., 2002) |
| CD1d ^{hi} CD5 ⁺ | IL-10 | Inhibition de la réponse Th1 et de la production d'IL-12 par les DC | Infection <i>L. major</i> (Ronet et al., 2010) |
| | IL-10 | Inhibition de la réponse Th1 Meilleure activation des macrophages | Infection <i>L. monocytogenes</i> (Horikawa et al., 2013) |
| | IL-10 | Diminution de l'induction TH17 Maintien des Tregs | CIA (Yang et al., 2012) |
| | IL-10 | Inhibition de la réponse Th1 et du priming des T CD4 ⁺ par les DC | EAE (Matsushita et al., 2010) |
| | FASL | Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ | WT (Wang et al., 2017) |
| T2-MZP CD21 ^{hi} CD23 ^{hi} CD24 ^{hi} CD1d ^{hi} | IL-10 | Diminution des réponses Th1/Th17 Maintien des Tregs | Arthrite (Carter et al., 2011; Evans et al., 2007) |
| CD138 ⁺ plasmablastes | IL-10 | Inhibition de la réponse Th1/Th17 et du priming des T CD4 ⁺ par les DC | EAE (Matsumoto et al., 2014) |
| | IL-10 | Diminution de la réponse Th1 | Infection <i>Salmonella</i> (Neves et al., 2010) |
| TIM-1 | IL-10 | Induction vers une réponse Th2 | Allogreffe (Ding et al., 2011) |
| CD9 ⁺ | IL-10 | Inhibition des réponses Th2/Th17 Meilleure activation des macrophages | Allergie (Braza et al., 2015) |
| IgA ⁺ | PD-L1, IL-10 | Inhibition de la réponse Th1 dépendante de PD-L1 Induction de Tregs via l'IL-10 | WT (Fehres et al., 2019) |
| CD25 ⁺ | TGF-β | Induction de Tregs Foxp3 ⁺ | Cancer (Olkhanud et al., 2011) |
| ? | IL-10 | Diminution de l'induction Th1 | CIA (Evans et al., 2007) |
| | TGF-β | Inhibition des réponses Th1/Th17 et des capacités de priming des DC Anergie des lymphocytes T CD8 ⁺ | EAE (Bjarnadottir et al., 2016) WT (Parekh et al., 2003) |
| | GITRL, IL-35 | Inhibition des réponses Th1/Th17 via IL-35 Induction de Tregs via GITRL et IL-35 | EAE (Ray et al., 2012; Shen et al., 2014; van Olfen et al., 2009) |
| | IL-35 | Diminution de l'induction Th1/Th17 | EAU (Wang et al., 2014) |
| | FASL | Inhibition de la réponse T CD8 | Infection rétrovirale (Rich et al., 2006) |

Tableau 2: Identification des Bregs chez l'Homme

| Phénotypes | Mécanismes d'action | Cellules cibles | Pathologies (Références) |
|---------------------------------------|---------------------|---|---|
| CD1d ^{hi} | IL-10 | Inhibition de la réponse Th1 | SEP (Correale and Farez, 2007) |
| CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} | TGF- β | Induction de Tregs | Cancer gastrique (Wang et al., 2015) |
| | IL-10 | Diminution de l'induction Th1 | HV (Blair et al., 2010) |
| PD-1 ⁺ | PD-L1 | Inhibition de la prolifération des T CD4 et T CD8 | CTD (Wang et al., 2019) |
| CD5 ⁺ | GZMB | Inhibition des lymphocytes B | Lupus (Hagn et al., 2010) |
| ? | GZMB | Inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 | HV (Lindner et al., 2013) Rejet d'allogreffe + HV (Chesneau et al., 2015) |
| | GZMB | Inhibition de la réponse T par dégradation de la chaîne γ du TCR | HIV+ (Kaltenmeier et al., 2015) |
| | FASL | Mort des lymphocytes T cancéreux | T-ALL (Tinhofer et al., 1998) |

Tableau 1 et 2 : Identification des Bregs et leurs mécanismes impliqués dans les pathologies

Abréviations : **CIA** : Arthrite induite par le collagène ; **CTD** : Cancers thyroïdiens différenciés ; **DC** : Cellules dendritiques ; **EAE** : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale ; **EAU** : Uvéite auto-immune expérimentale ; **HV** : Volontaires sains ; **SEP** : Sclérose en plaque ; **WT** : Wild type.

3) Ontogénie des lymphocytes B régulateurs

a) L'activation des Bregs

Les mécanismes responsables du développement des Bregs sont mal connus. Cependant, plusieurs mécanismes d'activation des Bregs ont été identifiés et diffèrent selon les populations Bregs (**Tableau 3**). L'activation des lymphocytes B permettant la génération de lymphocytes sécréteurs d'IL-10 est dépendante de plusieurs signaux incluant les signaux des BCR, TLR, CD40 et récepteurs cytokiniques. Lampropoulou *et al.* ont montré que la stimulation du BCR et du CD40 *in vitro* permet la génération de lymphocytes B IL-10⁺ à partir de lymphocytes B de la rate de souris guéries de l'EAE (Lampropoulou et al., 2008). Cependant, ces conditions ne permettent pas la production d'IL-10 à partir de lymphocytes B naïfs ou à partir de lymphocytes B triés à un stade plus précoce de la pathologie. De la même manière, Banko *et al.* ont montré que la plus forte induction de Bregs IL-10⁺ *in vitro* à partir de PBMC

est réalisée par la stimulation du TLR9 et du CD40 et ces Bregs sont présents en grande majorité parmi les lymphocytes B mémoire CD27⁺. (Banko et al., 2017). Ainsi, les lymphocytes B naïfs produisent peu/pas d'IL-10 après activation du BCR et du CD40 ou du TLR9 et du CD40 et nécessite pour cela, une stimulation préalable. Banko *et al.* ont également montré que l'ajout d'IgM diminue l'induction de Bregs IL-10⁺ par stimulation du TLR9 et du CD40 et que la simple stimulation de PBMC par le TLR9, induit une forte proportion de Bregs IL-10⁺ *in vitro* comparée aux stimulations du CD40 seul et du BCR seul (Banko et al., 2017). Lampropoulou *et al.* ont montré que la simple stimulation des TLR4 avec du LPS de différentes origines bactériennes ou des TLR9 par le CpG ODN, permettent la production d'IL-10 par les lymphocytes B de la rate de souris WT. De plus, ils ont montré que les souris dont les lymphocytes B sont KO pour TLR2/4 ou pour MyD88, développent une forme chronique de l'EAE avec une plus forte réponse Th1 et Th17 comparées à des souris aux lymphocytes B-TLR9^{-/-} qui développent et guérissent de l'EAE (Lampropoulou et al., 2010). Ainsi, les signaux TLR2, TLR4, MyD88, et non TLR9, sont essentiels pour la fonction régulatrice des Bregs dans l'EAE. De même, Neves *et al.* ont montré avec des cultures de lymphocytes B déficients pour TLR2/4, TLR9 ou Myd88 en présence de *Salmonella*, que la production d'IL-10 est dépendante de TLR2/4 et de Myd88 (Neves et al., 2010). Neves *et al.* ont montré que Myd88 est également impliqué *in vivo* dans la génération de Bregs. En effet, les souris aux lymphocytes B Myd88^{-/-} présentent un développement plus faible de lymphocytes CD138⁺ exprimant l'IL-10, concordant avec leur plus grande résistance à l'infection, contrairement aux souris sans déficiences. Plusieurs études ont montré que la production d'IL-10 par stimulation des TLR fait intervenir STAT3 (Blair et al., 2010; Liu et al., 2014). De plus, Liu *et al.* ont montré que L'IFN- α permet également d'augmenter la production d'IL-10 par les lymphocytes B stimulés par les TLR (Liu et al., 2014).

Bien que les signaux TLR soient suffisants pour induire des Bregs IL-10⁺ *in vitro*, ils ne le sont pas *in vivo*. En effet, les souris μ MT reconstituées avec des lymphocytes B déficients en CD40 ou avec des lymphocytes B ayant un BCR transgénique spécifique du lysozyme des œufs de poules, présentent une pathologie EAE sévère (Fillatreau et al., 2002). Ces pathologies sévères sont associées à une plus faible production d'IL-10 par les splénocytes activés *in vitro* contrairement à ceux des souris reconstituées avec des lymphocytes B non-déficients qui guérissent de l'EAE. Ces résultats montrent donc l'importance des signaux BCR et CD40 *in vivo*

dans la guérison spontanée de l'EAE que l'on sait dépendante des Bregs IL-10⁺. Mauri *et al.* l'ont également montré dans le modèle d'induction d'arthrite chronique par le collagène (CIA). Le transfert de splénocytes stimulés par anti-CD40 chez les souris CIA permet une diminution de la sévérité des symptômes contrairement au transfert de splénocytes non stimulés (Mauri *et al.*, 2003). La stimulation *in vitro* des splénocytes de souris CIA avec du collagène bovin (CII) + anti-CD40, puis l'isolation des lymphocytes B suivie de leur stimulation par PMA/ionomycine permet la génération de lymphocytes B IL-10⁺. Cette génération de lymphocytes IL-10⁺ est 10 fois supérieure aux conditions sans stimulation anti-CD40. De plus, le transfert de lymphocytes B stimulés anti-CD40 + CII prévient la CIA chez la souris contrairement à un transfert de lymphocytes B non stimulés. Mauri *et al.* ont montré que cette prévention de la CIA est accompagnée d'une inhibition de la production d'INF- γ et d'une augmentation de la production d'IL-10 par les splénocytes après isolation et stimulation *in vitro* (CII+anti-CD40). Enfin, un transfert de lymphocytes B seulement stimulés en présence de CII ne prévient pas la CIA, montrant ainsi la nécessité des deux signaux CD40 et BCR pour la génération de Bregs IL-10⁺ fonctionnels *in vivo* (Mauri *et al.*, 2003). De même, Zhang *et al.* ont montré que les B10 du modèle EAE sont sélectionnés positivement selon la force du signal BCR (Zhang *et al.*, 2016). En effet, dans leur étude Zhang *et al.* ont généré un modèle murin TgV_H3B4 transgénique ayant intégré une cassette d'expression pour une chaîne lourde μ avec un segment variable spécifique des auto-antigènes actine, kératine et myosine. Ils observent que suite à la stimulation LPS/PMA/ionomycine/monensine des splénocytes, les lymphocytes B avec un BCR transgénique possèdent 4 fois plus de lymphocytes B IL-10⁺ que ceux n'ayant pas de BCR transgénique. De plus, en utilisant un anticorps anti-IgM membranaire lors de la stimulation, ils observent une plus grande génération de lymphocytes IL-10⁺ comparée à l'utilisation d'un anticorps anti-IgM soluble qui induit un signal BCR plus faible. Ainsi, un fort signal BCR permet une différenciation plus efficace en Bregs IL-10⁺ (Zhang *et al.*, 2016).

Afin d'identifier les signaux responsables de la production d'IL-10 par les Bregs, Piper *et al.* ont réalisé une analyse transcriptomique comparant les cellules marginales régulatrices IL-10⁺CD24^{hi}CD38^{hi} aux cellules marginales IL-10⁻CD24^{hi}CD38^{hi} et folliculaires CD21^{int}CD34^{int} provenant de souris souffrant d'arthrite (Piper *et al.*, 2019). Ils ont montré que *Ahr* (aryl-hydrocarbon receptor) est le gène le plus significativement surexprimé par les Bregs IL-10⁺CD24^{hi}CD38^{hi}. Après stimulation *ex vivo* des cellules marginales et folliculaires par LPS +

anti-BCR, ils ont confirmé cette surexpression d'AhR par les cellules marginales IL-10⁺CD24^{hi}CD38^{hi} comparées aux cellules marginales IL-10⁻CD24^{hi}CD38^{hi} et folliculaires CD21^{int}CD34^{int} par cytométrie en flux. Cependant, les cellules marginales provenant de souris AhR^{-/-} ont une génération significativement réduite de cellules IL-10⁺CD24^{hi}CD38^{hi} après stimulation *ex vivo* comparées aux cellules de souris AhR^{+/-}. Ils ont également montré, après stimulation des cellules marginales *ex vivo*, une présence d'AhR qui est significativement plus élevée au niveau de leur site de fixation en amont du locus de l'IL-10 chez les Bregs IL-10⁺ comparées aux cellules IL-10⁻. Ils montrent ainsi l'importance d'AhR dans le développement des Bregs IL-10⁺ et la production d'IL-10. Enfin, ils ont montré qu'une déficience en AhR au sein des lymphocytes B entraîne une arthrite exacerbée dans un modèle murin d'arthrite (Piper et al., 2019). Cette déficience est associée à une diminution de la différenciation et de la fonction des Bregs ainsi qu'à une augmentation des réponses Th1/Th17 et à une diminution du nombre de Tregs. Ces études montrent donc l'importance des signaux BCR, CD40, TLR4, Myd88 et d'AhR dans la génération de Bregs IL-10⁺ *in vivo*.

La génération de Bregs GZMB⁺ *in vitro* parmi les B-CLL induit l'apoptose de ces derniers par effet bystander, via la stimulation du signal TLR9 par CpG ODN et de l'IL-21 (Jahrsdorfer et al., 2006). Jahrsdorfer *et al.* ont également montré que le signal BCR + IL-21 induit l'expression du GZMB par les lymphocytes B isolés et par différentes lignées B. Hagn *et al.* ont confirmé que la stimulation BCR + IL-21 permet la génération de Bregs GZMB⁺, de manière plus efficace à partir de lymphocytes B naïfs que de lymphocytes B mémoires, et que cette génération nécessite l'activation de JAK1 et STAT1 (Hagn et al., 2009). Dans une autre étude, Hagn *et al.* ont montré que la génération de Bregs lors du contact des lymphocytes T folliculaires helpers se fait en l'absence de stimulation CD40. En effet, l'axe CD40/CD40L activé par l'interaction avec les lymphocytes T folliculaires helpers et leur production en IL-21 induit une différenciation en plasmocytes, tandis que l'absence de signal CD40 oriente une différenciation en Bregs GZMB⁺ (Hagn et al., 2012).

D'autres mécanismes ont également été montrés, notamment la production d'IL-35 qui conduit à la génération de plasmocytes sécréteurs d'IL-10 et d'IL-35 (Wang et al., 2014). La stimulation du récepteur TIM-1 induit également la génération des B10 (Ding et al., 2011). Hua *et al.* ont identifié chez les individus sains que la stimulation par le ligand APRIL permet la production d'IL-10 par les lymphocytes B activés avec du CpG *in vitro*, les rendant ainsi

capables de diminuer la production d'IFN- γ et de TNF- α par les CD4⁺ en coculture (Fehres et al., 2019).

Une meilleure compréhension des signaux d'activation et de génération des Bregs est importante pour prédire l'impact des traitements dans différentes situations cliniques sur les Bregs notamment en transplantation et en cancérologie où ils sont impliqués.

Tableau 3 : Mécanismes d'activation des Bregs

| Molécules | Espèces | Pathologies | Références |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|--|
| <i>Récepteurs activateurs</i> | | | |
| BCR | Souris Homme | EAE, CIA | (Fillatreau et al., 2002; Mauri et al., 2003) (Lampropoulou et al., 2008; Zhang et al., 2016) |
| CD40 | Souris Homme | EAE, WT, CIA | (Fillatreau et al., 2002; Mauri et al., 2003) (Lampropoulou et al., 2008) |
| TLR | Souris Homme | EAE, <i>Salmonella</i> | (Blair et al., 2010; Lampropoulou et al., 2008; Liu et al., 2014; Neves et al., 2010) |
| TIM | Souris | Rejet d'allogreffe | (Ding et al., 2011) |
| <i>Ligands activateurs</i> | | | |
| IL-35 | Souris | EAU | (Wang et al., 2014) |
| APRIL | Homme | HV | (Fehres et al., 2019; Hua et al., 2016) |
| IL-21 | Homme | HV, B-CLL | (Hagn et al., 2009; Jahrsdorfer et al., 2006) |
| IFN- α | Homme | HV | (Liu et al., 2014) |
| <i>Signaux intracellulaires</i> | | | |
| Myd88 | Souris | EAE, <i>Salmonella</i> | (Lampropoulou et al., 2008; Neves et al., 2010) |
| AhR | Souris | Arthrite | (Piper et al., 2019) |
| IRF4 | Souris | EAE | (Matsumoto et al., 2014) |
| Blimp-1 | Souris | EAE | (Matsumoto et al., 2014) |
| JAK1 | Homme | HV | (Hagn et al., 2009) |
| STAT1 | Homme | HV | (Hagn et al., 2009) |
| STAT3 | Homme | HV | (Blair et al., 2010; Liu et al., 2014) |

Adapté de (Baba et al., 2015) "Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells." *Int Immunol* ". Abréviations : **EAE** : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale ; **HV** : Volontaires sains.

b) Modèles de développement des Bregs

Une des questions qui subsiste est celle de la provenance de ces Bregs dans l'organisme. Deux modèles de l'origine du développement des Bregs sont actuellement proposés (Oleinika et al., 2019).

Le premier modèle considère les Bregs comme une population cellulaire à part entière, un type cellulaire spécifique dont le développement serait contrôlé par un ou plusieurs facteurs de transcription (Mauri and Menon, 2015). Ce modèle suit celui du développement des Tregs dont la différenciation est régulée par le facteur de transcription FOXP3 (Fontenot et al., 2003). Dans le deuxième modèle, les Bregs seraient générés à partir de lymphocytes B suite à des stimulations spécifiques apportées par leur environnement (Oleinika et al., 2019). Le deuxième modèle tend à être le plus probable étant donné qu'aucun facteur de transcription spécifique des Bregs n'ai été rapporté à ce jour. De plus, comme illustré précédemment, les lymphocytes B stimulés selon différents signaux génèrent différentes populations Bregs. Enfin, les Bregs peuvent être générés à différents stades de différenciation (**Figure 2**).

En effet, les Bregs sont retrouvés parmi les cellules transitionnelles T2-MZP et les cellules mémoires (Iwata et al., 2011) mais ils peuvent aussi être identifiés dans les populations plus différenciées que sont les plasmablastes CD138⁺ (Lino et al., 2018; Matsumoto et al., 2014). Bien que plusieurs études aient identifié des Bregs IL-10⁺ parmi les splénocytes des souris EAE, Matsumoto *et al.* ont montré dans un modèle murin EAE IL-10^{Venus/+}, permettant de suivre l'expression de l'IL-10, que la majorité des cellules IL-10⁺ ont un phénotype plasmablaste CD138⁺ et sont principalement localisées dans les ganglions lymphatiques (Matsumoto et al., 2014). Ils ont montré à 14 jours après induction de l'EAE que 40% des CD138⁺ sont IL-10⁺ dans les ganglions et seulement 10% dans la rate. De plus, les CD138⁺ de la rate sont principalement des plasmocytes CD138⁺Blimp-1^{hi} et en nombre relativement constant, tandis que que les CD138⁺ des ganglions sont principalement des plasmablastes CD138⁺Blimp-1^{int} en prolifération (70%). Ils ont montré que les lymphocytes B CD138⁺, mais également les ganglions, sont indispensables au contrôle de l'EAE. En effet, les souris EAE dont les lymphocytes B sont déficients pour le facteur de différenciation en plasmocytes Blimp-1 ou pour le récepteur L-selectine de migration aux ganglions, développent une EAE aux symptômes plus sévères contrairement aux souris WT et aux souris

splénectomisées. De plus, ils ont montré que l'IRF4 qui est une cible des signaux d'activation TLR et BCR, est important dans la différenciation en plasmablastes et est essentiel pour la production d'IL-10 par les plasmablastes. Ils ont montré que les souris dont les lymphocytes B sont IRF4^{-/-} sont susceptibles de développer l'EAE. Ainsi, les plasmablastes CD138⁺ des ganglions sont essentiels pour le contrôle de l'EAE et nécessitent IRF4 (Matsumoto et al., 2014). Plusieurs études montrent l'importance des splénocytes dans le contrôle de l'EAE lors de leur transfert adoptif. Matsumoto *et al.* ont confirmé que la suppression de l'EAE par les splénocytes transférés requière leur différenciation dans les ganglions. Enfin, ils montrent que la plupart des plasmablastes des ganglions ont subi un changement isotypique de leurs Ig. De plus, dans un modèle murin dont les lymphocytes B sont déficients en Bcl6, un gène crucial dans la différenciation des lymphocytes B dans les centres germinatifs (Basso and Dalla-Favera, 2010), ces souris sont capables de générer des plasmablastes et de contrôler l'EAE (Matsumoto et al., 2014). Ainsi, la régulation de l'EAE ne nécessiterait pas les plasmablastes différenciés du centre germinatif mais plutôt ceux différenciés dans les zones extra-folliculaires. Maseda *et al.* ont étudié le développement des lymphocytes B IL-10⁺ grâce à un modèle murin Tiger permettant le suivi des cellules exprimant l'IL-10 par leur expression de la GFP (Green fluorescent protein) (Maseda et al., 2012). Ils ont observé que le nombre de lymphocytes B IL-10⁺ est plus élevé dans la rate tandis que leur proportion est plus élevée dans les ganglions mésentériques. Ils ont observé 3 jours après injection de LPS aux souris Tiger, une faible augmentation du nombre et du pourcentage de lymphocytes B IL-10⁺. D'une manière intéressante, ils ont montré que ces Bregs IL-10⁺ se différencient *in vivo* en plasmocytes CD138^{hi} avec une augmentation de la proportion de Bregs IL-10⁺CD138^{hi} et de l'expression de Blimp-1 par les Bregs IL-10⁺ durant les 3 premiers jours après injection. Les lymphocytes B isolés de la rate 3 jours après injection puis stimulés *in vitro* en présence de LPS permet une grande génération en termes de nombre et de pourcentage de lymphocytes B IL-10⁺. De plus, certains Bregs IL-10⁺ expriment le CD43 et le GL7 témoignant d'une différenciation en plasmocytes. Enfin, Maseda *et al.* ont montré que ces Bregs IL-10⁺ participent à la production d'anticorps et qu'ils représentent un large répertoire BCR (Maseda et al., 2012). Ainsi, les Bregs IL-10⁺ sont capables de se différencier en plasmocytes.

En plus de ces Bregs au stade avancé de la différenciation B, Montandon *et al.* ont montré qu'il était possible d'induire des cellules Pro-B régulatrices (Montandon et al., 2013).

En effet, ils obtiennent ces cellules Pro-B B220⁺IgM⁻ à partir de cellules de moelle osseuse de souris NOD après stimulation *in vitro* du signal TLR9 par CpG ODN, et leur transfert chez une souris NOD permet de prévenir le développement du diabète de type 1. Cette génération de Pro-B B220⁺IgM⁻ est dépendante de la stimulation par CpG ODN car l'utilisation d'un oligonucléotide GpC contrôle ne permet pas la génération de cellules Pro-B B220⁺IgM⁻ régulatrices, et le transfert des cellules générées chez une souris NOD ne prévient pas le développement du diabète de type 1. Les CpG-Pro-B inhibent la prolifération des lymphocytes T *in vitro* en réponse à leur production d'IFN- γ d'une manière dépendante de FASL, car sa neutralisation restaure leur prolifération, mais indépendante de l'IL-10 (Montandon et al., 2013). Le transfert de ces CpG-Pro-B dans un modèle murin EAE inhibe également le développement de la pathologie (Korniotis et al., 2016). Bien que les CpG-Pro-B CD45.1 injectés se retrouvent principalement dans les ganglions et faiblement dans la moelle épinière, leur taux parmi les lymphocytes de la moelle épinière est 8 fois supérieur à celui des ganglions. De plus, ils ont tous un phénotype mature CD5⁺CD1d⁺IgM⁺IgD⁺IgG⁻ de type transitionnel à 21 jours dans la moelle épinière. Cependant, leur état de différenciation diffère selon leur lieu de migration car seulement 20% des CpG-Pro-B CD45.1 transférés expriment le CD5 et 70% expriment le CD11b à 21 jours dans les ganglions. De manière intéressante, le transfert de CpG-Pro-B Rag2^{-/-} chez la souris EAE ne permet pas de prévenir les symptômes et aucune cellule transférée n'est retrouvée ni dans les ganglions ni dans la moelle épinière dès 3 jours (Korniotis et al., 2016). Ainsi, leur maturation est nécessaire à leur survie après injection, mais on ne peut pas affirmer qu'elle soit indispensable à leur activité régulatrice. Les mécanismes impliqués dans cette prévention de l'EAE sont la diminution de l'expression de l'IFN- γ et de l'IL-17 par les lymphocytes T CD4⁺ de la moelle épinière. Korniotis *et al.*, ont montré que ces mécanismes sont dépendants de la production de l'IL-10 par les CpG-Pro-B transférés, car leur déficience en IL-10 n'entraîne pas une diminution de l'EAE et de la réponse Th17 dans la moelle épinière. De plus, le transfert de CpG-Pro-B déficients en IFN- γ ne permet pas une diminution de l'EAE et n'induit pas de rétention des lymphocytes T CD4⁺ dans les ganglions contrairement aux CpG-Pro-B non déficients (Korniotis et al., 2016). Il en est de même pour le transfert de CpG-Pro-B déficients en CCL19. CCL19 est la chimiokine du récepteur CCR7 qui est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ et qui est responsable du contrôle de la localisation dans les ganglions. Etant donné que la déficience en IFN- γ entraîne une diminution de l'expression de CCL19 par les CpG-Pro-B et que l'expression de CCL19 par les CpG-Pro-B est plus importante

dans les ganglions que dans la moelle épinière, Korniotis *et al.* ont suggéré que la production de CCL19 par les CpG-Pro-B des ganglions, régulée par la production autocrine d'IFN- γ , entraîne une rétention des lymphocytes T favorable à la prévention de l'EAE (Korniotis *et al.*, 2016). Ces résultats montrent que les CpG-Pro-B possèdent différents mécanismes suppresseurs selon leur environnement et lieu de migration. Ragonnaud *et al.*, ont identifié la présence de cellules Pré-B-like CD25⁺ dans la rate d'un modèle murin 4T1 de cancer du sein et dans le sang circulant de patients atteints de cancer du sein (Ragonnaud *et al.*, 2019). Ils ont montré que, chez l'Homme et chez la souris, cette émigration des progéniteurs de la moelle osseuse est due à une diminution de leur expression de CXCR4 induite par la production de la TLSP (Thymic stromal lymphopoietin) par les cellules cancéreuses. Ragonnaud *et al.*, ont montré que ces cellules Pré-B-like CD25⁺ isolées de la rate de souris atteintes de cancer du sein sont capables d'inhiber, *ex vivo*, la prolifération et la production d'INF- γ et d'IL-2 de lymphocytes T naïfs activés. De plus, les cellules Pré-B isolées de la moelle osseuse de souris WT et incubées en présence de cellules cancéreuses 4T1 sont capables d'inhiber, *ex vivo*, la prolifération des lymphocytes T contrairement aux cellules Pré-B non traitées. Seules les cellules circulantes Pré-B-like CD25⁺ de souris atteintes de cancer, et non celles de souris WT, ont une surexpression du TGF- β qui est impliquée dans les mécanismes régulateurs des Bregs, suggérant que les cellules cancéreuses induisent une conversion des Pré-B-like CD25⁺ en Bregs. Enfin, la conversion de ces Bregs soutient le développement de métastases. En effet, les lymphocytes B de souris WT transférés chez des souris déficientes en lymphocytes B et atteintes de cancers augmentent le nombre de métastases pulmonaires, contrairement au transfert de lymphocytes B de souris KO pour le récepteur au TLSP.

Ces études suggèrent une plasticité des lymphocytes B à acquérir un phénotype régulateur en réponse à leur environnement. Ce modèle soulève donc les questions suivantes : est-ce que tous les lymphocytes B sont capables de développer des fonctions régulatrices et/ou maintiennent leur double rôle effecteur/régulateur ? Et par conséquent est-ce qu'une même cellule B dans différentes conditions de stimulation génèrerait différents profils régulateurs ? Ou est-ce que les lymphocytes B sont engagés dès leur développement au stade de progéniteurs avec des caractéristiques épigénétiques qui les orienteraient vers des profils distincts ?

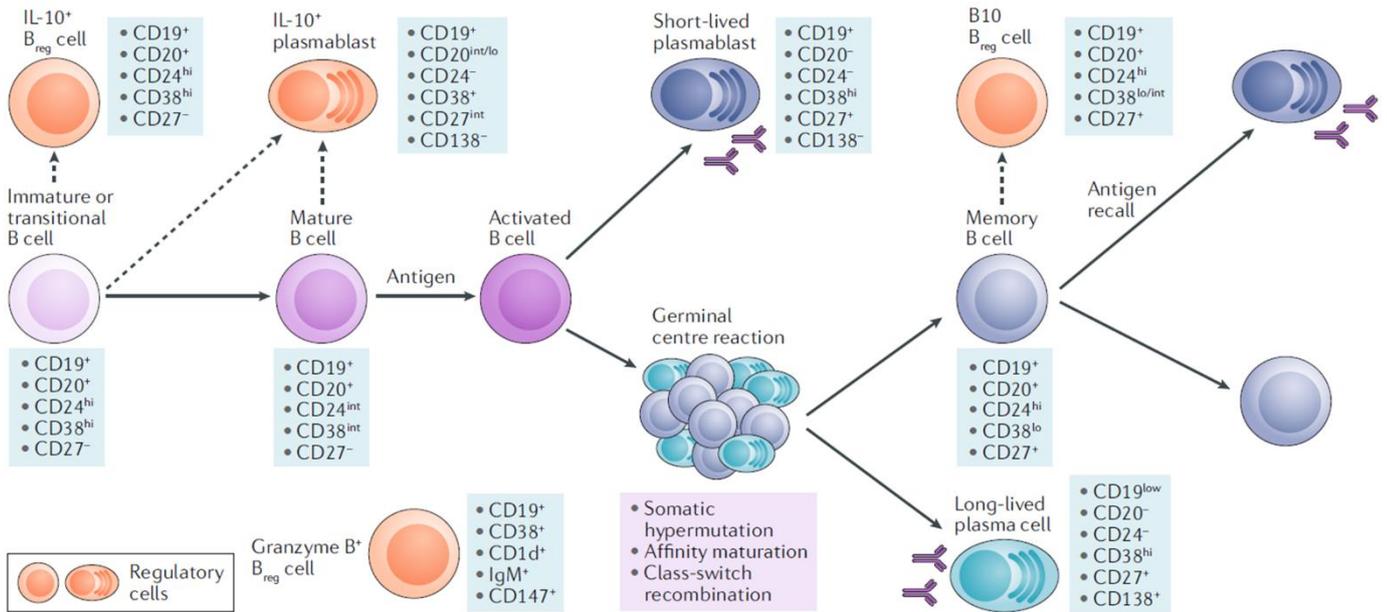


Figure 2 : Génération des Bregs au cours de la différenciation des lymphocytes B

Figure issue de Oleinika, K., C. Mauri and A. D. Salama (2019). "Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease." *Nat Rev Nephrol* 15(1): 11-26.

II. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus finement régulé permettant le renouvellement du tissu hématopoïétique. Ce tissu est composé de toutes les cellules du sang que l'on peut classer en trois groupes. On distingue les érythrocytes communément appelés « globules rouges » qui assurent le transport de l'oxygène à tous les tissus, les plaquettes qui jouent un rôle dans la coagulation et enfin, toutes les cellules immunitaires (globules blancs) qui protègent l'organisme en cas d'infection. Le tissu hématopoïétique a donc un rôle central pour l'organisme, et l'homéostasie de ses différents compartiments cellulaires doit être maintenue.

1) La mise en place de l'hématopoïèse au stade embryonnaire

a) L'embryogenèse

Le processus de développement chez l'Homme se caractérise par une période embryonnaire de 8 semaines. On distingue la période pré-embryonnaire de la 1^{ère} à la 3^{ème} semaine qui conduit à la formation des 3 feuillets embryonnaires. Puis, la période embryonnaire pendant laquelle se forment les ébauches embryonnaires des organes se déroule de la 4^{ème} à la 8^{ème} semaine. Enfin, les 30 semaines suivantes, où les organes vont continuer de croître et de se développer, constituent la période fœtale qui se conclut par la naissance.

Durant les premiers jours suivant la formation du zygote, celui-ci entreprend ses premières mitoses formant ainsi un embryon constitué de plusieurs cellules indépendantes appelées blastomères (**Figure 3**) (Wamaitha and Niakan, 2018). Les blastomères contenus dans la zone pellucide se solidarisent en créant des jonctions intercellulaires conférant un aspect de « mûre » à l'embryon, il s'agit du stade morula. Puis a lieu le processus de blastulation, durant lequel les cellules se différencient et forment le blastocyste constitué d'une masse cellulaire interne qui formera l'embryon et d'une masse cellulaire externe (trophoblaste) qui sera à l'origine des annexes embryonnaires. Le blastocyste subit des phases de contraction et d'expansion qui entraînent la rupture de la zone pellucide et ainsi l'éclosion du blastocyste (hatching) qui quitte la zone pellucide permettant son implantation dans l'utérus au 7^{ème} jour. Suite à l'implantation, la masse cellulaire interne du blastocyste va

s'organiser et former les deux feuillets embryonnaires primitifs : l'épiblaste (feuillelet dorsal) et l'hypoblaste (feuillelet ventral). Du 8^e au 12^e jour, ces feuillets s'expandent et forment un disque embryonnaire bilaminaire. Au début de la 3^e semaine a lieu la gastrulation (du 15^e au 17^e jour) avec un épaissement axial de l'épiblaste créant ainsi la ligne primitive (Solnica-Krezel and Sepich, 2012). Cette ligne forme un sillon qui permet l'invagination des cellules de l'épiblaste et leur migration entre ce dernier et l'hypoblaste. Les premières cellules déplacent celles de l'hypoblaste et deviennent ainsi l'endoderme définitif. Les cellules suivantes génèrent le troisième feuillet embryonnaire : le mésoderme qui se trouve entre l'épiblaste et l'endoderme (**Figure 3**). Ainsi, à la fin du 19^e jour concluant la gastrulation, l'embryon se présente sous la forme de 3 feuillets : l'endoderme qui résulte de l'épiblaste, le mésoderme et l'ectoderme. Ces feuillets permettent l'organogenèse qui se déroule lors de la période embryonnaire proprement dite (4^e à 8^e semaine). Brièvement : les intestins, le foie et les poumons naissent de l'endoderme ; le système nerveux central et périphérique se forment à partir de l'ectoderme tandis que les organes génitaux, les os, les muscles et les vaisseaux se développent à partir du mésoderme.

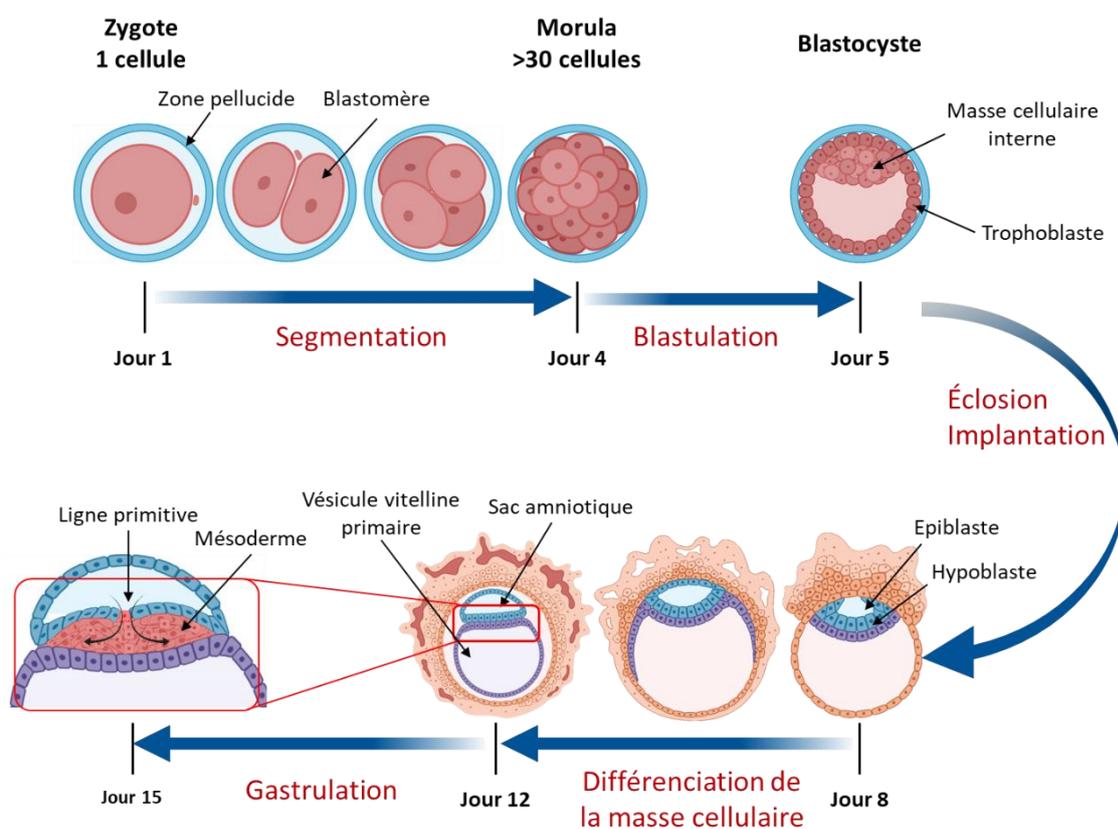


Figure 3 : Formation des 3 feuillets embryonnaires chez l'humain

b) L'hématopoïèse primitive

L'établissement du flux sanguin est crucial pour le développement de l'embryon. Ainsi, les systèmes vasculaires, cardiaques et hématopoïétiques sont les premiers à être mis en place. L'hématopoïèse, permettant la génération des cellules sanguines, se définit en plusieurs vagues successives au cours du développement embryonnaire (Julien et al., 2016; Kumar et al., 2019; Zambidis et al., 2005).

La première vague hématopoïétique est qualifiée de « primitive » et débute entre le 16^e et le 19^e jour avant la mise en place du flux sanguin au 24^e jour (Lindsey et al., 2014). Elle permet la production de progéniteurs hématopoïétiques primitifs restreints à la génération d'érythrocytes, de mégacaryocytes qui produisent les plaquettes et de macrophages, (Kardel and Eaves, 2012; Slukvin, 2016) avant même la génération de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'hématopoïèse primitive a lieu dans le sac vitellin extra-embryonnaire (yolk sac) peu de temps après la gastrulation. En effet, on y retrouve les premiers progéniteurs hématopoïétiques présents au niveau d'îlots de vaisseaux sanguins formés à partir d'agrégats de mésoderme (McGrath and Palis, 2005). Ces îlots évoluent pour constituer les premières structures vasculaires avec la formation d'angioblastes (Keller et al., 1999). Ainsi, cette étroite association au sein de ces îlots a fait naître l'hypothèse d'un précurseur commun appelé « hémangioblaste » permettant la génération de cellules endothéliales vasculaires et de progéniteurs hématopoïétiques. Il a été démontré *in vitro* que la formation de corps embryonnaires (EB) à partir de cellules souches pluripotentes embryonnaires (hESC) conduit précocement à la formation de colonies capables de générer des progéniteurs hématopoïétiques mais également des cellules adhérentes aux propriétés endothéliales (Choi et al., 1998). Aujourd'hui, l'existence de cet intermédiaire aux propriétés hématopoïétiques et endothéliales conduisant à la formation des progéniteurs hématopoïétiques est communément accepté.

c) L'hématopoïèse définitive

La deuxième vague hématopoïétique est qualifiée de définitive car elle permet la génération de progéniteurs myéloïdes, lymphoïdes et érythrocytaires mais également la production de cellules souches hématopoïétiques. Elle a principalement lieu au niveau de la région intra-embryonnaire Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) entre le 24^e et le 28^e jour

(Kardel and Eaves, 2012; Kumar et al., 2019; Tavian et al., 1996). En effet, des CSH ont été retrouvées dans des clusters hématopoïétiques présents dans l'aorte dorsale de la région AGM, mais également dans le sac vitellin, les artères ombilicales et le placenta. Zovein *et al.* ont mis en place un modèle murin dont les cellules qui expriment le marqueur endothélial VE-Cadherin lors de l'hématopoïèse ont été marquées par un gène rapporteur (Zovein et al., 2008). Ce modèle a permis de suivre le devenir de ces cellules endothéliales. Ils ont ainsi démontré la présence de marquage dans le thymus, la moelle osseuse et la rate 1 an après la naissance. Ces résultats chez la souris montrent la survenue directe des CSH à partir d'un intermédiaire endothélial appelé Hemogenic Endothelium (HE).

Bien que l'existence de cet intermédiaire HE soit communément acceptée, plusieurs modèles décrivant ses caractéristiques progénitrices ont été suggérés. Le premier cas de figure concerne la survenue de cet HE possédant des capacités hémangioblastiques et conduisant à la génération de cellules endothéliales et hématopoïétiques (**Figure 4, modèle 1**). Tandis que, dans le deuxième modèle, cet HE est constitué de cellules endothéliales spécialisées qui, après une transition « endothelial to hematopoietic » (EHT), acquièrent la capacité de générer des cellules hématopoïétiques (**Figure 4, modèle 2**). Aujourd'hui, la littérature penche plus en faveur du deuxième modèle étant donné qu'aucun modèle murin de suivi cellulaire n'a permis d'identifier la double contribution d'une colonie vers un développement endothélial et hématopoïétique (Kumar et al., 2019; Slukvin, 2016).

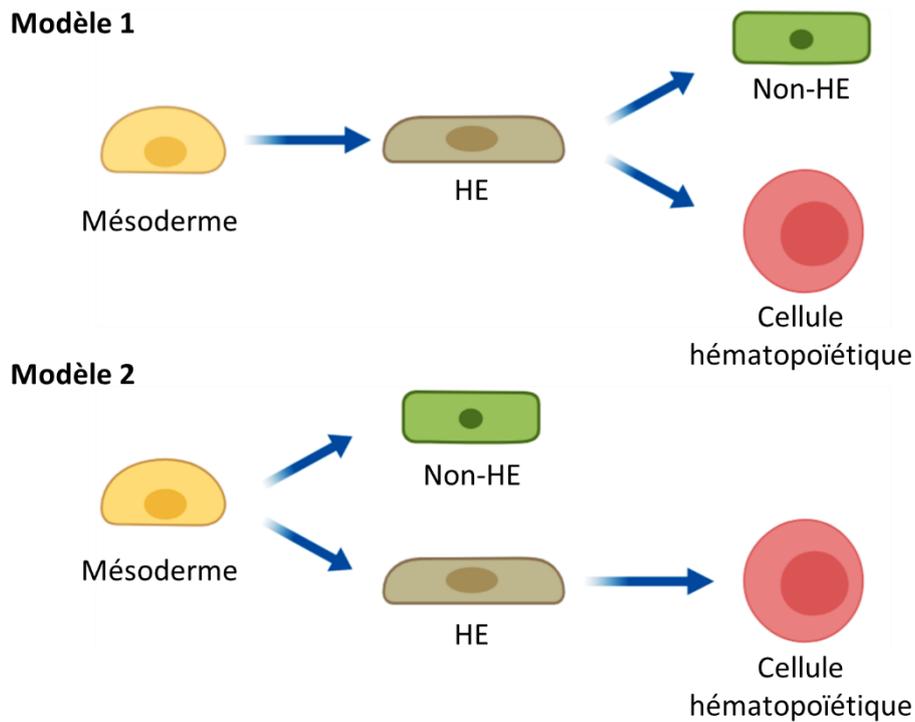


Figure 4 : Modèle de génération des cellules hématopoïétiques par un intermédiaire endothélial HE

Figure adaptée de Slukvin. FEBS Lett (2016).

Les cellules souches hématopoïétiques ainsi formées migrent dans le foie fœtal où elles s'expandent massivement, puis la moelle osseuse prendra progressivement ce rôle d'organe hématopoïétique. Ainsi, la moelle osseuse est devenue avant la naissance l'unique siège de l'hématopoïèse qui perdurera tout le long de la vie adulte (Slayton et al., 1998).

2) L'hématopoïèse chez l'adulte

a) Les cellules souches hématopoïétiques

L'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse en condition normale et ce, durant toute la vie adulte afin de renouveler les cellules immunitaires qui ont une durée de vie limitée. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse assurent ce renouvellement. En effet, les CSH sont des cellules souches multipotentes qui sont donc douées d'autorenouvellement et qui permettent la génération de toutes les cellules du sang. Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules souches adultes qui ont été le plus étudiées. Elles sont présentes dans la moelle osseuse mais certaines entrent dans la

circulation et sont retrouvées dans le sang périphérique et dans le sang de cordon. Pour assurer l'hématopoïèse et le maintien du pool de CSH, ces dernières présentent un processus de division asymétrique avec deux mécanismes proposés (Wilson and Trumpp, 2006). Dans le premier, les CSH se divisent et donnent naissance à une cellule fille qui garde sa capacité d'autorenouvellement et à une autre qui se différencie en perdant cette capacité (**Figure 5A**). Dans le deuxième modèle, les CSH se divisent en deux cellules identiques, l'une est une CSH qui reste dans son environnement, tandis que l'autre cellule entre en contact avec un nouvel environnement qui va induire sa différenciation (**Figure 5B**).

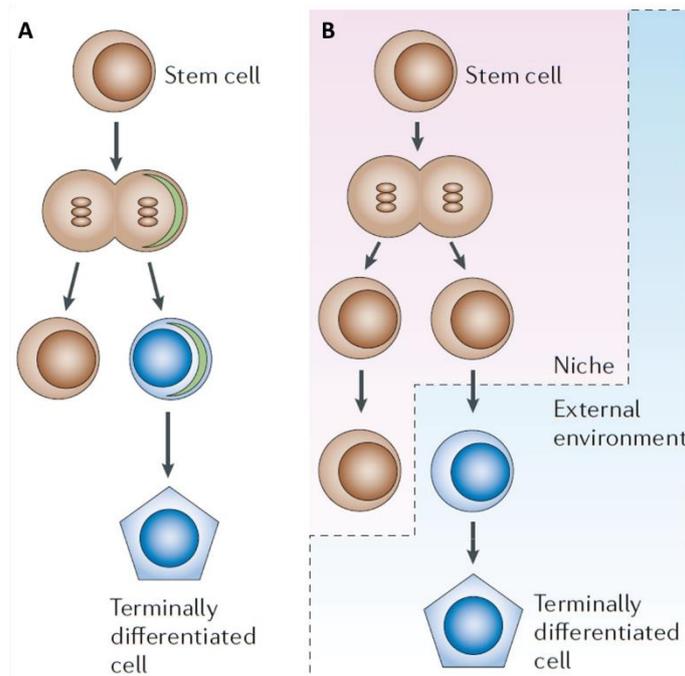


Figure 5 : Division asymétrique des cellules souches

Figure issue de Wilson and Trumpp. Nat Rev Immunol (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol 6(2): 93-106.

Les CSH ont d'abord été étudiées dans des modèles murins de transplantation de moelle osseuse. Dans ce modèle, on identifiait les CSH par leur capacité à former des colonies dans la rate après une irradiation létale qui élimine toutes les cellules sanguines avant la transplantation (Wu et al., 1968). A présent, le gold standard pour identifier les CSH est de vérifier leur capacité à reconstituer à long terme toutes les cellules sanguines après leur transplantation dans un organisme ayant subi une irradiation létale. Il a été montré chez la souris que les CSH fonctionnelles étaient présentes dans la fraction des cellules de moelle

osseuse qui n'expriment aucun marqueur spécifique de l'engagement vers un type cellulaire (Lin^-) et qui sont positives pour Sca1 et c-Kit (Wilson and Trumpp, 2006). Afin d'étudier les CSH humaines, deux modèles de « reconstitution d'une hématopoïèse humaine » après transplantation chez un receveur xénogénique ont été utilisés (Dominique, 2000). Le groupe de E. Zanjani a développé un modèle de greffe de cellules humaines dans des fœtus de mouton (Zanjani et al., 1996). Dans ce modèle, ils observent un chimérisme pendant plus de 3 ans et une reconstitution possible d'un second receveur à partir des cellules humaines issues du premier receveur. Ce modèle repose sur le concept d'immaturité immunologique au stade fœtal. Ainsi, les CSH greffées colonisent la moelle osseuse pendant le développement fœtal sans rejet de la part du receveur. Cela permet également d'éviter le conditionnement par irradiation de la moelle osseuse d'un organisme adulte avant la greffe de CSH et donc les dommages possibles infligés aux cellules stromales qui sont importantes pour l'hématopoïèse. Un modèle murin NOD/SCID a été établi par le groupe de J. Dick avec un fort taux de greffe de cellules humaines (Dick, 1996). Ces modèles ont permis d'identifier la sialomucine CD34 qui est le premier marqueur utilisé pour enrichir les CSH humaines et qui est exprimé par 0,5-5% des cellules de la moelle osseuse (Seita and Weissman, 2010).

L'expression du CD34 est très conservée entre l'Homme et la souris. Cependant, les cellules CD34^+ représentent une population hétérogène comprenant les CSH, certains progéniteurs hématopoïétiques et certaines cellules endothéliales murines et humaines (Krause et al., 1996). Chez la souris, les cellules LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+$) n'ont pas toutes la même capacité de reconstitution et on distingue les LSK CD34^- , qui permettent une reconstitution à long terme du tissu hématopoïétique et les LSK CD34^+ , qui sont capables de le reconstituer à court terme (Wilson and Trumpp, 2006). De même, chez l'Homme, les cellules CD34^+ sont majoritairement (90-99%) CD38^+ , tandis que les CSH CD34^+ résident dans la fraction $\text{CD38}^{\text{low/-}}$ (Seita and Weissman, 2010). Parmi les $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$, les cellules $\text{CD90}^- \text{CD45RA}^-$ et $\text{CD90}^+ \text{CD45RA}^-$ issus de sang de cordon sont capables de reconstitution à long terme de souris NOG irradiées (Majeti et al., 2007). Cependant, seules les cellules issues des souris reconstituées avec les $\text{CD90}^- \text{CD45RA}^-$ sont capables de reconstituer un second receveur. Ainsi, les $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^- \text{CD45RA}^-$ sont enrichies en CSH, tandis que les $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^+ \text{CD45RA}^-$ contiennent des progéniteurs multipotents (MPP). Bien que les études sur les CSH aient permis leur meilleure caractérisation, les marqueurs actuels ne permettent pas de les isoler

spécifiquement. D'autres études sont nécessaires pour mieux les caractériser et améliorer leur utilisation en clinique.

b) Les modèles de différenciation hématopoïétique

i. Le modèle classique

Suite à l'étude de la différenciation des CSH et leur capacité de repopulation dans des expériences de transplantation, un arbre de différenciation a été établi (**Figure 6**). Dans ce modèle, les CSH sont divisées en 2 catégories selon leur expression du CD34 et leur capacité de reconstitution des populations hématopoïétiques d'un organisme après irradiation létale. Ainsi, on distingue les long-term (LT)-CSH CD34⁻ qui sont capables de reconstitution à long terme de plus de 4-5 mois, des short-term (ST)-CSH CD34⁺ qui ne peuvent pas reconstituer au-delà d'un mois (Cheng et al., 2019; Weissman et al., 2001). Les LT-CSH se différencient en ST-CSH qui elles-mêmes deviennent des progéniteurs multipotents (MPP) qui perdent leur capacité d'autorenouvellement. Ces MPP en se différenciant créent une première bifurcation et permettent la génération de progéniteurs communs à la lignée myéloïde (CMP) et de progéniteurs communs à la lignée lymphoïde (CLP). Les CMP génèrent à leur tour des progéniteurs qui produisent à la fois des granulocytes et des macrophages (GMP) et des progéniteurs se différenciant en mégacaryocytes et en érythrocytes (MEP). Les CLP n'ont, quant à eux, pas d'intermédiaires et permettent la production directe de lymphocytes B et T et de cellules NK.

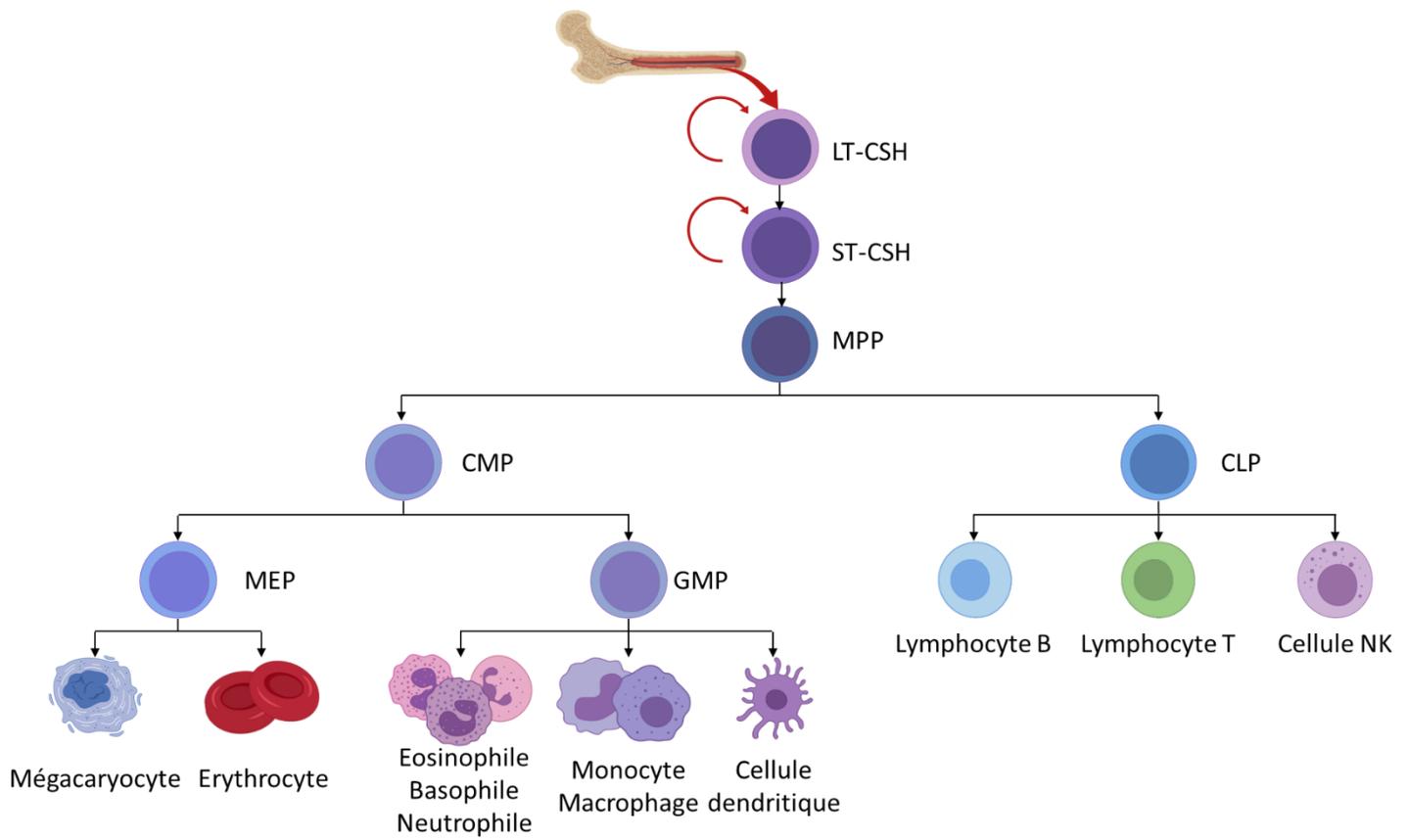


Figure 6 : Hématopoïèse : modèle classique

ii. Révision du modèle classique

Cependant, le modèle classique fait l'état des expérimentations de transplantation à partir de bulks de cellules souches, que l'on sait hétérogènes, et il se base sur leurs caractéristiques phénotypiques membranaires. Ainsi, le suivi de la transplantation d'HSC en single cell et les technologies de séquençage single cell sont venus contester ce modèle et ont permis d'en proposer un nouveau (Cheng et al., 2019; Laurenti and Gottgens, 2018). En effet, de récentes découvertes ont montré que les CSH présentent plus d'hétérogénéité, avec notamment un intermédiaire supplémentaire intermediate-term (IT)-CSH capable de reconstitution jusqu'à 8 mois (Benveniste et al., 2010). De même, les progéniteurs multipotents (MPP) représentent une population hétérogène (Pietras et al., 2015; Wilson et al., 2008). Ils ont été scindés en MPP1, MPP2, MPP3 et MPP4 dont MPP1 qui est doué d'autorenouvellement et d'une capacité de reconstitution jusqu'à 4 mois et qui est ainsi proches des IT-CSH et ST-CSH. MPP2 et MPP3 sont des progéniteurs orientés vers une

différenciation myéloïde et produisent peu de lymphocytes T et B, tandis qu'à l'inverse les MPP4 produisent peu de cellules myéloïdes. De plus, Pronk *et al.* ont identifié de nouveaux progéniteurs myéloïdes. Ils ont montré que les CMP classiques pouvaient être subdivisées selon leur expression du CD150, de même que les MEP qui regroupent des cellules CD150⁺ et CD150⁻ dont certaines expriment fortement l'englodin (Pronk *et al.*, 2007). Ainsi, ils définissent selon l'expression de ces marqueurs, les Pre MegE comme étant CD150⁺CD41⁻Englodin⁺ et qui permettent la génération de mégacaryocytes et d'érythrocytes. Les Pre CFU-E CD150⁺CD41⁻Englodin⁺, quant à eux, génèrent presque exclusivement des érythrocytes, tandis que les MkP CD150⁺CD41⁻Englodin⁻ sont restreints à la production de mégacaryocytes. L'ensemble de ces résultats a permis à Cheng *et al.* de proposer un nouveau modèle de différenciation qui est le plus à jour actuellement et tendra à être modifié selon les prochaines avancées (Figure 7) (Cheng *et al.*, 2019).

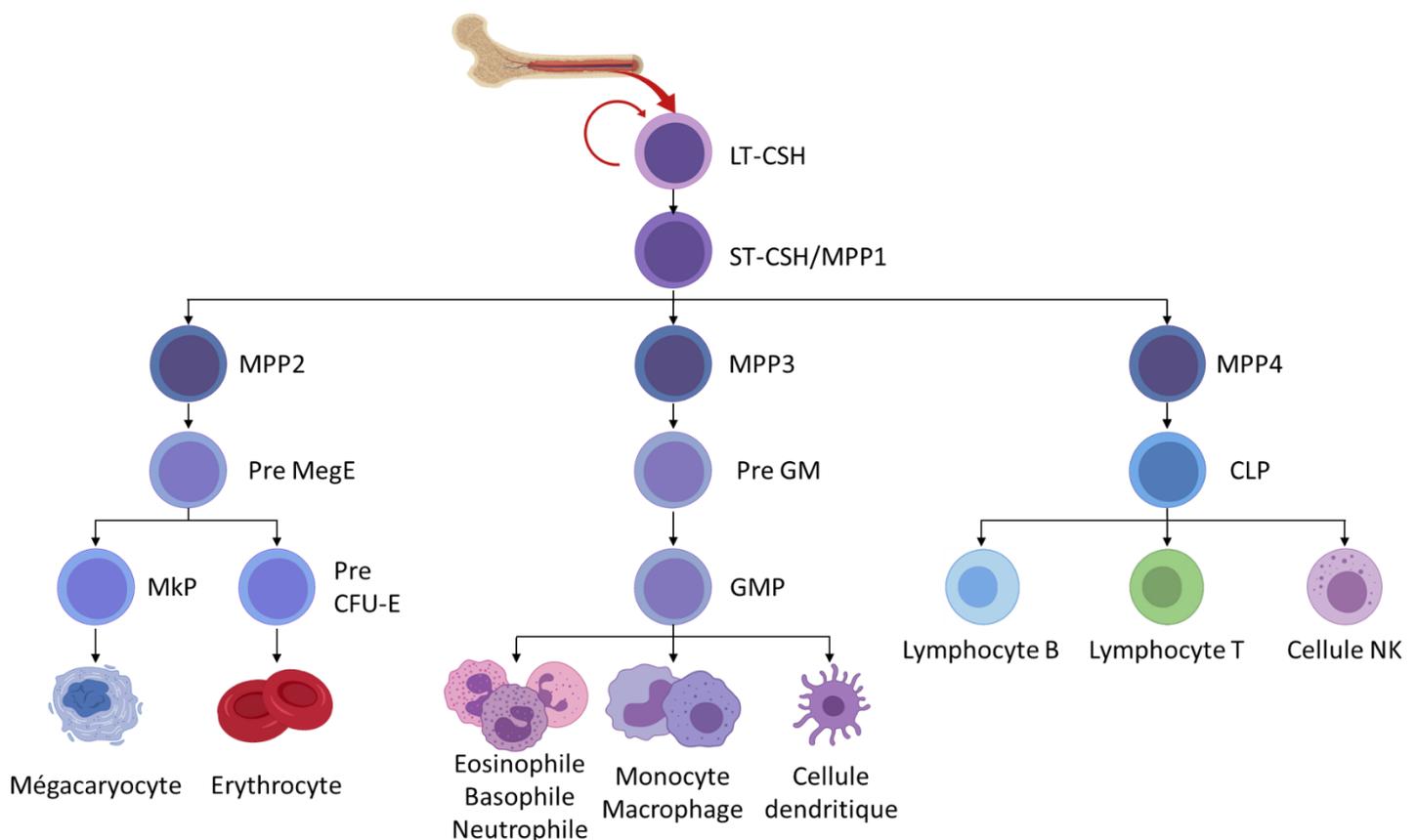


Figure 7 : Différenciation hématopoïétique : révision du modèle classique

3) Les modèles de différenciation hématopoïétique *in vitro*

L'étude de l'hématopoïèse chez l'embryon humain est difficilement réalisable pour des raisons éthiques et d'accessibilité, mais est toutefois possible en France et rigoureusement soumise à l'autorisation de l'agence de la biomédecine. De même, l'étude de l'hématopoïèse adulte est compliquée compte tenu de la très faible proportion de CSH dans le sang périphérique, dans la moelle osseuse et dans le sang de cordon. Mais également à cause de leur accessibilité difficile et du manque de marqueurs pour les isoler précisément. L'alternative est l'utilisation de cellules souches pluripotentes.

a) Les cellules souches pluripotentes

i. Les différents types de cellules souches

Dans le processus de différenciation, les cellules souches sont douées d'autorenouvellement permettant le maintien du pool de cellules souches et ont pour objectif la production de cellules spécialisées. On distingue plusieurs types de cellules souches selon leur capacité de différenciation (Seita and Weissman, 2010) (**Figure 8**). Au cours du stade embryonnaire, les cellules du zygote issues de la fécondation sont qualifiées de totipotentes car elles permettent de générer à la fois les cellules de l'embryon et les annexes embryonnaires. Au stade du blastocyste il n'y a plus de cellules totipotentes, on distingue le trophoblaste qui se différencie en annexes embryonnaires et les cellules de la masse interne qui sont pluripotentes. A l'instar des cellules totipotentes, les cellules pluripotentes génèrent les tissus embryonnaires mais elles ne peuvent pas produire d'annexes embryonnaires. Les cellules multipotentes représentent un stade plus avancé dans la différenciation car elles produisent tous les types cellulaires mais restreints à un tissu, c'est le cas des CSH. Les cellules oligopotentes, telles que les CLP et les CMP, sont restreintes à un tissu et ne peuvent générer que certains types cellulaires constituant ce dernier. Enfin, les cellules souches unipotentes que sont par exemple les cellules souches musculaires, ne sont capables de se différencier qu'en un seul type cellulaire.

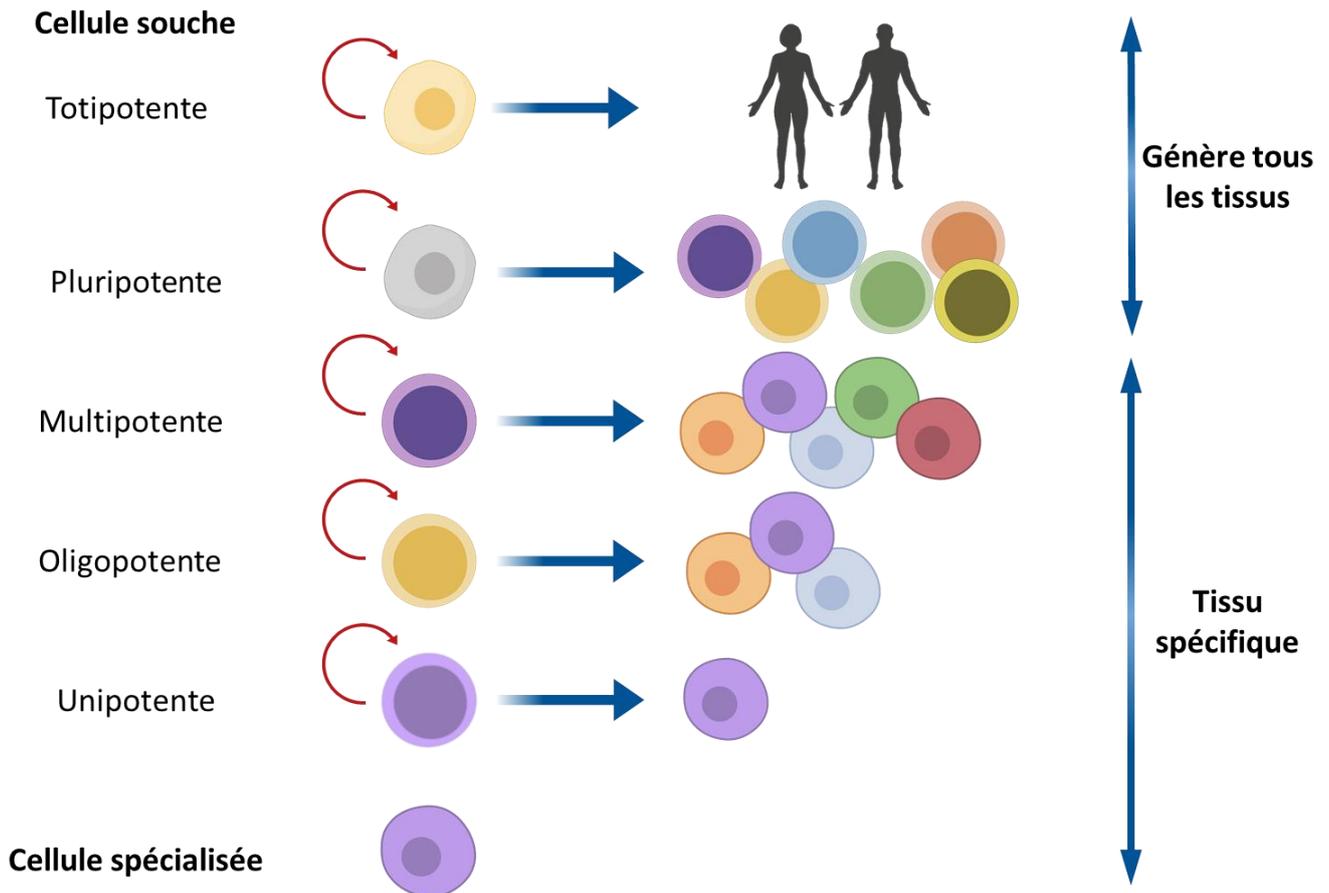


Figure 8 : Les différents types de cellules souches

ii. Les cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines (hESC)

Les cellules souches pluripotentes embryonnaires sont les cellules de la masse interne du stade blastocyste (5-6 jours) (**Figure 3**). Il est possible de les prélever et de les cultiver *in vitro* et ainsi d'obtenir une lignée de cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines (hESC). Leurs propriétés de renouvellement infini et de différenciation en tous les types cellulaires embryonnaires font de ces cellules un outil idéal pour la recherche.

Ces cellules permettent d'étudier le développement embryonnaire humain normal mais également pathologique selon si elles proviennent d'embryon sain ou malade. Lorsque les hESC sont cultivées dans un environnement qui induit leur différenciation vers un type cellulaire donné, il devient possible d'étudier ce dernier *in vitro*. Cette méthode est particulièrement intéressante pour les cellules qui se divisent peu et/ou sont difficilement

accessibles. La possibilité de prélever les hESC sur un embryon porteur d'une altération génétique permet d'étudier la mise en place de la pathologie associée et de générer *in vitro* un modèle cellulaire pour mieux en comprendre les mécanismes moléculaires (Figure 9A). Des modèles pour la maladie d'Huntington et du syndrome de l'X fragile ont ainsi été réalisés (Bradley et al., 2011; Eiges et al., 2007). De plus, en modifiant génétiquement les hESC, il est possible d'étudier l'effet de l'altération génétique sur le développement. Les hESC offrent ainsi la mise en place de modèles cellulaires pour l'élaboration de traitements (Figure 9B) et l'évaluation de leur toxicité (Figure 9C).

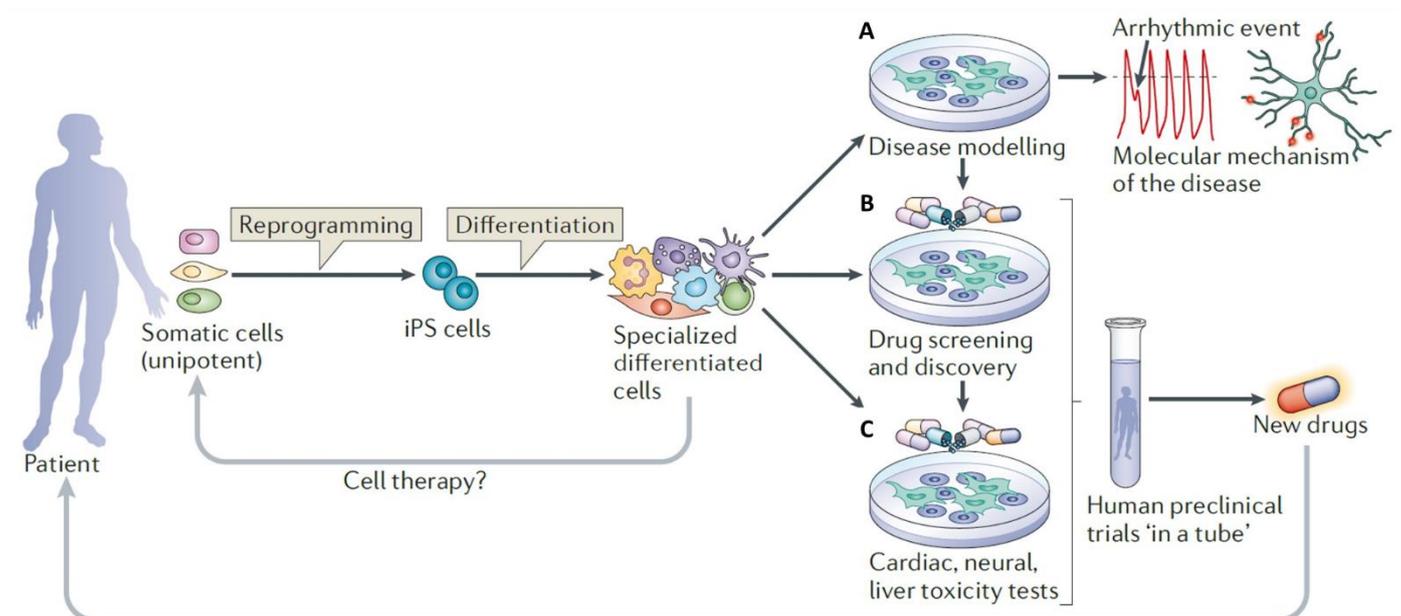


Figure 9: Les cellules souches pluripotentes et la génération de modèles pathologiques

Figure issue de Bellin, M., M. C. Marchetto, F. H. Gage and C. L. Mummery (2012). "Induced pluripotent stem cells: the new patient?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(11): 713-726.

iii. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC)

S.Yamanaka et J.Gurdon ont obtenu le prix Nobel de médecine en 2012 pour leurs travaux sur la reprogrammation de cellules spécialisées en cellules souches pluripotentes. Ils ont montré qu'il était possible, à partir de cellules spécialisées adultes, de remonter le cours

de la différenciation cellulaire afin d'obtenir des cellules pluripotentes présentes au stade embryonnaire. Ces cellules souches humaines sont ainsi appelées cellules souches pluripotentes induites (hiPSC). Dans leurs travaux, ils génèrent des iPSC à partir de fibroblastes murins (Takahashi and Yamanaka, 2006) et humains (Takahashi et al., 2007). Cette reprogrammation cellulaire est réalisée par la transfection, au moyen de vecteurs lentiviraux, de seulement 4 facteurs de transcriptions Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4.

Les hiPSC possèdent les mêmes caractéristiques de pluripotence que les hESC, elles représentent donc un outil de recherche extrêmement intéressant pour les mêmes raisons que ces dernières (**Figure 9**) mais offrent plusieurs avantages (Bellin et al., 2012). Le fait que les hiPSC ne proviennent pas d'un embryon les exempte de la barrière éthique les concernant. Cependant, il s'agit tout de même d'une copie relative d'hESC et leurs études sont donc encadrées par l'agence de la biomédecine. Un autre avantage est la possibilité de choisir le donneur et donc les caractéristiques génétiques qu'auront les hiPSC. Cela facilite grandement l'élaboration de modèles cellulaires pour une pathologie donnée, en partant des cellules de patients atteints de la pathologie, sans recourir à des modifications génétiques. Les hiPSC offrent également de grandes possibilités en médecine régénératrice car leur différenciation autologue permet une transplantation autologue en limitant les risques de rejet.

Avant d'être qualifiées d'hiPSC, les cellules reprogrammées nécessitent d'être validées (Takahashi et al., 2007). Il est nécessaire de confirmer leur état de pluripotence. Pour cela, leur expression des gènes de pluripotence tels que *OCT3/4*, *SOX2* et *NANOG* et leur maintien à long-terme (>40 passages) sont vérifiées. Leur capacité à se différencier *in vitro* en cellules des 3 feuilletts embryonnaires est validée par microscopie avec l'expression de l'Alpha-Fetoprotéine (AFP), de la Smooth Muscle Actin (SMA) et de la beta 3-tubulin qui sont respectivement des marqueurs de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme. Leur pluripotence *in vivo* est vérifiée par leur capacité à former des tératomes après injection chez des souris immunodéficientes SCID (Severe Combined Immunodeficiency). Enfin, les hiPSC doivent avoir conservé leur intégrité génétique qui est étudiée en comparant leur caryotype à celui des cellules donneuses.

Les hiPSC sont des cellules souches qui offrent de multiples avantages dans plusieurs domaines et bousculent notre vision des thérapies cellulaires sur le long terme. Leur champ de recherche et d'application est multidisciplinaire, avec notamment la mobilisation des

industries. En effet, l'ingénierie de biomatériaux est indispensable à la création d'environnement matriciel nécessaire à certaines greffes (Xu et al., 2019). Cependant, l'utilisation des hPSC et de leurs dérivées en thérapie entraîne la prise d'un risque d'instabilité génétique et de développement tumoral qui doit être considéré.

b) Les modèles de différenciation hématopoïétique in vitro

Afin d'engager les hESC et hPSC vers une différenciation hématopoïétique, deux types de modèles *in vitro* sont utilisés.

i. Coculture avec des cellules stromales

Les cellules stromales murines de moelle osseuse sont utilisées pour former un tapis cellulaire sur lequel les cellules souches peuvent se différencier (**Figure 10B**). Les cellules stromales ont un rôle de feeder et produisent des facteurs induisant la différenciation hématopoïétique. Les cellules stromales OP9 sont souvent utilisées, elles proviennent d'une souris possédant une mutation pour le gène *Csf1* entraînant un défaut de leur production de M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (Nakano et al., 1994). Ainsi, elles permettent la différenciation des cellules souches pluripotentes vers les lignées hématopoïétiques et faiblement vers celles des macrophages-monocytes. D'autres lignées de cellules stromales murines de moelle osseuse sont utilisées, notamment les cellules S-17 et MS-5. Cependant, les cellules OP9 permettent une meilleure production de cellules CD34⁺ et de cellules formant des colonies (CFC) (Vodyanik et al., 2005).

ii. Formation de corps embryonnaires

Une autre méthode consiste à différencier les cellules souches pluripotentes dans des plaques de culture à faible adhérence et en milieu de culture permettant la formation de corps embryonnaires (EB) (**Figure 10A**). Les EB sont des agrégats 3D qui sont capables de se différencier en cellules des feuilletts embryonnaires (Pettinato et al., 2014). Ils miment ainsi certaines structures du développement embryonnaire. Cependant, leur capacité de différenciation dépend grandement de la qualité des EB obtenue qui varie selon le nombre de cellules, leur taille et le milieu utilisé (Pettinato et al., 2015). Les EB sont ensuite placés en

condition de culture avec les cytokines nécessaires pour leur différenciation en progéniteurs hématopoïétiques.

Après la différenciation des cellules souches en progéniteurs hématopoïétiques, les cellules $CD34^+$ sont communément isolées par traitement enzymatique des cellules en cocultures ou après digestion enzymatique des EB (**Figure 10C**). Les progéniteurs peuvent ainsi être étudiés et placés dans de nouvelles conditions expérimentales. En effet, leur remise en culture sur des cellules stromales (**Figure 10D**) ou dans des conditions en milieu spécifique sans feeders (**Figure 10E**) permet de poursuivre leur différenciation. Pour la différenciation vers les lymphocytes B, les cellules $CD34^+$ sont mises en culture sur un tapis de cellules stromales MS-5 (Carpenter et al., 2011; French et al., 2015), tandis que pour une différenciation en lymphocytes T, on utilise un tapis de cellules stromales OP9-DL1 (de Pooter and Zuniga-Pflucker, 2007). Il s'agit d'OP9 modifiées pour exprimer DLL1, un ligand du récepteur NOTCH1 dont le signal est important pour un engagement vers la lignée lymphoïde T (Radtke et al., 2004).

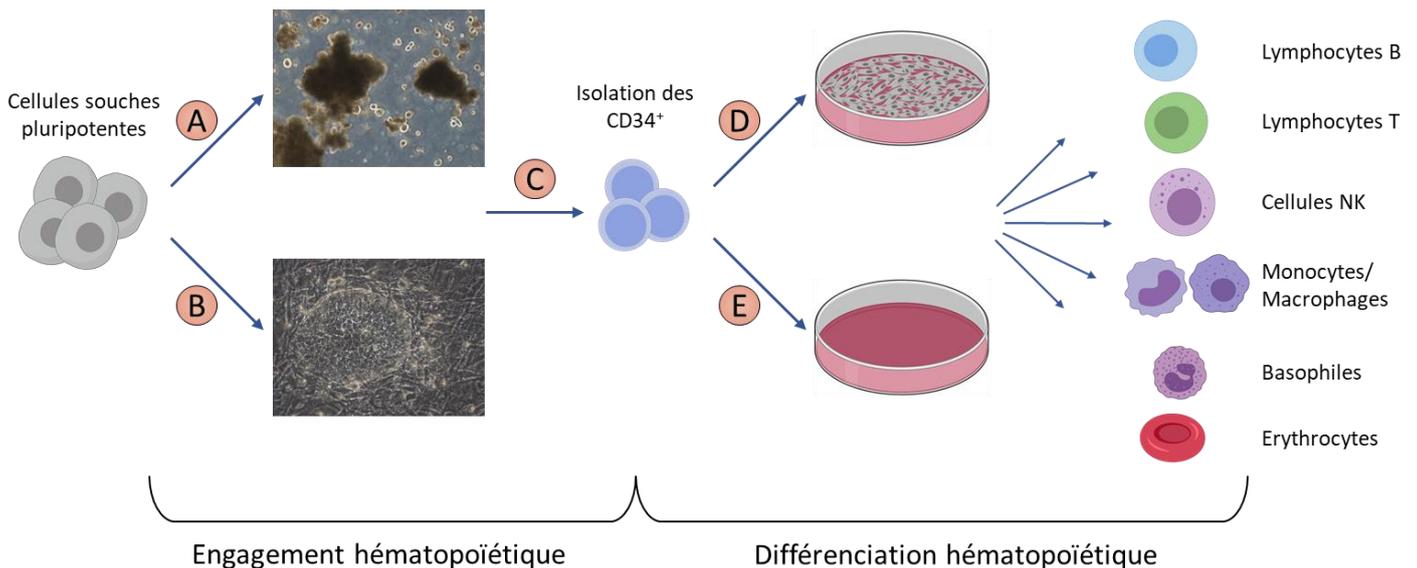


Figure 10 : Différenciation hématopoïétique *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes

4) La lymphopoïèse B

a) Les progéniteurs des lymphocytes B

Comme toutes les cellules immunitaires, les lymphocytes B sont générés dans la moelle osseuse avant de rejoindre la circulation sanguine. La demi-vie du lymphocyte B en périphérie est de 18 jours et ils doivent se renouveler continuellement (Macallan et al., 2005). Ils se différencient à partir des CLP et on distingue plusieurs stades progéniteurs de lymphocytes B avant l'obtention d'un lymphocyte B mature (**Figure 11A**, sont notées en rouge, les autres appellations que l'on peut trouver).

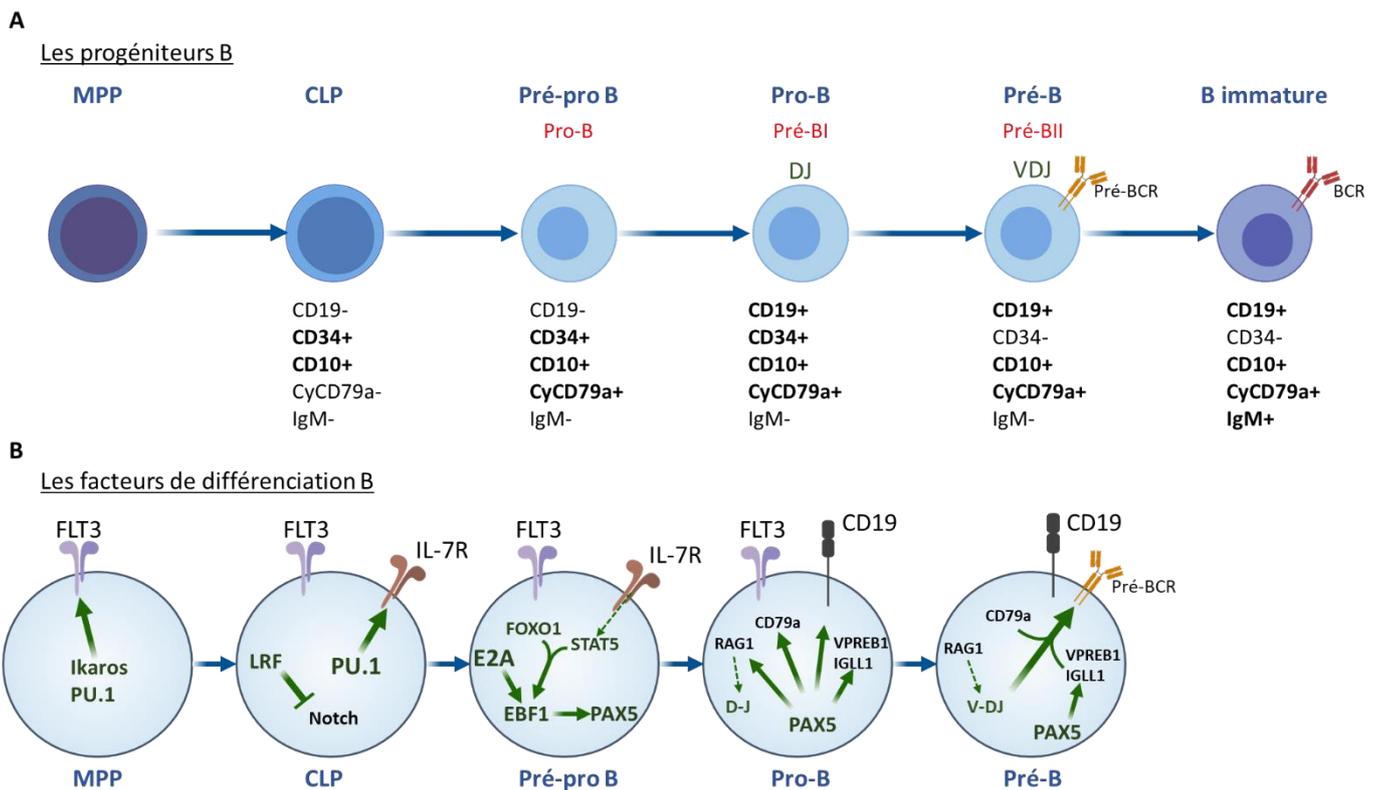


Figure 11 : Les différents stades et facteurs de la lymphopoïèse B

Figure 12B adapté de Nutt, S. L. and B. L. Kee (2007). "The transcriptional regulation of B cell lineage commitment." *Immunity* 26(6): 715-725.

Le premier stade de la lymphopoïèse B suivant les CLP est celui des Pré-Pro B. Ces cellules ne sont pas totalement engagées et n'expriment pas le CD19 qui est une molécule

extra-membranaire spécifique des lymphocytes B. Tout comme les CLP, les cellules Pré-Pro B expriment le CD34 et le CD10 mais sont caractérisées par l'expression intra-cytoplasmique du CD79a, le corécepteur du BCR (Wentink et al., 2019). En effet, par immunophénotypage des cellules de la moelle osseuse, Dworsak *et al.* ont montré que les cellules CD34⁺CD10⁺ expriment le CD79a avant l'expression du CD19 (Dworzak et al., 1998). De plus, les Pré-Pro B entreprennent les recombinaisons DJ des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH).

Les Pré-pro B se différencient en cellules Pro-B (ou Pré-BI) qui expriment le CD19 et recombinent les segments V(D)J des IgH (Martensson and Ceredig, 2000). Brièvement, ces recombinaisons consistent à joindre les segments D et J puis les segments V et DJ présents au niveau du locus des IgH. Ce système fait intervenir les deux protéines RAG1 et RAG2 pour couper l'ADN ainsi que la Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) qui intervient dans les processus de réparation de l'ADN (Boboila et al., 2012). La TdT est essentielle car elle entraîne l'addition de nucléotides aléatoires lors de la réparation qui forment la diversité fonctionnelle responsable de la grande diversité du répertoire lymphocytaire B (Repasky et al., 2004).

La transition du stade Pro-B au stade Pré-B se traduit par une perte de l'expression du CD34 et la fin du réarrangement des IgH permettant l'expression cytoplasmique de l'Ig μ (cylg μ). L'Ig μ est alors exprimée à la membrane en association avec la chaîne légère substitutive et les corécepteurs CD79a (Iga) et CD79b (Igb) formant ainsi le Pré-BCR (Monroe, 2006). La chaîne légère substitutive permet la formation du Pré-BCR étant donné l'absence de réarrangement des chaînes légères (IgL) à ce stade. La chaîne légère substitutive est constituée de deux sous-unités, VPB1 pour la partie constante et λ 5 (IGLL1) pour la partie variable. Récemment, Wentink *et al.* ont montré que les Pro-B (ou Pre-BI) et les Pre-B (ou Pré-BII) constituent des populations hétérogènes d'un point de vue phénotypique (Wentink et al., 2019). Les Pro-B peuvent ainsi être divisés en une population « true-Pro-B » cylg μ ⁻CD19⁺CD34⁺TdT⁺ et en une population cylg μ ⁻CD19⁺CD34⁻TdT^{+/-}. De la même manière, ils distinguent les Pré-B cylg μ ⁺CD19⁺CD34⁻TdT⁻ des Pré-B cylg μ ⁺CD19⁺CD34⁺TdT⁺. De plus, ils observent que les true-Pro-B cylg μ ⁻CD19⁺CD34⁺TdT⁺ n'ont pas de réarrangements productifs in-frame de leurs segments V(D)J en accord avec l'absence d'expression cytoplasmique de l'Ig μ . Bien que les Pro-B cylg μ ⁻CD19⁺CD34⁻TdT⁻ présentent des réarrangements productifs de la même manière que les Pré-B, ces réarrangements ne seraient pas encore exprimés à leur stade, justifiant l'absence de cylg μ (Wentink et al., 2019). Ainsi, ces deux populations Pro-B et

Pré-B constitueraient un continuum durant lequel les progéniteurs présenteraient différents stades de différenciation selon l'avancée des recombinaisons des IgH. L'expression du Pré-BCR va permettre aux cellules Pré-B de passer le checkpoint de la sélection positive (Melchers, 2015). Cette étape consiste à sélectionner les lymphocytes Pré-B ayant effectué des recombinaisons des chaînes lourdes permettant une expression productive du Pré-BCR. Ainsi, les lymphocytes Pré-B ayant un Pré-BCR non productif ne sont pas sélectionnés et sont éliminés du répertoire B. A l'inverse, les lymphocytes Pré-B sélectionnés reçoivent un signal de survie leur permettant d'effectuer les recombinaisons VJ des chaînes légères des immunoglobulines (IgL) et d'exprimer ainsi un BCR complet IgM (IgH + IgL + CD79a + CD79b).

Les lymphocytes de la moelle osseuse ayant une expression du BCR sous forme d'IgM constituent les lymphocytes B immatures. Durant le stade immature, les lymphocytes B acquièrent la tolérance aux antigènes du soi qui correspondent à tous les motifs antigéniques propres à chaque individu. Ce processus permet d'éviter la mise en place de réponses immunitaires dirigées contre l'organisme (autoréactivité) en entraînant la survie des lymphocytes B ne reconnaissant pas de motifs du soi. Les lymphocytes B qui reconnaissent un antigène du soi membranaire pourront effectuer un deuxième réarrangement de la chaîne légère non réarrangée (correspondant aux mécanismes d'édition du récepteur) afin de perdre leur autoréactivité (Halverson et al., 2004). Si le deuxième réarrangement n'est pas fonctionnel ou entraîne toujours une autoréactivité, cela conduit à la délétion clonale du lymphocyte B. Dans le cas où les lymphocytes B reconnaissent un motif du soi soluble, ils deviennent anergiques et ne pourront pas construire de réponse effectrice. Les lymphocytes B immatures constituent le dernier stade de la lymphopoïèse des lymphocytes B et leur processus de maturation hors moelle osseuse ne fait pas partie de notre champ d'étude. Succinctement, ces derniers quittent la moelle osseuse et migrent vers la rate (Tussiwand et al., 2009). Dès cet instant, les lymphocytes B immatures circulants sont qualifiés de « transitionnels » et sont toujours soumis au processus de tolérance périphérique. Ils expriment le CD38, le CD24 et un deuxième type d'immunoglobuline, l'IgD, et peuvent être subdivisés en 3 populations transitionnelles : T1, T2 et T3 (Sanz et al., 2019). Ces populations continuent leur maturation dans la rate pour devenir des lymphocytes B naïfs matures. Ces derniers circulent à nouveau et rejoignent les zones folliculaires des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes B folliculaires (FO) sont en contact avec les lymphocytes T

Helpers et sont à l'origine des réponses T dépendantes mémoires et humorales, par différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps dans le centre germinatif et *in fine* dans la moelle osseuse (Boothby et al., 2019). Une minorité de lymphocytes B reste dans la zone marginale de la rate (lymphocytes B-MZ) et est responsable de la formation de plasmablastes extra-folliculaires qui migrent, présentent les antigènes aux lymphocytes T et génèrent des anticorps lors des réponses antigéniques T indépendantes.

b) Les mécanismes de la lymphopoïèse B

i. Les niches hématopoïétiques

A l'instar de toutes les cellules immunitaires, les lymphocytes B sont générés dans la moelle osseuse tout au long de la vie grâce à la différenciation des CSH au sein des niches hématopoïétiques qui offrent l'environnement nécessaire pour induire la différenciation vers les types cellulaires hématopoïétiques. La moelle osseuse contient des cellules adhérentes appelées cellules stromales qui confèrent certains signaux nécessaires à l'hématopoïèse. Elles incluent les cellules réticulaires, les cellules endothéliales et les macrophages. L'identification de ces niches est donc importante tant elles renferment l'ensemble des processus hématopoïétiques. Cependant, les caractéristiques des niches et leurs mécanismes impliqués dans l'hématopoïèse sont peu connus étant donné leur localisation dans la moelle osseuse qui crée une « black box ». La moelle osseuse qui réside au sein de la cavité médullaire des os est traversée par de nombreux réseaux de sinus médullaires qui joignent le cortex osseux et le sinus central (**Figure 12**) (Nagasawa, 2006). Les niches hématopoïétiques sont extravasculaires et se situent donc entre les sinus médullaires. Cependant, les résultats contradictoires quant à leur localisation soulignent la difficulté de définir précisément où se déroule l'hématopoïèse dans la moelle osseuse (Tokoyoda et al., 2004).

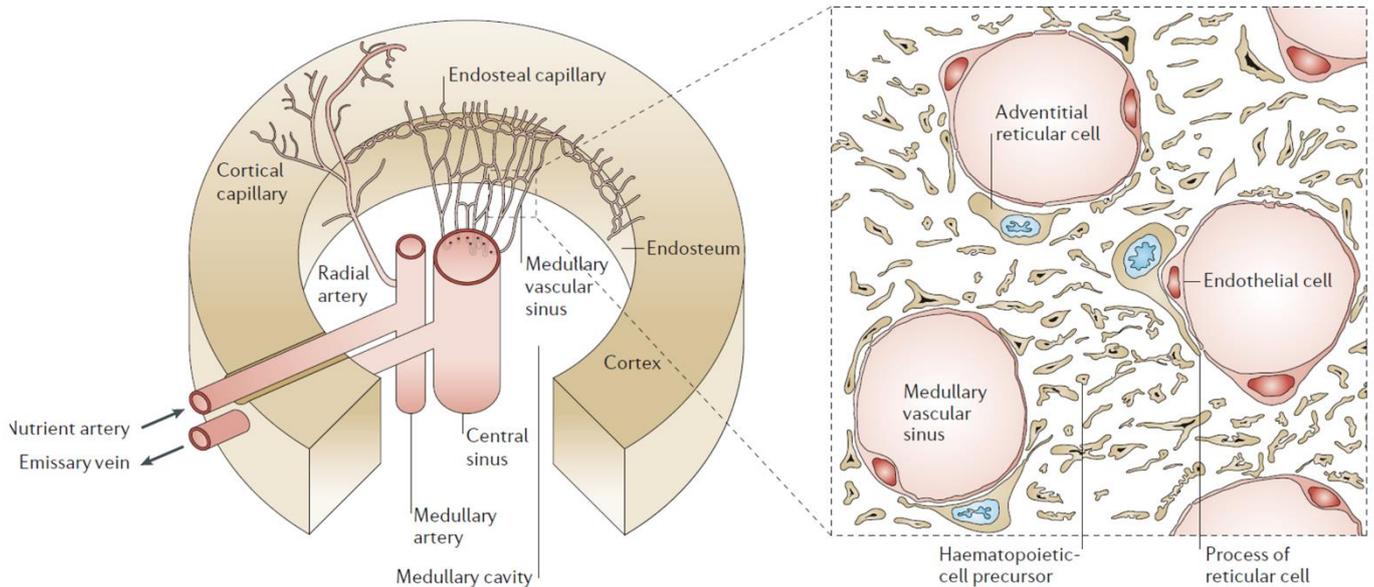


Figure 12 : La moelle osseuse contient les niches hématopoïétiques

Figure issue de Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." *Nat Rev Immunol* 6(2): 107-116.

Un des mécanismes qu'utilisent les cellules des niches pour la différenciation hématopoïétique est la production de cytokines qui sont des molécules sécrétées jouant un rôle important dans la stimulation des cellules et leur différenciation. L'utilisation du modèle de culture de lymphocytes B sur cellules stromales *in vitro* développé par Whitlock and Witte (Whitlock and Witte, 1982) ainsi que le développement de modèles murins KO pour certains gènes ont permis d'identifier plusieurs cytokines impliquées dans la différenciation des lymphocytes B.

CXCL12, également appelée SDF-1 et dont le récepteur principal est CXCR4, est la cytokine jouant un rôle pendant le stade le plus précoce des lymphocytes B. En effet, les souris déficientes en CXCL12 ont un défaut de génération des Pré-pro B (Egawa et al., 2001). Par microscopie, Tokoyoda *et al.* observent que la plupart des cellules Pré-pro B, traquées par l'expression de FLT3, sont en contact des cellules réticulaires CXCL12^{hi}, tandis que les cellules Pro-B en sont éloignées (Tokoyoda et al., 2004). L'IL-7 est une autre cytokine produite par les cellules stromales et soutenant la lymphopoïèse des lymphocytes B (Nagasawa et al., 1994; Sudo et al., 1989). Elle est impliquée dans la lymphopoïèse en général étant donné le défaut de génération de progéniteurs des lymphocytes B et T dans un modèle murin déficient en IL-

7R (Peschon et al., 1994). L'IL-7 semble jouer un rôle plus particulièrement au stade des progéniteurs de la lignée lymphoïde B. En effet, bien qu'un taux normal de CLP soit généré chez les souris déficientes en IL-7, ces CLP ne présentent pas de signaux d'engagement vers la lignée lymphoïde B. Ces CLP IL-7^{-/-} possèdent des expressions d'Ebf1 et de Pax5 plus faibles que celles des CLP des souris wild-type (Dias et al., 2005) tout en maintenant leur potentiel de différenciation vers les lymphocytes T et les cellules NK. Ces résultats sont confirmés par une autre étude montrant que les souris KO pour IL-7Ra ou pour l'IL-7 présentent un arrêt du développement des lymphocytes B au stade Pré-pro B (Kikuchi et al., 2005). Kikuchi *et al.* ont également montré l'effet direct du signal IL-7R sur l'expression d'EBF1. En effet, l'expression d'EBF1 qui est absente dans les cellules Pré-pro B IL-7^{-/-} et IL-7Ra^{-/-}, peut être restaurée uniquement dans les cellules IL-7^{-/-} *in vitro* en présence d'IL-7. Enfin, par microscopie, Tokoyoda *et al.* ont montré qu'en plus d'être éloignées des cellules réticulaires CXCL12^{hi}, les Pro-B sont en contact des cellules exprimant l'IL-7, tandis que les pré-B sont éloignées de ces deux types cellulaires (Tokoyoda et al., 2004). Les progéniteurs entrent donc en contact successivement avec les cellules réticulaires CXCL12^{hi} au stade Pré-pro B et ce contact est nécessaire à leur différenciation en cellules Pro-B. Ces dernières ont besoin d'être en contact avec les cellules IL-7⁺ pour se différencier en progéniteurs Pré-B, qui eux n'ont pas besoin de ces deux cytokines pour poursuivre leur engagement en B immatures. Ce modèle est en accord avec le fait que l'axe IL-7/IL7R réprime la différenciation des Pré-B en B immatures par altération du signal du Pré-BCR et par la répression de la transcription de Rag1 et Rag2 (Ochiai et al., 2012).

Les souris qui présentent une déficience en Flt3L présentent jusqu'à deux fois moins de Pré-pro B et une faible diminution des Pro-B sans impact sur le nombre de lymphocytes B matures (Sitnicka et al., 2003). Ces résultats montrent l'importance du Flt3L au stade précoce Pré-pro B du développement des lymphocytes B et concordent avec la forte expression du FLT3 par les CLP (Kikushige et al., 2008). Le SCF (Stem Cell Factor), ligand du récepteur SCFR (codé par le gène KIT), est une cytokine essentielle de l'hématopoïèse jouant un rôle important dans la stimulation et la différenciation des HSC. Son action sur le développement des lymphocytes B a été montrée *in vitro* par sa capacité à stimuler la prolifération et la différenciation des Pro-B en synergie avec l'IL-7 (McNiece et al., 1991). De plus, les modèles murins viables pour une déficience en KIT ont un nombre normal de Pré-pro B mais une

diminution des Pro-B et des Pré-B en comparaison des souris WT. (Waskow et al., 2002). Enfin, la stimulation de l'axe RANK/RANKL est également importante dans la lymphopoïèse des lymphocytes B et particulièrement durant la transition Pro-B vers Pré-B. En effet, dans leur modèle de reconstitution d'une souris KO pour RAG à partir d'une souris donneuse déficiente pour RANKL, Kong *et al.* observent un nombre normal de Pro-B mais une diminution du nombre de Pré-B (Kong et al., 1999).

ii. Les facteurs intracellulaires

La différenciation hématopoïétique des lymphocytes B est celle qui a été la plus étudiée, notamment par la disponibilité des modèles de différenciation B *in vitro* et par la facilité d'analyse des lymphocytes B *in vivo*. Ainsi, en plus des cytokines, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en lymphocytes B ont été découverts.

Durant l'hématopoïèse, les progéniteurs multipotents MPP constituent le premier choix d'engagement vers les cellules myéloïdes, les érythrocytes/mégacaryocytes ou les lymphocytes (Cheng et al., 2019). IKAROS et PU.1 sont impliqués dans la différenciation en lymphocytes et donc vers les progéniteurs CLP (Nutt and Kee, 2007) (**Figure 11B**). Grâce à un modèle murin KO pour le gène *Ikaros*, Yoshida *et al.* ont observé la présence de MPP (Yoshida et al., 2006). Cependant, ces MPP isolés et différenciés *in vitro* en condition single-cell génèrent des colonies restreintes aux lignées myéloïdes avec de rares colonies au potentiel myéloïde/lymphoïde qui génèrent des lymphocytes T mais pas des lymphocytes B. Ils ont montré, avec le même modèle murin, que l'expression de FLT3 à la surface des MPP est dépendante d'*Ikaros*. Or, FLT3 est exprimé faiblement sur les LT-HSC humains et fortement sur les CLP (Kikushige et al., 2008). L'expression de FLT3 dans la lignée myéloïde disparaît dans le processus de génération des Pré MegE et augmente dans la voie de génération des GMP. Ainsi, *Ikaros* est un facteur de transcription important pour les MPP et dans leur engagement vers les lignées lymphoïdes. PU.1 est impliqué dans la spécification des lignées lymphoïdes et myéloïdes (Nutt and Kee, 2007). Le KO pour PU.1 entraîne, dans le foie fœtal de souris, une diminution de la différenciation des HSC vers les GMP et les CLP, mais induit une augmentation des progéniteurs Pré MegE comparées aux conditions WT (Iwasaki et al., 2005). De plus, les HSC issus du KO permettent seulement la différenciation en Pré MegE *in vitro*, soulignant l'implication de PU.1 dans le développement des lignées myéloïdes et lymphoïdes. PU.1 joue

un rôle dans l'engagement vers la lignée lymphoïde du fait de son implication directe dans l'activation de la transcription de l'IL-7R, dont le signal est nécessaire pour cet engagement. En effet, DeKoter *et al.* ont montré que les progéniteurs de souris KO pour PU.1 ne possèdent aucun transcrite du gène *IL-7Ra* et PU.1 se fixe sur ses séquences promotrices (DeKoter *et al.*, 2002). Ils montrent également que la transduction rétrovirale de l'IL-7Ra au sein des progéniteurs PU.1^{-/-} restaure leur capacité à proliférer et à se différencier en lymphocytes Pro-B sur des cellules stromales en présence d'IL-7.

Le deuxième choix de type cellulaire est celui de la différenciation des CLP qui sont multipotents vers les lymphocytes B, ce qui nécessite donc l'initiation de gènes spécifiques de l'engagement des lymphocytes B et la répression de ceux spécifiques des lignées lymphoïdes T et NK. Le signal Notch est le facteur principal qui induit une différenciation en lymphocytes T dans le choix de la différenciation T vs B (Maillard *et al.*, 2005). Ainsi, l'un des premiers événements intervenant dans l'engagement spécifique en lymphocyte B, est l'activation de LRF qui réprime le signal Notch (Maeda *et al.*, 2007). En effet, Maeda *et al.* ont montré que les souris KO pour le gène *Zbtb7a* codant pour LRF présentent une diminution presque totale de leurs Pro-B sans influencer leur nombre de Pré-pro B. Les CSH provenant de ces souris KO ne parviennent pas à se différencier *in vitro* en stade Pro-B sur des cellules stromales OP9 tandis qu'elles peuvent générer des lymphocytes T sur des cellules stromales OP9-DL1 exprimant le ligand Notch1. Ces résultats montrent donc le rôle important de l'expression de LRF au stade Pré-pro B pour empêcher un engagement en lymphocyte T via le signal Notch, dont le ligand Notch1 est exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse.

Le gène *E2A* (*TCF3*) codant pour les deux facteurs de transcription E12 et E47 est également essentiel dans la différenciation des lymphocytes B au stade précoce (Nutt and Kee, 2007). Les souris KO pour *E2a* ont une nette diminution de leur nombre de lymphocytes B dans la moelle osseuse aux stades précoces et matures et ce, sans affecter les lignées lymphoïdes T et myéloïdes (Bain *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1994). De plus, l'absence de réarrangement DJ associée à une forte diminution des transcrits *Rag1* dans le foie fœtal en condition KO, comparée à la condition WT, montre que *E2a* régule les recombinaisons V(D)J des Ig et l'activation de *Rag1* qui est impliquée dans ces recombinaisons. De même, le KO pour *E2a* entraîne la diminution des transcrits Pax5 et des transcrits Cd19 et λ5 dont Pax5 contrôle l'expression. Ces observations suggèrent l'implication de *E2a* dans l'activation de Pax5 et

montrent que E2A est impliqué très tôt dans l'engagement vers la lignée lymphoïde B. Les travaux de Kee *et al.* sur l'activation de l'expression de E2A dans une lignée de macrophages ont montré une induction de l'expression de EBF1 et de PAX5, démontrant ainsi que EBF1 intervient après E2A dans cette voie de différenciation (Kee and Murre, 1998).

L'activation des facteurs de transcription EBF1 et PAX5 est spécifique de l'engagement en lymphocyte B (Mandel and Grosschedl, 2010). L'activation du gène *EBF1* est le plus précoce et est déclenchée par le facteur de transcription FOXO1 en association avec le signal STAT5 (Somasundaram et al., 2015). Cependant, les cellules qui expriment EBF1 ne sont pas totalement engagées en lymphocytes B. Pour stabiliser et maintenir cette décision, EBF1 active la transcription de *PAX5* qui est qualifié de « master regulator » de la lignée lymphoïde B et, une fois exprimé en quantité suffisante, il permet l'engagement définitif en lymphocyte B. En effet, les souris déficientes en *Pax5* voient leur nombre de lymphocytes T dans la rate drastiquement augmenté, résultant d'un défaut de différenciation des lymphocytes B au stade précoce (Urbanek et al., 1994). *PAX5* induit l'engagement en lymphocytes B en activant l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le signal du Pré-BCR telles que CD19 (Kozmik et al., 1992), CD79a (mb-1) (Fitzsimmons et al., 1996) et les deux sous-unités de la chaîne légère substitutive VPREB1 et $\lambda 5$ (Tian et al., 1997). *PAX5* est également impliqué dans la répression de Notch1 et donc du signal d'engagement vers la lignée lymphoïde T.

Bien que les avancées soient nombreuses dans le cadre de la lymphopoïèse B, les facteurs des niches hématopoïétiques et les signaux intracellulaires impliqués dans cet engagement ne sont pas totalement connus. La précision de ces mécanismes est importante pour une meilleure compréhension de l'hématopoïèse et permettra d'optimiser les modèles de différenciation *in vitro*.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les lymphocytes B régulateurs représentent une population hétérogène dont l'activité immunosuppressive repose sur plusieurs mécanismes et est impliquée dans plusieurs pathologies. En transplantation rénale, notre équipe a mis en évidence un nombre plus élevé de Bregs GZMB⁺ chez les patients tolérants un greffon rénal sans traitement immunosuppresseur comparé aux patients transplantés stables sous traitement immunosuppresseur et aux volontaires sains. Ces Bregs GZMB⁺, de patients transplantés ou de volontaires sains, sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T *in vitro* d'une manière dépendante du GZMB et du contact cellulaire. Ces Bregs GZMB⁺, également décrits en oncologie, présentent un intérêt particulier d'utilisation en clinique du fait de leur fort pouvoir régulateur.

C'est autour de cette problématique que s'inscrit mon travail de thèse qui avait pour objectif **d'amener les Bregs GZMB⁺ vers une utilisation en clinique** et pour lequel j'ai développé deux axes d'études :

1- Génération de Bregs GZMB⁺ à partir de cellules souches pluripotentes induites

Bien que nous soyons capables de générer des Bregs GZMB⁺ *in vitro* par stimulation de lymphocytes B totaux, leur pouvoir régulateur diminue brutalement après 3 jours de culture. Pour remédier à ce problème, mon objectif était de générer des Bregs GZMB⁺ à partir de cellules souches pluripotentes induites. En effet, les hiPSC ont l'avantage d'être une source inépuisable de cellules de par leur autorenouvellement et il est possible de choisir le donneur d'origine et donc d'un fond génétique susceptible de faciliter la transplantation des cellules dérivées des hiPSC. J'ai tout d'abord travaillé sur la génération de lymphocytes B à partir d'hiPSC. En parallèle, étant donné que les mécanismes induisant la production du GZMB par les lymphocytes B sont mal connus, j'ai cherché à induire l'expression du GZMB dans les hiPSC par génie génétique afin de générer des lymphocytes B GZMB⁺ après différenciation.

2- Caractérisation des Bregs

Du fait de l'hétérogénéité mécanistique et phénotypique des Bregs, il est actuellement difficile d'étudier leur rôle en situation clinique. L'utilisation des marqueurs déjà identifiés permet d'isoler des populations relativement enrichies en Bregs et qui ne représentent pas les Bregs dans leur ensemble car aucun phénotype ni facteur de transcription commun des Bregs n'ont été décrits. De plus, certains Bregs tels que les GZMB⁺ manquent de marqueurs membranaires spécifiques ce qui limite leur isolation et leur étude fonctionnelle. Il est donc essentiel de mieux identifier les Bregs afin d'étudier plus efficacement leurs mécanismes de génération et de régulation et permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans cet axe, mon objectif était de mieux caractériser les Bregs par méta-analyse transcriptomique, à la fois chez l'Homme et chez la souris, afin d'identifier si, au sein de la population hétérogène des Bregs, il existe une signature transcriptomique commune.

Les résultats de ces deux axes seront abordés comme ci-après :

Génération de Bregs GZMB⁺ à partir de cellules souches pluripotentes induites

- 1- Présentation de l'Article n°1 soumis sur la différenciation des hPSC en lymphocytes B
- 2- Présentation des résultats d'intégration de l'expression du GZMB dans les hPSC

Article n°2 : Méta-analyse transcriptomique des lymphocytes B aux propriétés régulatrices

RÉSULTATS

I. Génération de Bregs GZMB⁺ à partir d'hIPSC

1) Article n°1

Toward a better definition of hematopoietic progenitors suitable for B cell differentiation

Florian Dubois, Anne Gaignerie, Léa Flippe, Jean-Marie Heslan Laurent Tesson Mélanie Chesneau, Fabienne Haspot, Sophie Conchon, Laurent David, Sophie Brouard

(Article en révision)

Le succès de la génération de cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules différenciées a ouvert de nouvelles opportunités pour la modélisation de pathologies, le screening de nouveaux traitements et pour les thérapies cellulaires. Nous nous sommes intéressés à la différenciation des hIPSC en lymphocytes B car ces derniers ont un intérêt tout particulier en thérapie cellulaire étant donné leur double rôle en tant qu'effecteurs et régulateurs du système immunitaire et leur implication dans de nombreuses pathologies. Nous avons ainsi utilisé un protocole déjà publié pour différencier à la fois les hESC et les hIPSC en lymphocytes B sur deux tapis de cellules stromales successifs OP9 puis MS-5. Les cellules CD34⁺ de sang de cordon ombilical (UCB) ont été utilisées comme contrôle de la différenciation en lymphocytes B. Bien que nous ayons généré de faibles taux de lymphocytes B, nous sommes parvenus à résoudre la faible génération de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺CD43⁺ en utilisant une condition en cytokine appropriée. Dans cette étude, nous exposons les difficultés à générer des progéniteurs hématopoïétiques capables de se différencier en lymphocytes B et soulignons le phénotype CD31^{int}CD45^{int} comme possible marqueur de ces progéniteurs. Définir précisément ces progéniteurs de la lignée lymphoïde permettra d'améliorer leur étude et d'identifier les signaux responsables de l'engagement en lymphocytes B *in vitro*.

Toward a better definition of hematopoietic progenitors suitable for B cell differentiation

Florian Dubois¹, Anne Gaignerie², Léa Flippe¹, Jean-Marie Heslan^{1,2} Laurent Tesson² Mélanie Chesneau¹, Fabienne Haspot¹, Sophie Conchon¹, Laurent David^{1,2}, Sophie Brouard^{1*}

¹Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France.

²Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, FED 4203, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

Running title: Assessing B cell differentiation from hPSC.

Keywords: hESC, hIPSC, B cells, hematopoietic progenitors, hematopoietic differentiation

***Corresponding author:** Dr. Sophie Brouard, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie INSERM UMR1064, Université de Nantes, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, RTRS « Centaure », 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Phone: +33 2 40 08 74 10, Email: sophie.brouard@univ-nantes.fr; richard.danger@univ-nantes.fr

Abbreviations : hPSC: Human pluripotent stem cells; hIPSC: Human induced pluripotent stem cells; hES: Human embryonic stem cells; Bregs: Regulatory B cells; UCB: Umbilical cord blood; FCS: Foetal calf serum; HSC: Hematopoietic stem cells.

Abstract

Human pluripotent stem cells (hPSC) have the unique potential to self-renew and differentiate in all cell types of the body. The success of inducing human pluripotent stem cells (hiPSC) from differentiated cells offers new opportunities for disease modeling, drug screening and cell-based therapy. Since B cells have been shown to have a dual effect both as effector and as regulator of immune responses in different clinical settings, we were interested in generating B cells from hPSC for future cell therapy. We used a published protocol to differentiate both human embryonic stem cells (hESC) and hiPSC into B cells onto OP9 and MS-5 stromal cells successively. B cells derived from umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells were used as control. While we obtained only low yield of B cells, we overcame issues in generating CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitors with appropriate cytokine conditions. We point out the difficulties to generate proper hematopoietic progenitors with lymphoid properties and highlight CD31^{int}CD45^{int} phenotype as a possible marker of hematopoietic progenitors suitable for B cell differentiation. Defining precisely the proper lymphoid progenitors will improve the study of their lineage commitment and the signals needed during the *in vitro* process.

Introduction

B cells are important actors of immunity notably via their humoral responses with antibody production but also as antigen presenting cells leading to T cell activation (Rodriguez-Pinto 2005). B cells also display regulatory functions via cytokine production, cell-to-cell contact and by promoting regulatory T cells (Rosser and Mauri 2015). In humans, B cells with suppressive functions have thus been demonstrated in different clinical settings, including cancer, autoimmunity and tolerance towards kidney allografts (Iwata et al. 2011, Chesneau et al. 2014).

We showed that such B cells with regulatory properties were increased in patients with long term graft acceptance (Chesneau et al. 2015). These regulatory B cells (Breg(s)) were able to efficiently block effector T cell proliferation via production of granzyme B and in a contact-dependent manner (Chesneau et al. 2015). Other Bregs have been shown to display suppressive functions on different cell types and through multiple mechanisms, rendering Bregs attractive for therapy in different conditions (Mauri and Menon 2015). However, Breg based-immunotherapy and their potential use in the clinic suffer several limitations. First, their use would need to rely on their clear characterization and the possibility of isolating them and to date, no consensual phenotype has been proposed thus rendering their clinical application very difficult. Second, Bregs are small populations in humans and their expansion in vitro is very limited, and finally, their allogenic origin remains a major problem for clinical application.

To circumvent these issues, we envisioned the use of hPSC, which are attractive in cell therapy given their capacity of self-renewal, to differentiate into multiple cell lineages and the possibility to choose the donor cells. Recent efforts have been made to generate proper hematopoietic stem cells from hPSC using different strategies, either by coculturing hPSC with murine bone marrow stromal cells or by the differentiation as 3D clusters of embryoid bodies (Kaufman 2009, Pettinato et al. 2014). But today, committing hPSC toward B cells remains a challenging process. In this study, we tried to generate B cells by implementing the available protocol (French et al. 2015) and we characterized these cells in comparison with B cells derived from UCB CD34⁺ cells. We show that concomitant CD34 and CD43 expression by hematopoietic progenitors is not a phenotype describing a differentiation state sufficient

before engaging B cell differentiation. We rather propose advanced progenitors displaying a CD31^{int}CD45^{int} phenotype as cells with proper lymphoid potential.

Material and methods

Human pluripotent stem cells, OP9 cells, MS-5 cells and UCB CD34⁺ cells.

hiPSC L71.019 (Gaignerie et al. 2018), hiPSC MIPS203 (Kilens et al. 2018) and H9 hESC (Thomson et al. 1998) were cultured on Matrigel coated plates, in mTeSR1 media (Stem Cell Technologies). Cells were weekly passed as clumps by a non-enzymatic method (XF passaging solution, Miltenyi Biotec). Cells were regularly tested for mycoplasma.

OP9-GFP stromal cells were kindly provided by Juan-Carlos Zuniga-Pflucker, University of Toronto. OP9 cells were cultured in OP9 media consisted in aMEM containing 20% foetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin (all from Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) on gelatin coated plates.

MS-5 stromal cells were obtained from DSMZ (ACC 441, DSMZ, Brunswick, Germany). MS-5 cells were cultured in aMEM containing 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin on gelatin coated plates. All cells were cultured at 37°C under 5% CO₂ and atmospheric O₂ conditions.

Human umbilical cord blood (UCB) was obtained from Nantes University Hospital. UCB CD34⁺ cells were isolated by positive selection on magnetic columns according to the manufacturer's instructions (CD34 MicroBead Kit; Miltenyi Biotec).

B cell differentiation

The first step was to generate CD34⁺ progenitors. Confluent hPSCs were harvested after dispase treatment (STEMCELL technologies, Vancouver, Canada) 5min at 37°C. Then, 1-1.5x10⁶ cells were seeded as clumps in 10cm dishes on a monolayer of over-confluent OP9 stroma. Cells were cultured as previously described (Carpenter et al. 2011, French et al. 2015) in aMEM containing 20% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 100µM monothioglycerol (MTG) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Total culture media was changed the first day to remove unattached cells and 50% of the media was systematically renewed at Day 4, 6 and 8. According to the different experiments, media was supplemented with BMP4 (Peprotech, Rocky Hill, CT, USA), VEGF, SCF, Flt3L and IL-3 (all four from Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany) respectively. At Day 10, cells were harvested by treatment with Trypsine-EDTA 0.05% during 15-20min at 37°C. After filtration through 40µm pores, CD34⁺ cells were isolated by positive selection on magnetic columns according to the manufacturer's instructions.

CD34⁺ cells were then seeded onto a monolayer of MS-5 stromal cells. MS-5 cells were previously irradiated at 50Gy one day before and seeded at a density of 5×10^5 cells on gelatinised MW6 plates well. 5×10^4 CD34⁺ cells were seeded per well in 4ml of culture medium and cultured for 21 days at 37°C. Culture media consisted in aMEM containing 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 100µM MTG and SCF (50ng/ml), Flt3L (50ng/ml), IL-7 (20ng/ml) and IL-3 (10ng/ml) (all from Miltenyi Biotec). Culture media was changed every 5 days with the previous cytokine except IL-3.

Flow cytometry analysis

For CD34⁺ cell characterization, differentiated hPSCs at Day 10 and UCB CD34⁺ cells were stained with Fixable Yellow Dead Cell (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and the following antibodies CD34-PECy7 (clone 581; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD43-APC (clone 1G10; BD Biosciences), CD31-PE (clone WM59; BD Biosciences) and CD45-APC-Cy7 (clone 2D1; BD Biosciences). For B cell characterization, cells were stained with Fixable Yellow Dead Cell (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and the following antibodies CD19-BUV395 (clone SJ25C1; BD Biosciences), CD10-BB700 (clone W8E7; BD Biosciences), CD45-PECy7 (clone HI30; BD Biosciences), CD34-BV711 (clone 8G12; BD Biosciences), IgM-FITC (clone G20-127; BD Biosciences) and CD79a-BV421 (clone HM47; BD Biosciences). Extracellular staining was performed with $5 \cdot 10^4$ cells in PBS during 20min at 4°C. Intracellular staining of CD79a was performed in Perm Wash Buffer (eBioscience, Vienna, Austria) (30 min, 4°C) after fixation/permeabilization (eBioscience) (30 min, 4°C). Supervised analysis was performed with FlowJo v.10 software on CD43, CD45 and CD31 on CD34⁺ gated cells after doublet and dead cells exclusion. Fluorescence minus one (FMO) was used to gate on marked cells.

Gene expression analysis

At the different steps of the differentiation protocols, RNA was extracted from total cells with a minimum of $3 \cdot 10^5$ cells using the RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 0.5µg of RNA according to the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc). Expression analysis of *PAX5*, *VPREB1*, *IGLL1*, *IL-7RA*, *EBF1*, *RAG1*, *DNTT* and *POU5F1* (*OCT4*) was performed using TaqMan™ Gene

Expression Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc). References of probes are described in Table 1. PCR reactions were carried out with cDNA diluted to 1/5 in a final volume of 10 μ l to avoid PCR inhibition. Gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen and Livak 2008). Gene expressions were reported to the expression of both the housekeeping genes *GAPDH* and *HPRT* and to a calibrator with undetermined CT or CT with a value higher than 35, set to 40.

Results

Assessing B cell differentiation

Our goal was to generate B cells from hPSCs. To do so, we started by implementing a published protocol, outlined in Figure 1A (French et al. 2015). Briefly, hPSCs (H9 hESC and hIPSC L71.019) were differentiated toward CD34⁺ hematopoietic progenitors during 10 days onto a monolayer of OP9 stromal cells. Then, CD34⁺ cells were cultured onto a monolayer of MS-5 stromal cells for B cell differentiation for 21 days, in the presence of IL-7, IL-3, SCF and Flt3L. B cell differentiation was measured by the frequency of CD10⁺CD19⁺ B cells obtained after differentiation. CD34⁺ cells isolated from umbilical cord blood (UCB) were cultured in parallel in the same conditions, as positive control. Starting from H9 hESC, we obtained 5% of CD34⁺ and they did not express CD43, a crucial intermediate phenotype for B cell differentiation (French et al. 2015). This resulted in an impairment of B cell differentiation considering that less than 0.2% of CD10⁺CD19⁺ B cells were generated after 21 days of differentiation from these CD34⁺ (Figure 1B, 1C). In contrast and using the same protocol and conditions, UCB CD34⁺ cells efficiently engaged into CD10⁺CD19⁺ B cells (7.1%) at Day 21, without IgM expression (Figure 1C).

Cytokines trigger the generation of CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitors with low ability to differentiate into CD19⁺ B cells

Considering these first data, we set out to improve the generation of CD34⁺CD43⁺ on OP9 monolayers during CD34⁺ differentiation. Our strategy consisted in adding cytokines to the OP9 media, to trigger optimal hematopoietic differentiation from hESC. VEGF, SCF and Flt3L were kept in the medium from Day 1 to Day 10 at 10ng/ml with or without BMP4 (5ng/ml) and IL-3 (10ng/ml) as detailed in Figure 2A. We found that VEGF, SCF, Flt3L combined with IL-3 from Day 4 to Day 10 and without BMP4 improved CD34⁺ differentiation, increasing the yield of CD34⁺CD43⁺ cells from 2 to 6% (Figure 2B). However, B-cell differentiation conducted with these progenitors until Day 21 resulted in 0.2% of CD10⁺CD19⁺ B cells (Figure 2C) suggesting that hESC-derived CD34⁺CD43⁺ cells were not in a state permissive to B cell differentiation.

To further improve our protocol of differentiation, we kept the same cytokine cocktail than the one allowing the best CD34⁺CD43⁺ differentiation (i.e. VEGF, SCF, Flt3L constant and combined with IL-3, from Day 4 to 10), and we tested different concentrations of the cytokines. Starting from H9 hESC, we found that the concentration of 10ng/ml for our cytokine cocktail triggered the highest proportion of CD34⁺ (22.8%) and CD34⁺CD43⁺ progenitors (4.7%) (Figure 3A), without increasing the final CD10⁺CD19⁺ B cell proportion (<0.2%) (Figure 3B). Starting from hIPSC, there was no difference in CD34⁺CD43⁺ proportion according to the different concentrations of the cytokine cocktail used (Figure 3C), and as previously this resulted in only a low level of final CD10⁺CD19⁺ B cell proportion (0.7% at 10 ng/ml, Figure 3D).

Altogether our results indicate that modifying cytokine concentrations efficiently increased the CD34⁺CD43⁺ proportion in H9 hESC but did not significantly improve the subsequent CD10⁺CD19⁺ B-cell differentiation suggesting that CD43 expression by CD34⁺ progenitors is not sufficient to engage them toward B cell differentiation.

hPSC-derived CD34⁺ generated Pro-B and Pre-B cells on MS-5 stroma

During B cell differentiation, CD45⁺CD10⁺ common lymphoid progenitors (CLP) differentiate into CD79a⁺CD19⁻ Pre-Pro B cells and then into Pro-B and Pre-B cells included in the CD79a⁺CD19⁺ fraction. While using our protocol to generate CD34⁺ with the same cytokine condition at 10ng/mL, we wanted to better follow and appreciate their B cell differentiation. We thus analyzed during B cell differentiation, CD10⁺CD19⁺ B cell proportion among CD45⁺ cells and we looked at CD79a expression among the CD45⁺CD10⁺ lymphoid progenitors allowing us to distinguish CLP which are CD79a⁻CD19⁻, CD79a⁺CD19⁻ Pre-Pro B cells and the CD79a⁺CD19⁺ fraction composed of the Pro and Pre-B cells as detailed in Figure 4A. Starting B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells, we obtained 30% CLP, 50.74% Pre-pro B cells and 15% Pro-B and Pre-B cells among the CD45⁺CD10⁺ cell population (Figure 4B). During B cell differentiation of hESC-derived CD34⁺, we observed that all CD45⁺CD10⁺ were CLP at Day 7 and their frequency decreased to 82% at Day 21. Pre-pro B cells appeared between Day 7 and Day 14 and increased from 6.47% to 10.9% of CD45⁺CD10⁺ cells, from Day 14 to Day 21. Finally, the fraction consisting of Pro-B cells and Pre-B cells represented 1.25% of CD45⁺CD10⁺ at Day 14 and 10.7% of CD45⁺CD10⁺ at Day 21 (Figure 4C). These data show that CD34⁺ hematopoietic

progenitors were engaged into B lymphopoiesis reaching the stage of Pro-B and Pre-B cells, albeit in limited amounts.

hESC-derived cells express genes implicated in B cell commitment during B cell differentiation

We analyzed gene expression known to be important for B cell commitment in the course of B cell differentiation from CD34⁺ progenitors after 7, 14, and 21 days of culture on MS-5 stroma. We thus extracted RNA of total cells at these different time points and analyzed the transcripts expression of the following genes *PAX5*, *EBF1*, *VPREB1*, *IGLL1*, *IL-7RA* and *RAG1* (Figure 5). While *OCT4* (*POU5F1*) was used as pluripotency control, undifferentiated H9 hESC and tonsil B cells served as control of gene expression. At Day 21, B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells was characterized by a low gene expression for *PAX5*, *EBF1*, *IL-7RA* and *OCT4* and a high gene expression for *VPREB1*, *IGLL1* and *RAG1* (Figure 5A). Regarding differentiated hESC from Day 7 to Day 21, they harbor a low *PAX5* gene expression, a decreasing gene expression for *EBF1* and a slight increase for *IL-7RA* with their overall expression level similar to those obtained from UCB CD34⁺ cells (Figure 5B). We observed an expression of *VPREB1* gene starting at Day 14 while *IGLL1* gene expression is present at Day 7 and decreased during the differentiation. This is associated with an increase in *RAG1* expression from Day 7 to Day 21, known to be important for immunoglobulin (Ig) gene rearrangement leading to the formation of the Pre-BCR. *IL-7RA*, *IGLL1* and *VPREB1* expression levels were lower than during B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells, this could be explained by the lower number of B cells generated from hESC. Finally, during B cell differentiation from hESC-derived CD34⁺ cells, *OCT4* was not expressed compared to the undifferentiated hESC consistent with their exit from pluripotency. Thus, while we obtained few B cells from H9 hESC, these results are concordant with a normal process of early B cell differentiation.

UCB CD34⁺ cells exhibit a CD31^{int}CD45^{int} phenotype and differentiate into CD19⁺ B cells

The CD34⁺ differentiation is a crucial step to obtain hematopoietic progenitors in sufficient amount and abilities to generate B cells on MS-5 stroma. While UCB CD34⁺ cells succeeded to allow great B cell differentiation on MS-5 stroma (7%), CD34⁺ generated from both hESC and hPSC did not reach this efficiency. To better characterize the progenitors that could differentiate into B cells, we extended our profiling of the CD34⁺ cells and we measured the expression of CD31, an endothelial marker and CD45, a marker of hematopoietic cells expressed after CD43 during hematopoiesis on UCB CD34⁺ cells. We observed that UCB CD34⁺ cells expressed CD43 and were CD31^{int}CD45^{int} (Figure 6A). In contrast, CD34⁺ differentiated from hESC and hPSC using our same protocol as before with cytokines at 10ng/mL, expressed few CD45 and were mainly CD31^{hi} (Figure 6B). In addition, variation in cytokine concentrations did not increase CD31^{int}CD45^{int} proportion in CD34⁺ differentiated neither from hESC nor hPSC (Figure 6C). These results on UCB CD34⁺ cells suggest that hematopoietic progenitors possess a CD31^{int}CD45^{int} phenotype that should be reached by differentiated hPSC before engaging B cell differentiation.

On this basis, we hypothesized that CD34⁺ progenitors differentiated from hPSC were not at an optimal differentiation stage before engaging the B cell differentiation. Therefore, we stopped the CD34⁺ differentiation from hPSC at 8, 10 and 12 days and compared the CD34⁺ progenitor's ability to differentiate into B cells. As expected, we observed an increase in the proportion of CD43⁺CD45^{int}, CD43⁺CD45^{hi}, CD31^{int}CD45^{int} and a decrease in the proportion of CD43⁺CD45⁻ from Day 8 to Day 12 of CD34⁺ differentiation (Figure 7A). Interestingly, the proportion of CD31^{hi}CD45^{int} increased faster than the proportion of CD31^{int}CD45^{int} and reached a similar proportion at Day 12. However, despite a higher proportion of CD31^{int}CD45^{int} at Day 12, CD10⁺CD19⁺ B cells proportion was not increased upon B cell differentiation from these hPSC-derived CD34⁺ cells (Figure 7B).

Altogether, our results point out the difficulties to obtain hematopoietic progenitors with strong lymphoid abilities from hPSC. We obtained only low B cell proportion from hESC and hPSC. We show that while CD43 expression is needed in hPSC-derived CD34⁺ cells, CD43 is not sufficient for differentiation into B cells. UCB CD34⁺ cells easily differentiate into B cells and harbor a CD31^{int}CD45^{int} phenotype.

Discussion

Human pluripotent stem cells display unlimited self-renewal capacities and give rise to all cell types of the body. It is well accepted that during hematopoiesis in the embryo, the first wave starting in the extra-embryonic yolk sac gives rise to transient hematopoietic progenitors with differentiation potential restricted for primitive erythrocytes, megakaryocytes, and macrophages (Slukvin 2016, Kumar et al. 2019). Then, the definitive wave leads to adult HSC production with mature lymphoid-myeloid differentiation potential in the aorta-gonad-mesonephros (AGM). These HSC transit to the fetal liver before residing in the bone marrow for hematopoiesis during adult life (Julien et al. 2016). It is also accepted that adult HSC are produced from endothelial cells with hematopoietic capacities called hemogenic endothelium (HE). This HE possesses endothelial phenotype but undergoes endothelial-to-hematopoietic transition (EHT) to generate HSC that further differentiate into hematopoietic progenitors. The *in vitro* hematopoietic differentiation from both hESC and hiPSC has been described in numerous studies with multiple blood lineage formation (Kaufman 2009). Considering the dual role of B cells as effector and regulator of immune responses (Wasik et al. 2018, Oleinika et al. 2019) and their involvement in many pathological settings (Fillatreau et al. 2002, Iwata et al. 2011, Chesneau et al. 2015), we aim to attempt B cell differentiation from hiPSC. Indeed, hiPSC generation from differentiated cell types represents a real breakthrough in stem cell research and allow important opportunities for disease modeling, drug screening and cell-based therapy (Takahashi et al. 2007). Thus, B cell generation from hiPSC would offer several advantages including an unlimited cell source, the choice of cell donor origin and the possibility to modulate and control their gene expression in order to generate B cells with regulatory properties and potential clinical use.

French *et al.* succeeded in generating B cells from hiPSC by first culturing them onto OP9 stromal cells for 10 days without cytokines to generate CD34⁺ progenitors. CD34⁺ sorted cells were then cultured for 21 days onto MS-5 stromal cells with cytokines to reach 5% of CD10⁺CD19⁺ B cells (French et al. 2015). In this study, we tried to differentiate B cells from hESC and hiPSC following this protocol. While we were able to generate CD34⁺ cells from both hESC and hiPSC, these progenitors were not able to generate more than 0.2% B cells onto MS-5 stroma. In our hands, generated CD34⁺ cells lacked CD43 expression, which is the first marker expressed during hematopoiesis (Vodyanik et al. 2006) but also necessary for B cell differentiation (French et al. 2015). Different strategies have been published in the literature

to generate CD34⁺ hematopoietic progenitors from hPSC by their differentiation as 3D clusters of embryoid bodies in feeder-free conditions with cytokines (Chadwick et al. 2003, Xu et al. 2012, Larbi et al. 2014). To improve CD34⁺CD43⁺ generation, we tested the effect of cytokine addition during the 10 days coculture model of hIPSC onto OP9 stromal cells. Addition of cytokines allowed the generation of CD34⁺CD43⁺ and surprisingly the optimal condition was without BMP4. This is not consistent with the fact that BMP4 is important for the mesodermal differentiation prior EHT leading to hematopoietic progenitor generation (Chadwick et al. 2003, Kennedy et al. 2007, Chicha et al. 2011). This could be due to the fact that OP9 stromal cells alone support mesodermal generation of hPSC and the addition of BMP4 might not synergize with this OP9 stroma ability.

Contrasting with French *et al.* data, and despite our ability to generate CD34⁺CD43⁺ cells either from hESC or hIPSC, no more than 0.7% B cells were differentiated at the end of the 21 days onto MS-5 stroma and this was not dependent on the frequency of CD34⁺CD43⁺ cells present in the culture prior to B cell differentiation. It suggests that CD43 expression is not sufficient as a marker of CD34⁺ progenitors suitable for B cell commitment *in vitro*. We thus investigated differences in hPSC-derived CD34⁺ and UCB CD34⁺ cells considering the easier commitment into B cells of the latter ones. While all the UCB CD34⁺ cells expressed CD43 and intermediate levels of CD31 and CD45, the majority of CD34⁺ derived from hESC and hIPSC were CD31^{hi}CD45^{int}, suggesting that these cells were at different hematopoiesis stages. In addition, CD31^{int}CD45^{int} cells were absent at Day 8 of CD34⁺ differentiation from hIPSC, they appeared between Day 8 and Day 10 and their proportion increased from Day 10 to Day 12 suggesting hematopoietic progenitors were first CD31^{hi} and lost CD31 expression during differentiation. However, even with this higher CD31^{int}CD45^{int} proportion at Day 12, it did not increase B cell differentiation efficiency. This might be explained by the fact that these CD31^{int}CD45^{int} did not represent the majority of CD45⁺ cells. Indeed, in one experiment with 10% of the CD31^{int}CD45^{int}, which represent the majority of CD45⁺, we obtained our highest B cell generation suggesting their importance in B cell differentiation (Figure S1).

B cell generation needs specific environment and gene activation to trigger their differentiation from hematopoietic stem cells (Crane et al. 2017). *PAX5* and *EBF1* are two transcription factors that specifically drive and maintain a B cell commitment during hematopoiesis (Hystad et al. 2007). The Pro-B cells, which first express CD19, also express the

recombination-activated gene (*RAG1* and *RAG2*) for the V(D)J rearrangement of the immunoglobulin heavy chain (Igh) locus. This Igh associates to the surrogate light chain composed of the two subunits iota polypeptide chain (*VPREB*) and the Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (*IGLL1*, $\lambda 5$) to form the Pre-BCR. The pre-BCR is needed for the positive selection of Pre-B cells (Melchers 2015) resulting in the immunoglobulin light chain rearrangement and their transition to immature IgM⁺ B cells that we attempt to generate. At Day 21 of B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells and hESC-derived CD34⁺ cells, small amounts of *PAX5* and *EBF1* were observed but were sufficient for B cell commitment. These differentiated cells also expressed low level of *IL-7RA*, important for B cell differentiation. We also found during B cell differentiation from hESC, an expression of *IGLL1* and *VPREB1* associated with an increased *RAG1* expression from Day 7 to Day 21 of B cell differentiation. At Day 21, expressions of *IGLL1*, *VPREB1* and *RAG1* were 10 to 100-fold lower than in cells after B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells. While this highlights again the more efficient commitment of UCB CD34⁺ cells into B cells and the higher number of B cells generated, it shows that gene expressions in cells after our protocol of B cell differentiation from hPSC are concordant with a B cell differentiation process.

In parallel, the phenotype of B cells and their differentiation rate was followed by flow cytometry. During B cell differentiation process in the bone marrow, CD10⁺CD79a⁻CD19⁻ CLP first differentiate into CD10⁺CD79a⁺CD19⁻ Pre-Pro B cells which successively differentiate into CD10⁺CD79a⁺CD19⁺ Pro-B cells and Pre-B cells. Starting from UCB CD34⁺ cells, we found that 50 % of CD45⁺CD10⁺ cells were Pre-Pro B cells at Day 21, 30% were CLP and 15% were Pro and Pre-B cells. Starting from hESC-derived CD34⁺ cells, we observed from Day 7 to 21 of B cell differentiation, a decrease of the CLP proportion (99 to 78.%) and an increase of Pre-Pro B cells (0 to 11%) and Pro-B cells/Pre-B cell fraction (0 to 9%). In contrast with French *et al*, we found no expression of IgM at Day 42 after an other 21-day culture on MS-5 stroma with CD45⁺-derived neither from UCB CD34⁺ cells nor from hPSC (data not shown). IgM expression needs a sufficient B cell lineage engagement and a *RAG1* expression for the immunoglobulin gene rearrangement to occur. While we observed *RAG1* expression and Pre-BCR formation with genes coding for the two subunits of the surrogate light chain and the expression of the CD79a, component of the BCR, we obtained few B cells and they were blocked at a pre-B cells stage. This highlights the need to improve HSC commitment in order to obtain proper

lymphoid progenitors. Indeed a higher rate of HSC and hematopoietic progenitors will enhance B cell proportion and help optimizing B cell differentiation protocol onto MS-5 stroma with a sufficient amount to allow an efficient B cell generation at Day 21 and an IgM expression at Day 42 of B cell differentiation onto MS-5 stroma.

In their protocol, French *et al.* observed B cell differentiation using one hiPS cell line previously generated from fibroblasts. However, their group did not reach B cell generation at Day 21 from H1 hESC (Carpenter *et al.* 2011) while Vodyanick *et al.* demonstrated B cell generation with both H1 and H9 hESC (Vodyanik *et al.* 2005) using the same protocol. In addition, Larbi *et al.* described B cell generation from H1 hESC with a three-step protocol where they first generated hematopoietic progenitors through embryoid body formation and then differentiated them into B cells by two successive steps onto MS-5 stroma (Larbi *et al.* 2014). These results and the fact that our hiPS cell line was also generated from fibroblast highlight the difficulty to generate proper hematopoietic progenitors in a reproducible manner, which is crucial before assessing B cell differentiation. In addition, it must be taken into consideration that hiPSC retain epigenetic memory of their original tissue cell type, which results in different differentiation potentials (Kim *et al.* 2010, Polo *et al.* 2010). This issue might be overcome in future study with the use of different cell line, especially hiPSC derived from B cells (Bueno *et al.* 2016) which might differentiate into B cell with a better efficiency. To optimize B cell differentiation with efficient lymphoid lineage commitment, high proportion of hematopoietic progenitors and their in-depth characterization, notably markers to differentiate primitive and definitive progenitors, are needed. The expression of an intermediate level of both CD45 and CD31 might be a goal to reach, considering that UCB CD34⁺ cells have this phenotype and that they efficiently differentiate into B cells onto MS-5 stroma.

While considerable effort has been made in defining the hematopoietic progenitors and the signals needed for specific lineage engagement, we still need to better understand the hematopoietic process which will help designing robust protocol for lymphoid differentiation opening avenues in future B cell-based therapy.

Acknowledgment

This work was supported in the context of the Centaure project (RP10083) and the LabEX IGO thanks to French government financial support managed by the National Research Agency via the “Investment into the Future” program (ANR-11- LABX-0016-01). We thank iPSCDTC, TRIP and GenoCellEdit core facilities. All authors approved the final version of the manuscript.

Author Contributions

FD, LD, and SB designed the study. FD and AG carried out the experiments. FD, AG, FH, SC, LD and SB analyzed the data. LF, LT, JM-H and MC contributed for their help and advices during the study. FD, AG, FH, SC, LD and SB drafted and revised the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- Bueno, C., J. L. Sardina, B. Di Stefano, D. Romero-Moya, A. Munoz-Lopez, L. Ariza, et al. (2016). "Reprogramming human B cells into induced pluripotent stem cells and its enhancement by C/EBPalpha." *Leukemia* 30(3): 674-682.
- Carpenter, L., R. Malladi, C. T. Yang, A. French, K. J. Pilkington, R. W. Forsey, et al. (2011). "Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis." *Blood* 117(15): 4008-4011.
- Chadwick, K., L. Wang, L. Li, P. Menendez, B. Murdoch, A. Rouleau, et al. (2003). "Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells." *Blood* 102(3): 906-915.
- Chesneau, M., L. Michel, E. Dugast, A. Chenouard, D. Baron, A. Pallier, et al. (2015). "Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties." *J Am Soc Nephrol* 26(10): 2588-2598.
- Chesneau, M., A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S. Le Gallou, D. Baron, et al. (2014). "Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients." *Am J Transplant* 14(1): 144-155.
- Chicha, L., A. Feki, A. Boni, O. Irion, O. Hovatta and M. Jaconi (2011). "Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34- and CD34+ progenitors with distinct characteristics." *PLoS One* 6(2): e14733.
- Crane, G. M., E. Jeffery and S. J. Morrison (2017). "Adult haematopoietic stem cell niches." *Nat Rev Immunol* 17(9): 573-590.
- Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* 3(10): 944-950.
- French, A., C. T. Yang, S. Taylor, S. M. Watt and L. Carpenter (2015). "Human induced pluripotent stem cell-derived B lymphocytes express sIgM and can be generated via a hemogenic endothelium intermediate." *Stem Cells Dev* 24(9): 1082-1095.
- Gaignerie, A., N. Lefort, M. Rousselle, V. Forest-Choquet, L. Flippe, V. Francois-Campion, et al. (2018). "Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming." *Sci Rep* 8(1): 14363.
- Hystad, M. E., J. H. Myklebust, T. H. Bo, E. A. Sivertsen, E. Rian, L. Forfang, et al. (2007). "Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling." *J Immunol* 179(6): 3662-3671.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, et al. (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." *Blood* 117(2): 530-541.
- Julien, E., R. El Omar and M. Tavian (2016). "Origin of the hematopoietic system in the human embryo." *FEBS Lett* 590(22): 3987-4001.
- Kaufman, D. S. (2009). "Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells." *Blood* 114(17): 3513-3523.
- Kennedy, M., S. L. D'Souza, M. Lynch-Kattman, S. Schwantz and G. Keller (2007). "Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures." *Blood* 109(7): 2679-2687.
- Kilens, S., D. Meistermann, D. Moreno, C. Chariou, A. Gaignerie, A. Reignier, et al. (2018). "Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells." *Nat Commun* 9(1): 360.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, et al. (2010). "Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells." *Nature* 467(7313): 285-290.

- Kumar, A., S. S. D'Souza and A. S. Thakur (2019). "Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development." *Stem Cells Int* 2019: 2141475.
- Larbi, A., M. T. Mitjavila-Garcia, S. Flamant, Y. Valogne, D. Clay, B. Usunier, et al. (2014). "Generation of multipotent early lymphoid progenitors from human embryonic stem cells." *Stem Cells Dev* 23(24): 2983-2995.
- Mauri, C. and M. Menon (2015). "The expanding family of regulatory B cells." *Int Immunol* 27(10): 479-486.
- Melchers, F. (2015). "Checkpoints that control B cell development." *J Clin Invest* 125(6): 2203-2210.
- Oleinika, K., C. Mauri and A. D. Salama (2019). "Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease." *Nat Rev Nephrol* 15(1): 11-26.
- Pettinato, G., X. Wen and N. Zhang (2014). "Formation of well-defined embryoid bodies from dissociated human induced pluripotent stem cells using microfabricated cell-repellent microwell arrays." *Sci Rep* 4: 7402.
- Polo, J. M., S. Liu, M. E. Figueroa, W. Kulalert, S. Eminli, K. Y. Tan, et al. (2010). "Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells." *Nat Biotechnol* 28(8): 848-855.
- Rodriguez-Pinto, D. (2005). "B cells as antigen presenting cells." *Cell Immunol* 238(2): 67-75.
- Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." *Immunity* 42(4): 607-612.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Slukvin, II (2016). "Generating human hematopoietic stem cells in vitro -exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition." *FEBS Lett* 590(22): 4126-4143.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-872.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282(5391): 1145-1147.
- Vodyanik, M. A., J. A. Bork, J. A. Thomson and Slukvin, II (2005). "Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential." *Blood* 105(2): 617-626.
- Vodyanik, M. A., J. A. Thomson and Slukvin, II (2006). "Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures." *Blood* 108(6): 2095-2105.
- Wasik, M., K. Nazimek and K. Bryniarski (2018). "Regulatory B cell phenotype and mechanism of action: the impact of stimulating conditions." *Microbiol Immunol* 62(8): 485-496.
- Xu, Y., L. Liu, L. Zhang, S. Fu, Y. Hu, Y. Wang, et al. (2012). "Efficient commitment to functional CD34+ progenitor cells from human bone marrow mesenchymal stem-cell-derived induced pluripotent stem cells." *PLoS One* 7(4): e34321.

Figures

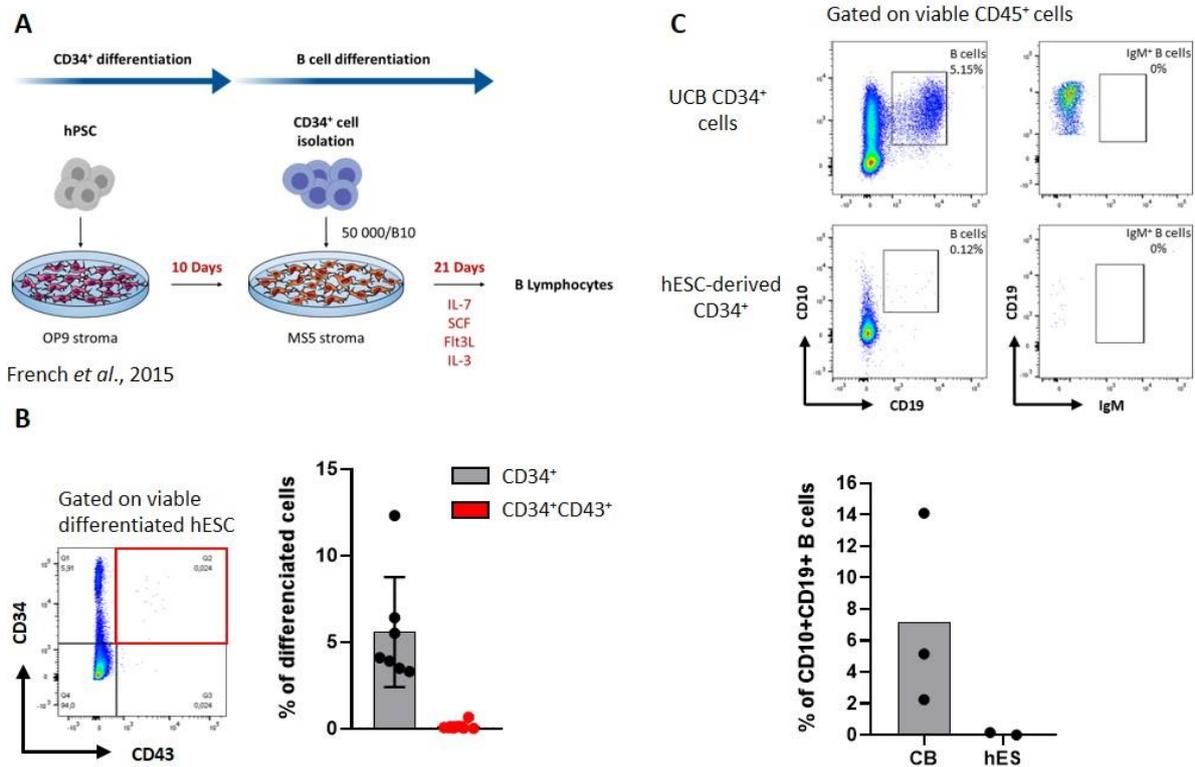


Figure 1: CD34⁺ generation from hPSC without cytokines and their low potential in B cell differentiation

(A) Protocol of hPSC differentiation into B cells as previously described (French et al., 2015). (B) CD34⁺ differentiation from hES cells onto OP9 stroma at Day 10. CD34/CD43 expression analyzed by flow cytometry on viable differentiated hESC is shown in the left as a dot plot from one representative experiment and the proportion of CD34⁺ cells (in black) and CD34⁺CD43⁺ (in red) are shown on the right panel, n=7 experiments. (C) B cells differentiation at Day 21 from UCB CD34⁺ cells (Upper panel) and CD34⁺-derived hESC (middle panel). CD10⁺CD19⁺ B cells proportion and their IgM expression was analyzed on viable CD45⁺ cells, dot plot from one representative experiment is shown. Histogram of CD10⁺CD19⁺ B cells proportion is presented in the lower panel (n=3 experiments from UCB CD34⁺ cells and two experiments from hESC-derived CD34⁺)

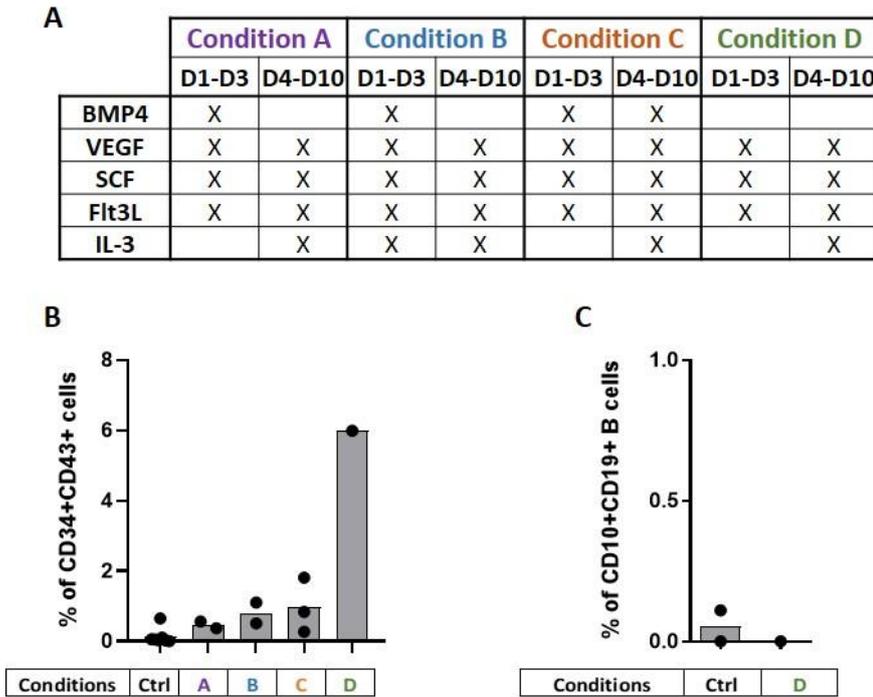


Figure 2: Cytokines allow CD34⁺CD43⁺ differentiation from stem cells

(A) Table of the cytokine conditions tested according their presence from Day 1 to Day 3 and Day 4 to Day 10 for the CD34⁺ differentiation (cytokines were used at 10ng/mL except for BMP4 at 5ng/mL). (B) Percentage of CD34⁺CD43⁺ cells at the end of the CD34⁺ differentiation according to the cytokine conditions used (n=1 to 3 independent experiments) or without cytokines as control (Ctrl, n=7 independent experiments) (C) Percentage of CD10⁺CD19⁺ B cells at Day 21 of B cell differentiation from hES-derived CD34⁺ with (Condition D; n=2 independent experiments) or without cytokine (Ctrl, n=1 experiment).

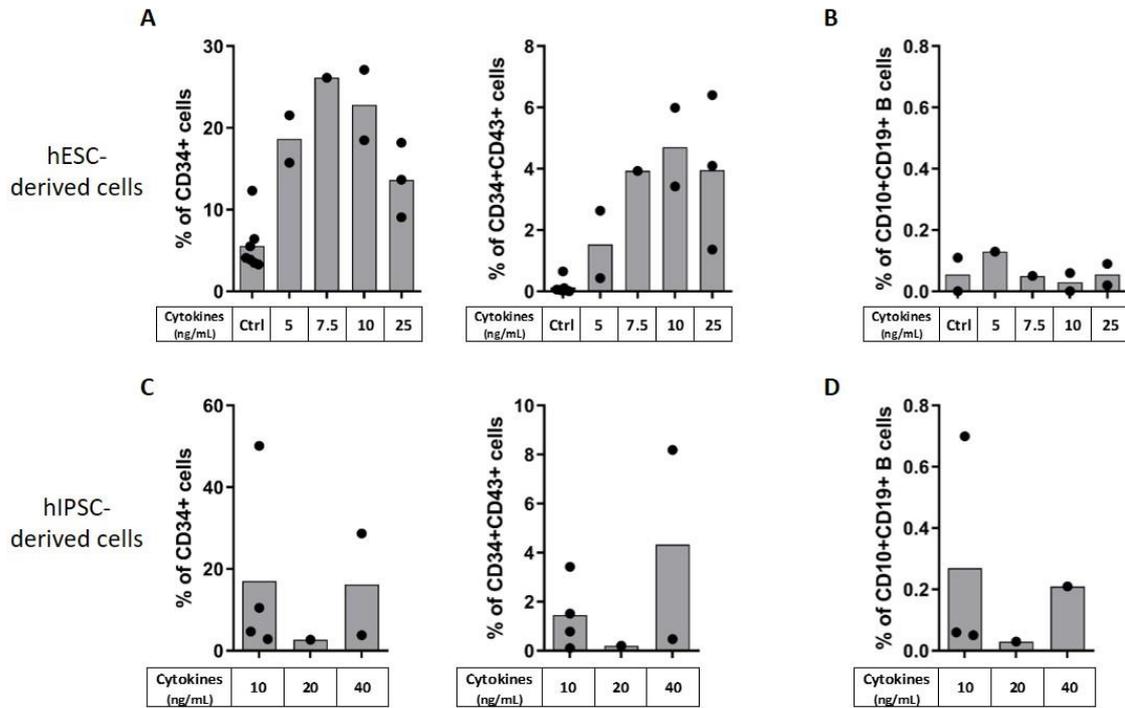


Figure 3: Cytokines at 10ng/ml permit the best B cell differentiation

hESC (Upper panels) and hIPSC (lower panels) were used for CD34⁺ differentiation with our protocol of cytokines addition (the cytokine condition D, as detailed in Figure 2A) at different concentration. (A, C) Histograms show the proportion of CD34⁺ (left panel) and CD34⁺CD43⁺ (right panel) after CD34⁺ differentiation from (A) hESC with cytokines (n=1 to 3 independent experiments) or without cytokines as control (Ctrl, n=7 independent experiments) and from (C) hIPSC (n=1 to 4 independent experiments). (B, D) B cells proportion at Day 21 after B cell differentiation from the corresponding CD34⁺ cells is shown from (B) hESC-derived CD34⁺ cells with cytokines (n=3 independent experiments) or without cytokines as control (Ctrl, n=1 or 2 independent experiments) during CD34⁺ differentiation and from (D) hIPSC-derived CD34⁺ (n=1 to 3 independent experiments).

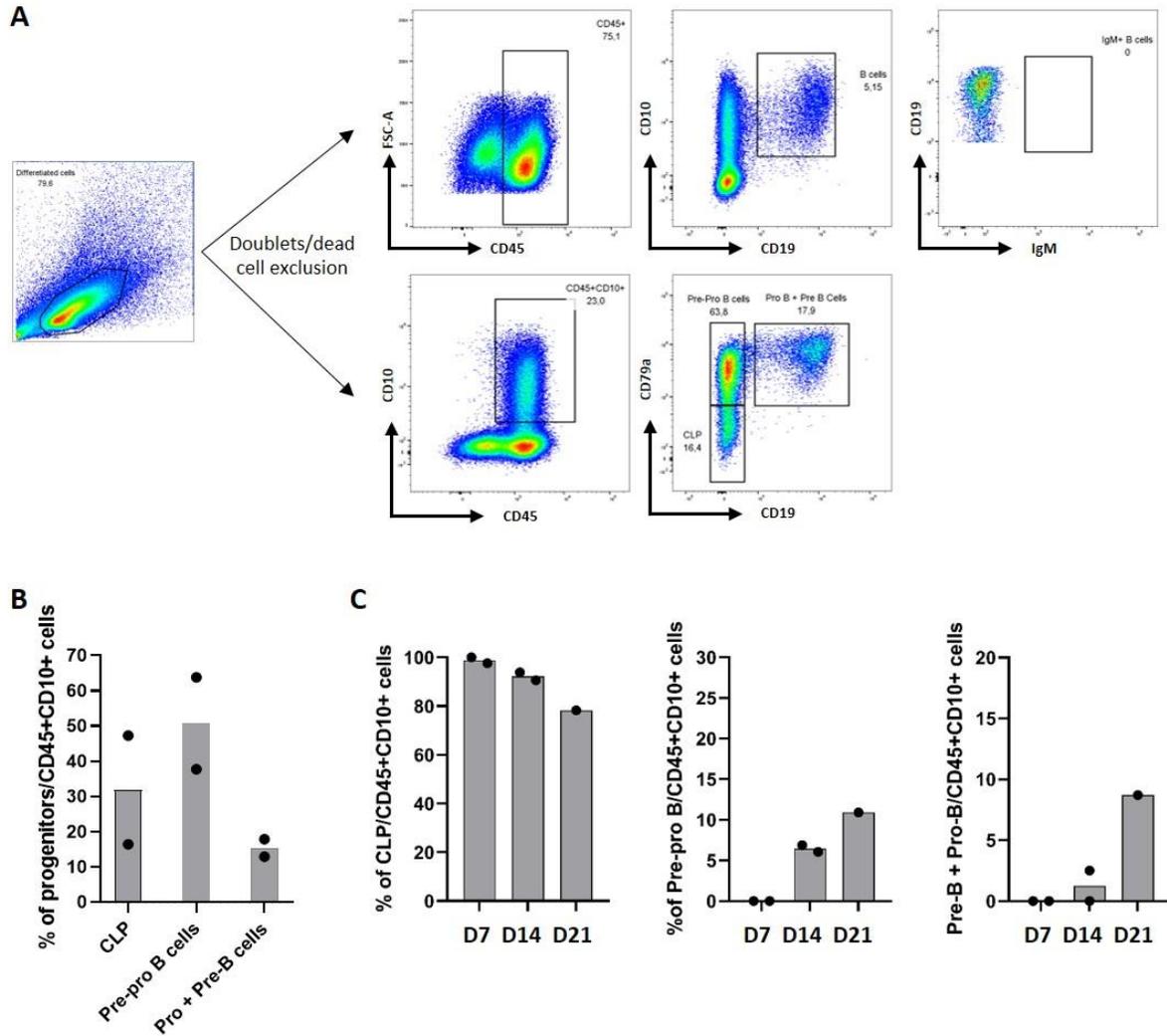


Figure 4: Gating strategy of B cell progenitors

(A) B cell characterization during B cell differentiation of UCB CD34⁺ cells using CD10⁺CD19⁺ total B cells gated on CD45⁺ (upper panel) and using CD79a⁻CD10⁻ CLP, CD79a⁺CD10⁻ Pre-pro-B cells and CD79a⁺CD19⁺ both Pro-B and Pre-B cells gated on CD45⁺CD10⁺ (lower panel). (B) B cell progenitors proportion in 2 independent experiments. (C) B cell progenitors proportion at Day 7 (D7), 14 (D14) and 21 (D21) of B cell differentiation from hESC-derived CD34⁺ (n=1 or 2 independent experiment).

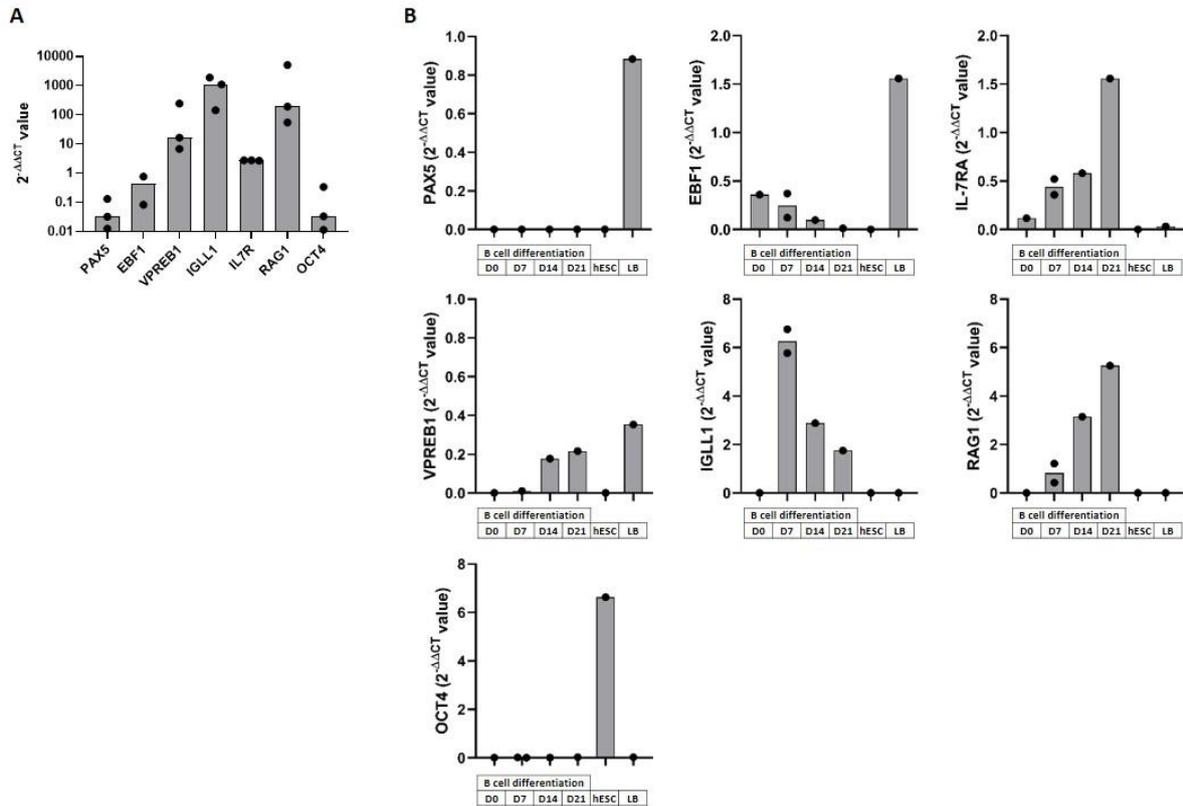


Figure 5: Gene expression at different time point of B cell differentiation

Gene expression analysis by Taqman expression assay of *PAX5*, *EBF1*, *VPREB1*, *IL-7RA*, *IGLL1*, *RAG1* and *OCT4* were performed on total cells at different time point during B cell differentiation. Histograms of $2^{-\Delta\Delta CT}$ value display gene expression analysis of cells (A) at Day 21 of B cell differentiation from UCB CD34⁺ cells (n=2 to 3 independent experiments) and (B) at Day 0 (D0), 7, 14 and 21 of B cell differentiation from hES-derived CD34⁺ with undifferentiated hESC and tonsil B cells (LB) as controls (n=1 to 2 independent experiments).

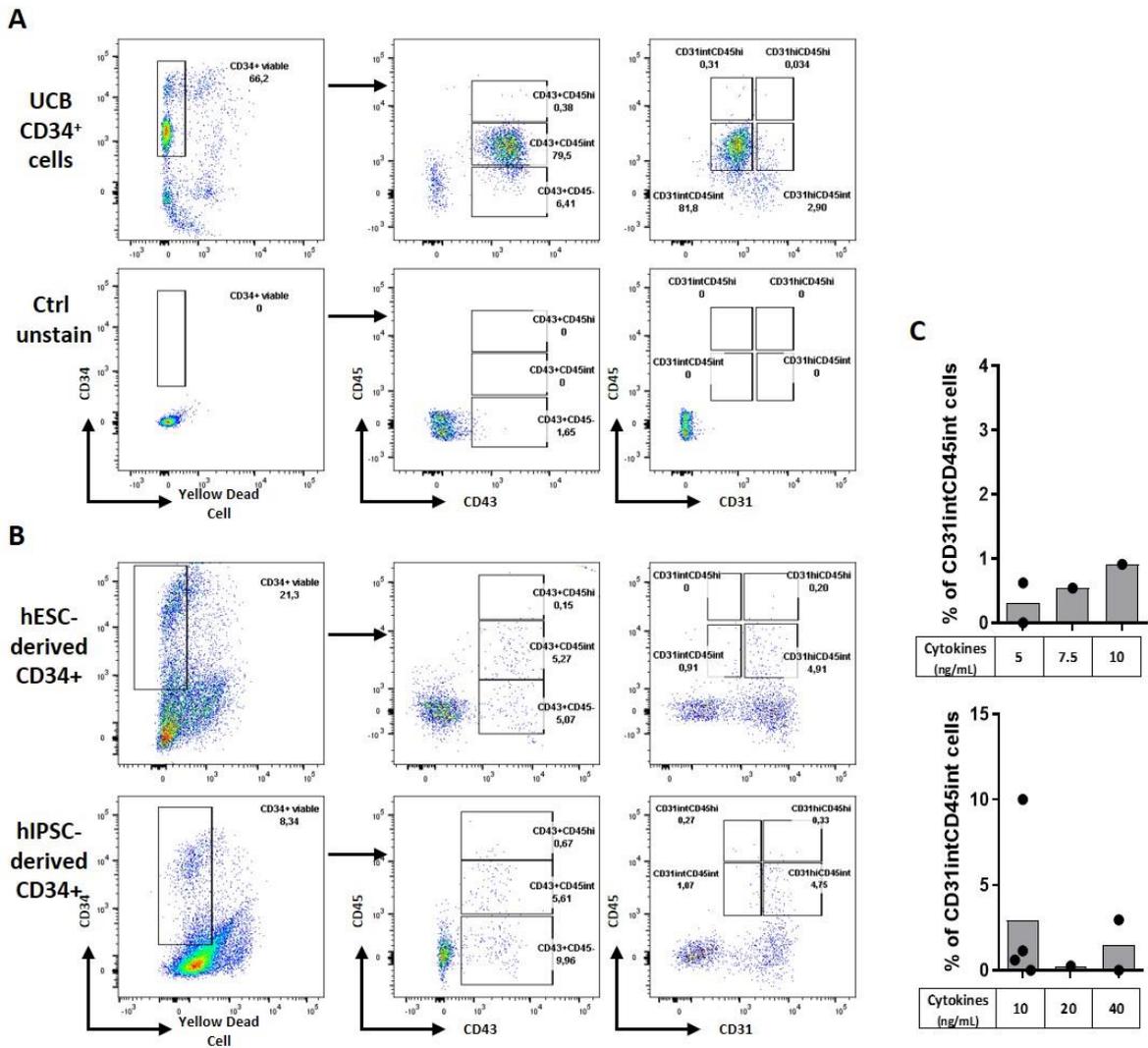


Figure 6: CD31^{int}CD45^{int} are important progenitors for B cells differentiation

Characterization of CD34⁺ progenitors by their expression analysis of the following markers CD45, CD43 and CD31. FACS analysis was performed from (A) UCB CD34⁺ cells (Upper panel) with unstained cells as control (lower panel), dot plot representative of 2 experiments and from (B) hESC-derived CD34⁺ (Upper panel) and hiPSC-derived CD34⁺ (lower panel) using our CD34⁺ differentiation protocol with cytokines at 10ng/mL, dot plot representative of 2 experiments for hESC and 4 experiments for hiPSC. (C) Histograms show CD31^{int}CD45^{int} proportion in hES cells (upper panel) and hiPS cells (lower panel) at Day 10 of CD34⁺ using our CD34⁺ differentiation protocol with cytokines at different concentrations (n=1 to 4 independent experiments).

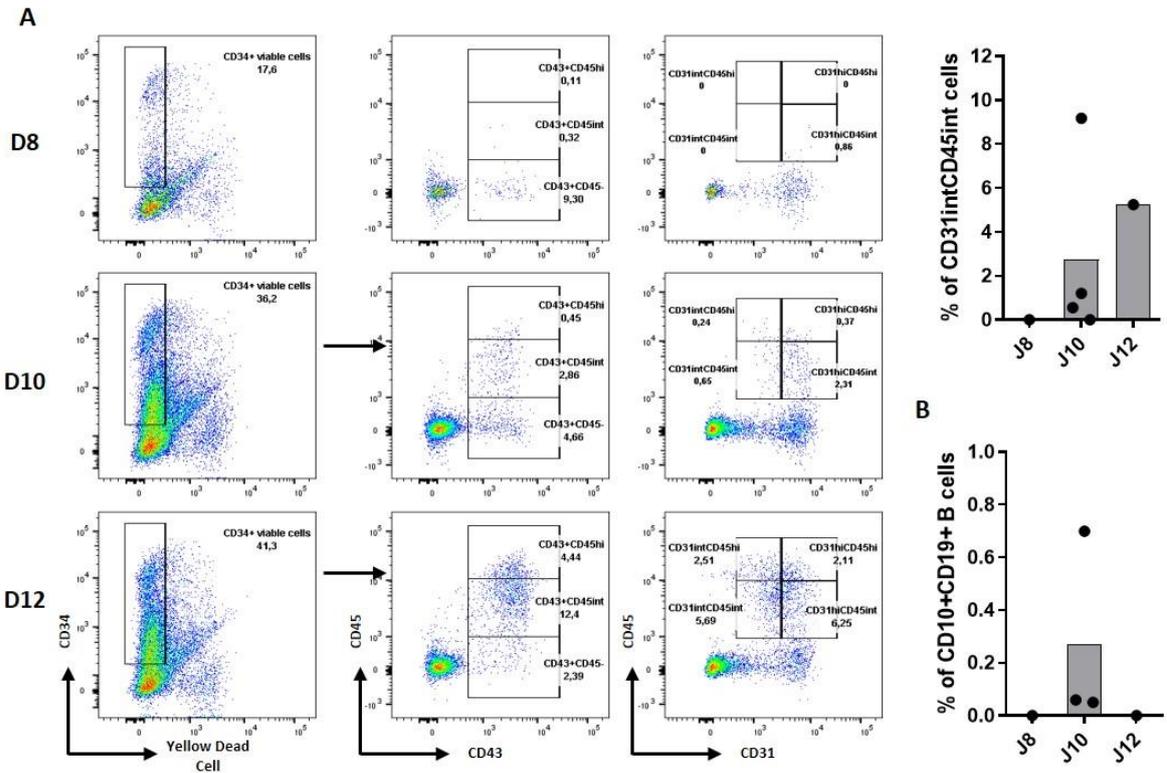


Figure 7: Day 10 of CD34⁺ differentiation permits the better B cell differentiation

(A) CD34⁺ differentiation from hiPSC, with our protocol of cytokine addition (cytokine condition D, as detailed in Figure 2A) at 10ng/mL, was stopped at Day 8, Day 10 and Day 12 to analyze the expression of CD34⁺ cells for the following markers CD45, CD43 and CD31. Dot plots from 1 experiment for Day 8 and Day 12 and 4 independent experiments for Day 10 are shown in the left panel. Histogram of the CD31^{int}CD45^{int} proportion among the CD34⁺ at different time of the CD34⁺ differentiation is shown. (B) Histogram represents the B cell proportion at the end of the B cell differentiation using the corresponding hiPSC-derived CD34⁺ (n=1 to 3 independent experiments).

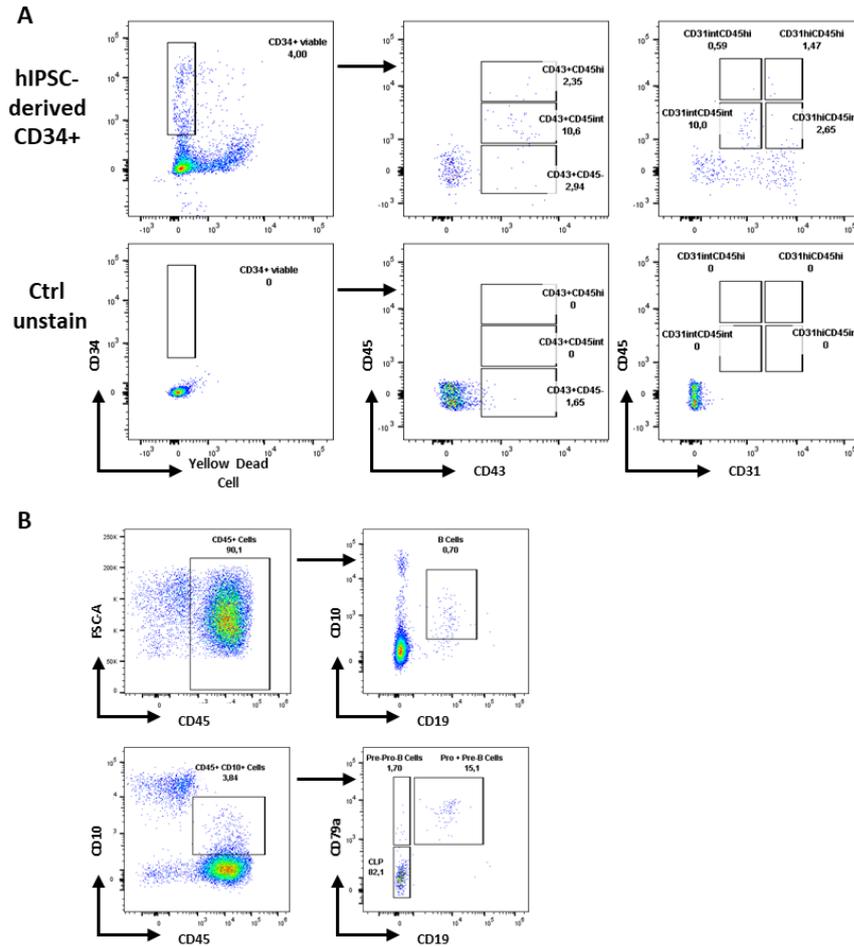


Figure S1: CD31^{int}CD45^{int} might be an important progenitor for B cells differentiation

FACS analysis in one CD34⁺ differentiation experiment from hIPSC with cytokines at 10ng/mL experiment show a majority of CD31^{int}CD45^{int} hematopoietic progenitors permits the better B cell differentiation. **(A)** Characterization of CD34⁺ progenitors by their expression analysis of the following markers CD45, CD43 and CD31 at Day 10 of CD34⁺ differentiation. **(B)** B cell characterization by gating on CD10⁺CD19⁺ total B cells gated on CD45⁺ (upper panel) and on CD79a⁻CD10⁻ CLP, CD79a⁺CD10⁻ Pre-Pro-B cells and CD79a⁺CD19⁺ both Pro and Pre-B cells (lower panel) upon B cell differentiation from this CD34⁺ progenitors.

2) Intégration de l'expression du GZMB dans les hPSC

Afin d'apporter une fonction régulatrice aux lymphocytes B générés à partir d'hPSC (hPSC et hESC), nous avons établi un protocole en deux étapes. La première étape consiste à réaliser un KO du *GZMB* endogène des hPSC afin qu'il n'y ait aucune expression basale du GZMB. La deuxième étape consiste à introduire dans les hPSC-GZMB^{-/-}, une cassette d'expression du GZMB dont l'expression est constitutive et répressible. Ainsi, après différenciation des hPSC-GZMB⁺, on obtiendra des lymphocytes B GZMB⁺ dont l'expression constitutive du GZMB pourra être réprimée et fournissant un modèle d'étude des lymphocytes B GZMB⁺/GZMB⁻.

a) Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

Les lignées de cellules souches ainsi que leur méthode d'entretien sont présentées dans l'article 1. Les cellules HEK293T ont été cultivées à 37°C en milieu DMEM complétement en SVF (10%), en Glutamine (1%) et en Pénicilline/streptomycine (1%).

PCR Herculase et T7 endonucléase

Les amplifications de l'exon 2 du GZMB ont été réalisées par PCR Herculase selon les instructions du fournisseur (Herculase II Fusion DNA Polymerases, Agilent), puis les produits de PCR ont été analysés au Caliper. Pour contrôler la coupure de l'exon 2 du GZMB après transfection CRISPR/Cas9, les produits de PCR ont subi une déshybridation et une hybridation créant des mismatches aux endroits de coupure. De ces produits de PCR ont été prélevés 10µL pour réaliser une PCR avec la T7 endonucléotidase qui coupe l'ADN double brin lorsqu'elle rencontre les mismatches. Les produits de PCR T7 ont ensuite été analysés au Caliper pour révéler les bandes d'origines et les bandes de petite taille résultant des coupures CRISPR/Cas9.

Clonage des sgRNA au sein du plasmide CRISPR/Cas9

Le clonage des sgRNA dans les plasmides d'expression de la Cas9 a été réalisé selon les instructions du fournisseur (GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit, Invitrogen). Brièvement, les sgRNA ont été hybridés afin de générer des oligonucléotides double brin. Ces oligonucléotides ont été clonés dans le plasmide CRISPR Nuclease Vector et les produits de ligation ont été transformés dans des bactéries compétentes TOP10 *E.coli*. Les bactéries ont été sélectionnées par culture sur milieu ampicilline et les plasmides ont été purifiés et séquencés pour vérifier leur intégrité.

Outils numériques

L'outil Primer-BLAST de NCBI nous a permis de générer les amorces de PCR, tandis que la prédiction des sgRNA a été réalisée via CRISPOR. L'outil BLAST de NCBI a permis de valider l'identité de nos produits de séquençage. Les alignements de séquences ont, quant à eux, été réalisés sur SerialCloner.

Transfection des cellules HEK293T et hPSC

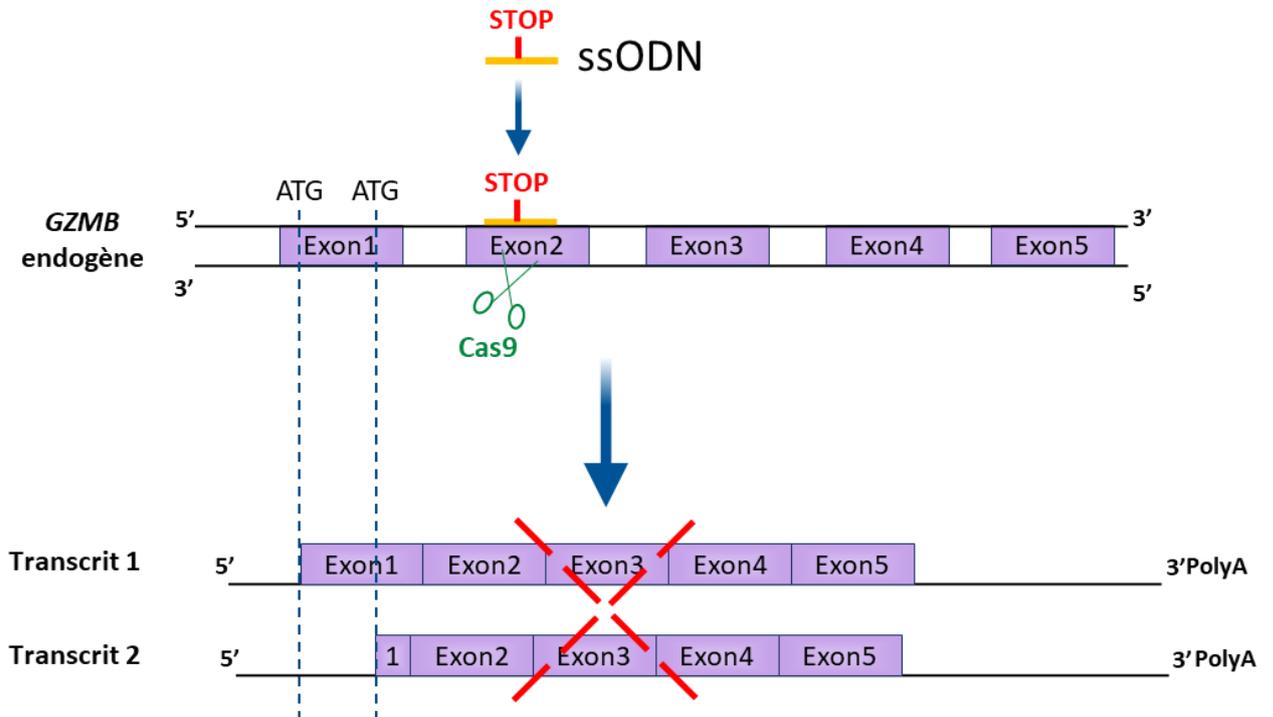
Les transfections des cellules HEK293T ont été réalisées par lipofectamine en suivant les instructions du fournisseur avec 2µg de plasmide et 2,5µL de lipofectamine (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Les hPSC ont été transfectées à 30% de confluence avec 1µg de plasmide et 2µL de lipofectamine (Lipofectamine Stem cell, Invitrogen). Le milieu de culture des hPSC transfectées a été changé tous les jours après transfection. L'efficacité de transfection a été évaluée en analysant le signal GFP par microscopie aux jours 1 et 2 après transfection et par cytométrie au jour 3.

b) Résultats

i. Etape du KO pour le gène GZMB

Méthodologie du KO pour le *GZMB*

Le locus du gène *GZMB* possède 5 exons dont les deux premiers sont communs aux deux produits transcriptionnels (**Résultats 1 - Figure 1**). Afin d'inhiber l'expression des deux transcrits, notre méthode a consisté à cibler par CRISPR/Cas9 l'exon 2 du *GZMB* (Ex2GZMB) et à intégrer par recombinaison homologue un oligonucléotide comportant un codon stop. Ainsi, après coupure et recombinaison, l'Ex2GZMB aura intégré un codon stop précoce qui empêchera l'expression des deux transcrits.



Résultats 1 - Figure 1 : Schéma de la réalisation du KO du *GZMB* endogène

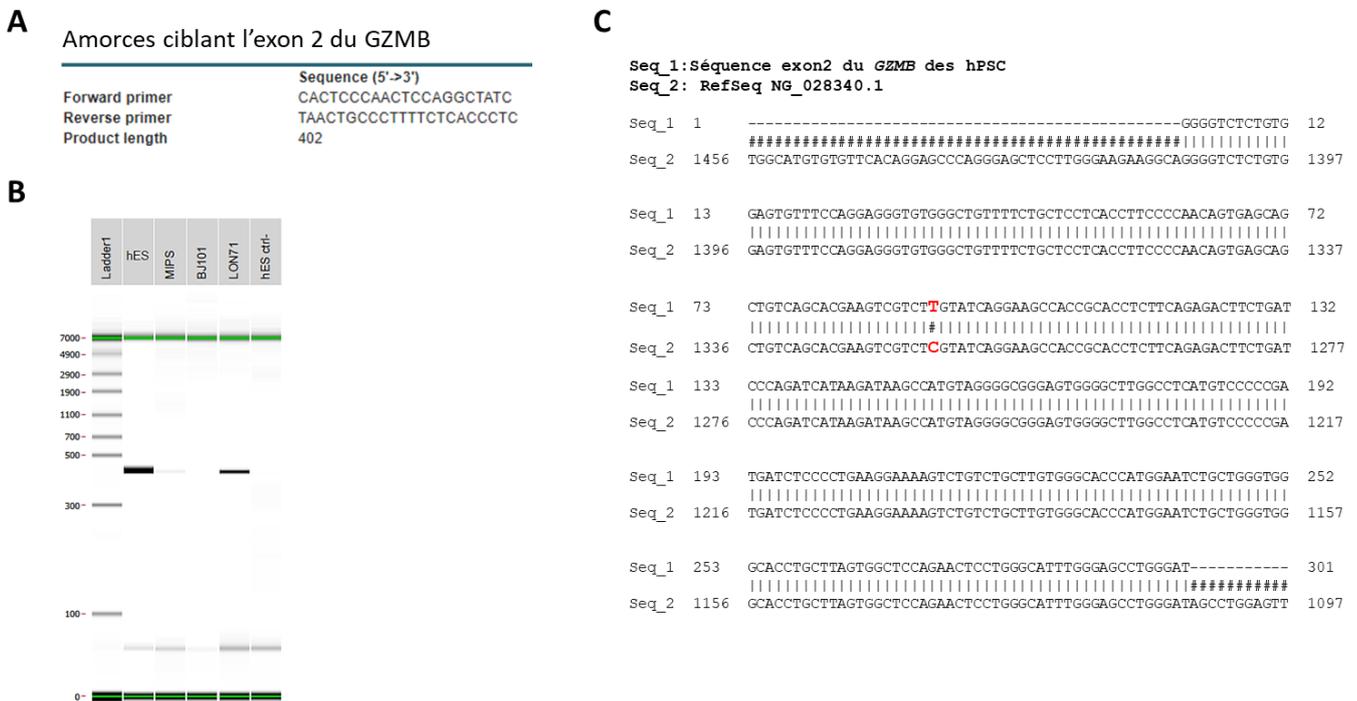
La Cas9 ciblant l'Ex2GZMB endogène des hPSC permet une coupure de l'ADN. Ainsi, l'oligonucléotide (ssODN) peut être intégré au site de coupure par recombinaison homologue et apporte un codon stop inhibant l'expression des deux variants transcriptionnels du *GZMB*.

Prédiction des sgRNA ciblant l'Ex2GZMB

Afin d'obtenir des lignées d'hPSC KO pour le *GZMB*, nous avons séquencé l'Ex2GZMB de nos hPSC pour définir le sgRNA du système CRISPR/Cas9. Pour cela, nous avons tout d'abord généré des amorces permettant d'amplifier l'Ex2GZMB par PCR en nous basant sur la séquence de référence du *GZMB* humain (RefSeq NG_028340.1). Nous avons choisi un couple d'amorce, via l'outil Primer-BLAST de NCBI, générant un produit de PCR de 402 paires de bases (pb) (**Résultats 1 - Figure 2A**). Nous avons validé ces amorces PCR sur des lignées hESC et hIPSC LON71.019 mais nous n'obtenons qu'une faible bande pour hIPSC MIPS et aucune pour hIPSC

RÉSULTATS I. Génération de Bregs GZMB+ à partir d'hPSC

BJ101 (**Résultats 1 - Figure 2B**). Nous avons ensuite fait séquencer les produits de PCR par Eurofins Genomics et, après avoir interrogé l'outil BLAST de NCBI, nous retrouvons 100% d'identité commune des séquences analysés avec le gène *GZMB*. L'alignement des séquences Ex2GZMB des hPSC avec la séquence de référence du *GZMB* humain montre un alignement exact, excepté un SNP (single nucleotide polymorphism) à la position 109 avec une thymine sur les séquences hPSC au lieu d'une cytosine sur la séquence de référence (**Résultats 1 - Figure 2A**). Ce SNP conduit à la traduction d'un acide glutamique au lieu d'une arginine. A partir des séquences des hPSC, nous avons sélectionné sur CRISPOR les 3 sgRNA possédant les meilleures prédictions d'efficacité de coupure et les plus faibles prédictions d'Off-target (sgRNA108, sgRNA82 et sgRNA136).

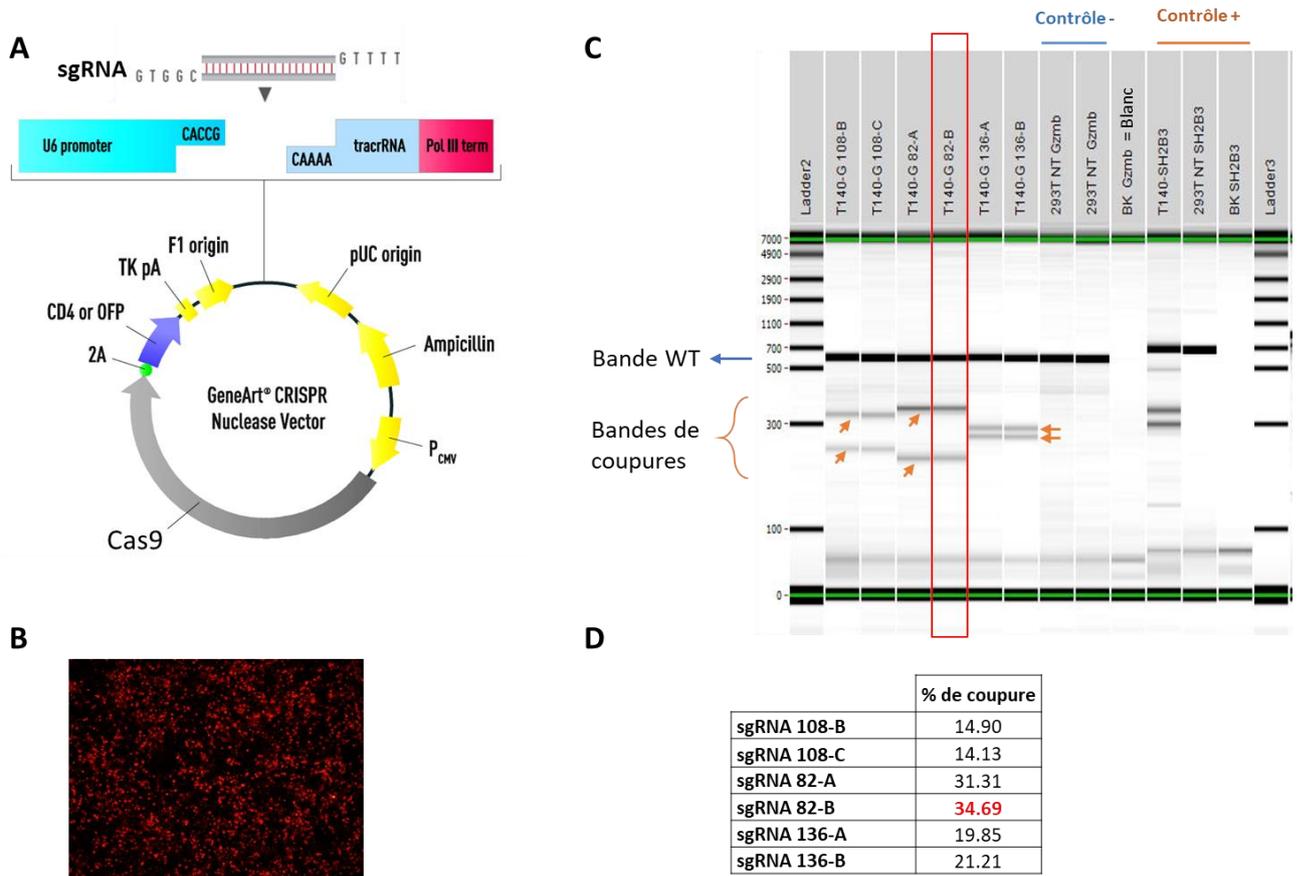


Résultats 1 - Figure 2 : Séquénage de l'exon 2 du *GZMB* des hPSC

(A) Séquence de la paire d'amorces ciblant l'Ex2GZMB. (B) Migration au Caliper des produits de PCR de l'Ex2GZMB des différentes cellules souches pluripotentes, avec en contrôle, la migration des produits de réaction d'une PCR sans ADN. (C) Alignement entre les séquences de l'Ex2GZMB des hPSC et celle de référence.

Génération des plasmides CRISPR/Cas9

Nous avons intégré chacun des 3 sgRNA dans un plasmide GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (**Résultats 1 - Figure 3A**). Ce plasmide possède l'expression de la Cas9 et celle de l'OFP qui permet de sélectionner les cellules pour lesquelles la Cas9 est exprimée. Lors du clonage des sgRNA dans ce plasmide possédant un gène de résistance à l'ampicilline, les plasmides ont été transformés dans des bactéries compétentes qui ont été cultivées sur un milieu de sélection à l'ampicilline. Nous avons ainsi sélectionné 3 colonies bactériennes pour chaque sgRNA. Après amplification des plasmides CRISPR/Cas9 et vérification de leur intégrité par séquençage, nous avons validé 2 clones pour chaque plasmide sur cellules HEK293T. Nous observons un fort pourcentage de transfection après 3 jours de culture (**Résultats 1 - Figure 3B**). 3 jours après transfections, nous avons récupéré l'ADNg des HEK293T et amplifié l'Ex2GZMB par PCR avec une seconde paire d'amorces conduisant à un produit de PCR de 547pb. Nous avons ensuite réalisé une PCR T7 endonucléase sur ces produits de PCR et évalué le taux de coupure des sgRNA. La migration des produits de PCR T7 montre, pour chacun des sgRNA, une bande WT à 547pb ainsi que deux bandes de plus petites tailles témoignant de la coupure de l'Ex2GZMB (**Résultats 1 - Figure 3C**). Bien que chaque sgRNA permette une coupure, nous avons sélectionné le sgRNA82-B qui possède un plus fort taux de coupure en rapportant, pour chacun d'eux, la concentration des deux bandes de coupure à l'ensemble des bandes (bande WT+ bandes de coupure) (**Résultats 1 - Figure 3D**).



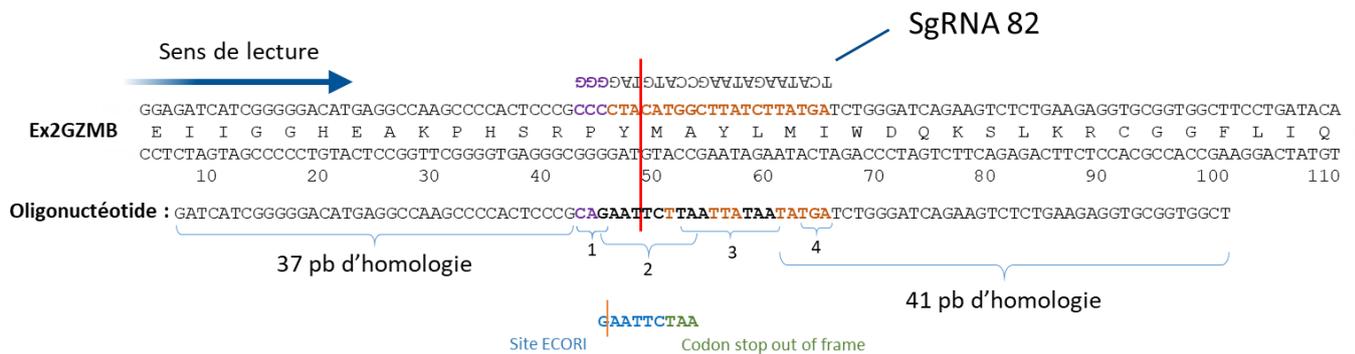
Résultats 1 - Figure 3 : Génération du plasmide CRISPR/Cas9

(A) Schéma du clonage du sgRNA dans le plasmide GeneArt® CRISPR Nuclease Vector. (B) Transfection des HEK293T à 3 jours après transfection avec le plasmide, image représentative des transfactions avec les 3 plasmides. (C) Migration au Caliper des produits de PCR T7 endonucléase pour chacun des sgRNA. Les puits des cellules HEK293T non transfectées (NT) sont utilisés comme contrôle négatif, tandis que les puits dont les cellules ont été transfectées avec un sgRNA connu, le SH2B3, sont utilisés comme contrôle positif. (D) Tableau représentant les pourcentages d'efficacité de coupure de chaque sgRNA.

Design des sgRNA ciblant l'Ex2GZMB

Afin de permettre un KO du GZMB endogène, nous avons utilisé lors de la transfection du plasmide CRISPR/Cas9, un oligonucléotide possédant un codon stop afin d'apporter un codon stop précoce après recombinaison homologue de l'oligonucléotide au site de coupure. Cet oligonucléotide permet d'augmenter la chance de générer un KO suite à la coupure de la Cas9 car la recombinaison homologue de l'oligonucléotide est plus probable que la survenue d'une mutation conduisant à l'inactivité du gène. Pour cela, il est nécessaire de bien établir l'oligonucléotide (Résultats 1 - Figure 4). Le sgRNA entraîne une coupure double brin de

l'Ex2GZMB (en rouge) par la Cas9 au niveau du site de fixation. La séquence PAM de 3 nucléotides après le site de coupure de la Cas9 (en violet) est importante dans la fixation du sgRNA. Afin d'éviter que la Cas9 recoupe le gène, cette séquence PAM a été modifiée au niveau de l'oligonucléotide (1). Pour les mêmes raisons, le site de coupure a été modifié et on a intégré à cet endroit un site de restriction ECORI qui n'est pas présent sur l'Ex2GZMB et permettra de sélectionner les cellules possédant l'intégration de l'oligonucléotide (2). Deux codons stop TAA ont été intégrés après le site de coupure pour optimiser l'arrêt de la transcription (3). De plus, deux codons stop TGA (4) et TAA (en vert) apparaissent hors cadre de lecture. Enfin, deux séquences d'homologie de 37pb et de 41pb sont présentes en amont et en aval du site de coupure et permettent l'intégration par recombinaison homologue.



- 1) Mutation de la séquence PAM
- 2) Mutation du site de coupure avec un site ECORI
- 3) Insertion de 2 codons stop dans le cadre de lecture
- 4) Présence d'un TGA out of frame

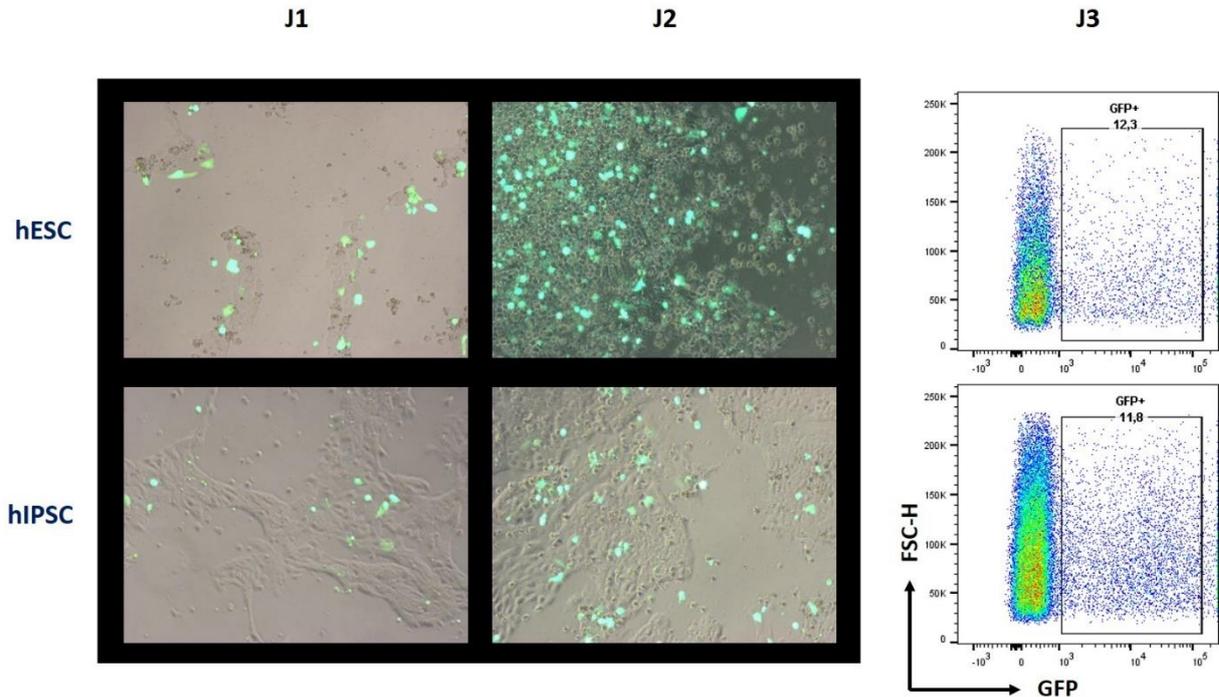
Résultats 1 - Figure 4 : Design de l'oligonucléotide

Les séquences PAM (1) et le site de coupure du sgRNA ont été modifiés dans l'oligonucléotide pour éviter une deuxième coupure par la Cas9. Le site de coupure intègre un site ECORI (2) suivi de deux codons stop dans le cadre de lecture (3) et de 2 codons stop (4 et en vert) hors cadre de lecture.

Transfection des cellules souches pluripotentes

Les cellules HEK293T utilisées pour la validation des plasmides CRISPR/Cas9 ont été facilement transfectées. Nous avons ensuite transfecté les cellules hPSC avec un plasmide possédant une expression de la GFP sous un promoteur PGK. Les cellules hESC, et dans une

moindre mesure les hiPSC, sont bien transfectées et expriment la GFP après deux jours (Résultats 1 - Figure 5).



Résultats 1 - Figure 5 : Transfection des hPSC avec un plasmide contrôle

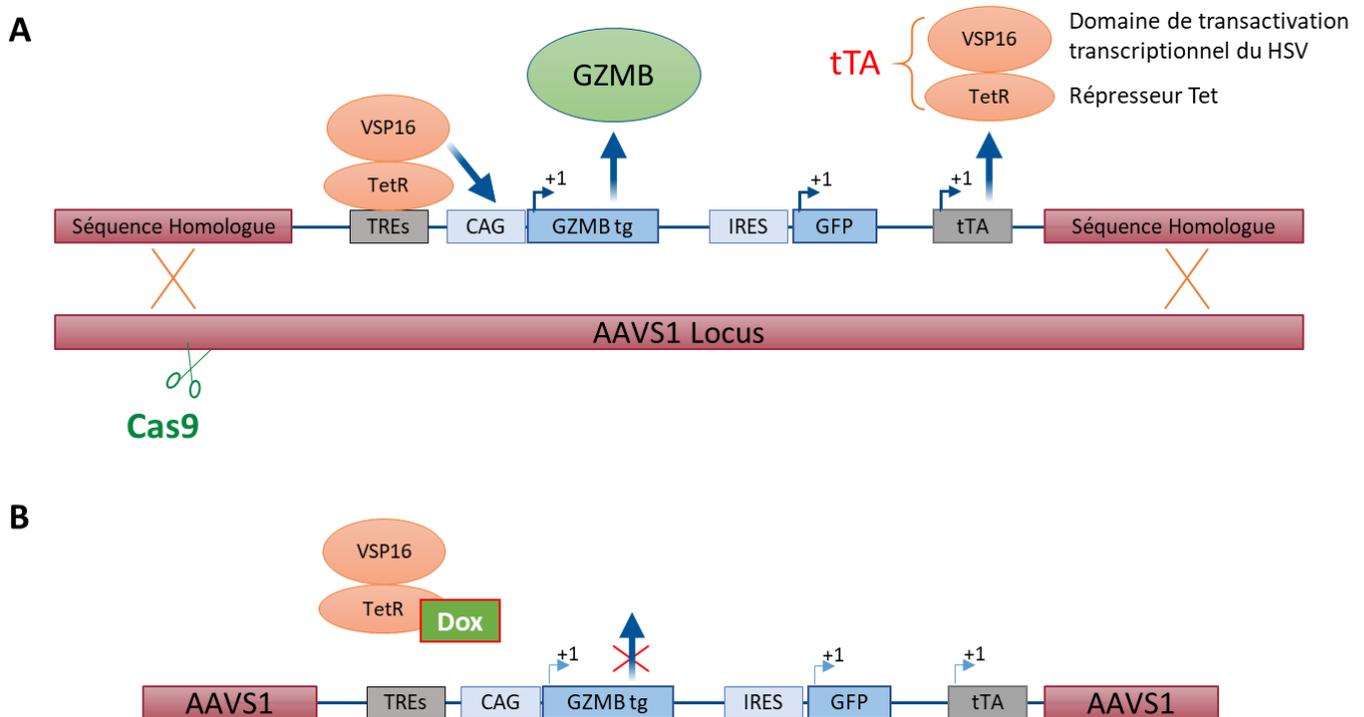
Les hESC et hiPSC ont été transfectées à 30% de confluence par lipofectamine avec un plasmide d'expression de la GFP sous un promoteur PGK. Les images par microscopie représentent les signaux GFP après 1 (J1) et 2 jours (J2) de transfection. Le taux des cellules ayant été transfectées a été analysé par cytométrie à J3.

ii. Etape de l'insertion de la cassette d'expression du GZMB

Méthodologie d'intégration de la cassette d'expression pour le GZMB

Afin d'apporter l'expression du GZMB pour la fonction régulatrice des lymphocytes B, nous avons décidé d'introduire une cassette d'expression dans le locus safe harbor AAVS1 (Résultats 1 - Figure 6A). Dans ce modèle, la cassette d'expression est introduite par CRISPR/Cas9 dans les hPSC KO pour le GZMB endogène. L'expression du GZMB est sous contrôle d'un système Tet-Off. La cassette tTA permet la production de la protéine transactivatrice tétracycline constituée du domaine d'activation de l'Herpes Simplex Virus (HSV)

fusionné avec la protéine TetR, répresseur de la tétracycline. La protéine tTA produite se fixe sur ses séquences TREs et permet l’activation du promoteur CAG initiant ainsi l’expression du GZMB. L’expression du GZMB conduit à l’expression de la GFP, via la séquence IRES séparant leur cassette d’expression respective, permettant ainsi de sélectionner les cellules qui intègrent l’ensemble de la cassette d’expression. Si les cellules sont en présence de doxycycline, cette dernière se fixe au domaine TetR de la tTA inhibant sa liaison à l’ADN et empêchant l’expression du GZMB (Résultats 1 - Figure 6B). Ainsi, la génération de lymphocytes B à partir des hiPSC modifiées permettra l’obtention de lymphocytes B GZMB⁺. L’ajout de doxycycline permettra l’arrêt complet de l’expression du GZMB par les cellules car la cassette transgénique sera inhibée et il n’y aura pas d’expression basale du GZMB grâce au KO du *GZMB* endogène.



Résultats 1 - Figure 6 : Insertion d’un système Tet-Off pour une expression réversible du GZMB

(A) Schéma de l’insertion par CRISPR/Cas9 de la cassette d’expression du GZMB contrôlée par un système Tet-Off. Sans doxycycline, l’expression du GZMB est constitutive. (B) Schéma de l’inhibition de l’expression du GZMB en présence de doxycycline (Dox).

iii. Conclusions

Nous avons mis au point et validé les outils permettant la réalisation du KO du *GZMB* endogène dans les cellules hPSC. Cela nous permet de réaliser le KO du *GZMB* des hIPSC, de sélectionner les hIPSC KO et de les amplifier afin de créer une banque de ces cellules avant de débiter les étapes de l'insertion de la cassette d'expression.

II. Article n°2

Méta-analyse transcriptomique des lymphocytes B aux propriétés régulatrices

Florian Dubois, Sophie Limou, Mélanie Chesneau Nicolas Degauque, Sophie Brouard et Richard Danger

(Article en révision)

Les Bregs sont capables de réguler l'inflammation dans plusieurs situations pathologiques et représentent ainsi des acteurs clés de la régulation immunitaire (Mauri and Menon, 2017). Ils représentent une population hétérogène avec plusieurs sous-types de lymphocytes B identifiés selon leur phénotype et/ou leurs fonctions régulatrices, notamment l'expression du GZMB que nous avons récemment identifié chez les patients transplantés tolérants un greffon rénal (Chesneau et al., 2015). Afin de mieux caractériser ces Bregs GZMB⁺, nous avons réalisé une analyse transcriptomique des Bregs GZMB⁺ expandus *in vitro* par séquençage d'ARN (RNAseq) en comparaison de lymphocytes B expandus GZMB⁻. Plusieurs études ont caractérisé d'autres sous-types de Bregs, en les comparant aux non-Bregs, par des analyses transcriptomiques via des puces à ADN (microarray) ou via RNAseq. Ces études se focalisent sur des sous-types de Bregs précis et utilisent un faible nombre d'échantillons. Afin de mieux comprendre la biologie et les mécanismes des Bregs et d'identifier une signature commune, nous avons réalisé la première méta-analyse des différents jeux de données transcriptomiques publiées sur les Bregs à la fois chez l'Homme, dont le nôtre sur les Bregs GZMB⁺, et chez la souris. Nous avons ainsi identifié deux signatures transcriptomiques uniques et distinctes de 165 et 93 gènes respectivement pour les Bregs humains et murins. Bien que nous ayons identifié des gènes codants pour des protéines potentiellement impliquées dans les fonctions régulatrices, prolifératives, apoptotiques et des gènes codants pour des facteurs de transcription, la comparaison entre l'Homme et la souris n'a pas permis d'identifier une signature commune des Bregs entre ces deux espèces. Ainsi, nos résultats chez l'Homme et la souris suggèrent des signatures transcriptomiques fonctionnelles des Bregs restreintes aux espèces.

Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells

Florian Dubois^{1,2}, Sophie Limou¹, Mélanie Chesneau^{1,2}, Nicolas Degaugue^{1,2}, Sophie Brouard^{1,2,3*} and Richard Danger^{1,2*}

¹Nantes Université, CHU Nantes, Centrale Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

²Labex IGO, Nantes, France

³Centre d'Investigation Clinique en Biothérapie, Centre de ressources biologiques (CRB), Nantes, France

* Last authors equally contributed and are listed by alphabetical order.

Keywords : meta-analysis, gene expression, immunoregulation, B cells, B lymphocytes, interleukin 10, granzyme B

Corresponding authors : Dr. Sophie Brouard and Dr. Richard Danger, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie INSERM UMR1064, Université de Nantes, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, RTRS « Centaure », 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Phone: +33 2 40 08 74 10, Email: sophie.brouard@univ-nantes.fr; richard.danger@univ-nantes.fr

Abbreviations: Bregs: Regulatory B cells; GZMB: Granzyme B; IL-10: Interleukin 10; Tregs: regulatory T cells; CpG oligodeoxynucleotides: CpG ODN; RNAseq: RNA sequencing; FDR: False discovery rate; FC: Fold change; GO: Gene ontology; HDM: House dust mite; MFI:

Mean fluorescent intensity; FPKM: Fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments; IDs: Unique Entrez gene identifiers; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells.

Abstract

Regulatory B cells (Bregs) have the ability to regulate inflammation in various pathological situations, making them key players in immune regulation. Several mechanisms have been described and we recently identified a GZMB expressing Breg population in kidney transplanted patients who tolerate a kidney graft. To further investigate their biology and mechanisms, we conducted a transcriptomic analysis by RNAseq of these cells and we performed the first weighted meta-analysis of publicly available transcriptomic data from published Breg studies both in humans and mice. We identified two distinct and unique transcriptional signatures of 165 and 93 genes, respectively associated with these Bregs. While we highlighted genes coding for proteins with potent involvement in regulatory functions, proliferation, apoptosis and coding for transcription factors, the comparison between humans and mice did not allow identifying a common pattern. Thus our results suggest distinct species-restricted Breg transcriptional signatures in humans and mice.

Introduction

B lymphocytes are key players in the immune response via the production of antibodies and as antigen-presenting cells leading to T cell activation. Over the last decade, some B cell subsets were also instrumental in limiting excessive inflammatory processes (Wasik et al. 2018). These B cells with suppressive properties, also called regulatory B cells (Bregs), were first described in mice for their ability to regulate inflammation in different models of colitis, experimental autoimmune encephalomyelitis and arthritis (Fillatreau et al. 2002, Mizoguchi et al. 2002, Mauri et al. 2003). In humans, regulatory functions of some B cell subsets have also been demonstrated in different clinical settings, including cancer, autoimmunity and tolerance towards kidney or skin allografts (Minagawa et al. 2004, Iwata et al. 2011, Chesneau et al. 2014).

B cells producing granzyme B (GZMB⁺) with suppressive properties have been discovered in a growing number of immunological contexts, such as B cell chronic lymphocytic leukemia (Jahrsdorfer et al. 2006), solid tumor infiltrates (Lindner et al. 2013), autoimmune diseases (Hagn et al. 2010), infections (Kaltenmeier et al. 2015) and recently in tolerant kidney transplanted patients by our group (Chesneau et al. 2015). To better characterise these GZMB⁺ Bregs, we performed a transcriptomic analysis of these cells revealing modulated immunoregulatory-related genes playing potential role in GZMB⁺ Bregs.

Interestingly, these Bregs, as others, display suppressive functions on different cell types, including T cells, dendritic cells, monocytes and by promoting regulatory T cells (Tregs) (Rosser and Mauri 2015). They can act through multiple mechanisms, including interleukin-10 (IL-10), interleukin-35 (IL-35), granzyme B (GZMB), TGF β production and/or cell-to-cell contact via programmed death-ligand 1 (PD-L1), Fas ligand (FasL) and glucocorticoid-induced TNFR-

related ligand (GITRL) expression (Shen et al. 2014, Chesneau et al. 2015, Ray et al. 2015, Oleinika et al. 2019). All these studies highlight the dual potential usefulness of B cells as a target in the control of the immune response, opening avenues in cell therapy, and as biomarkers. However, the use of Bregs in the clinic would need to rely on their clear characterisation and the possibility of isolating them and to date, Bregs are mainly classified by their suppressive mechanisms and no consensual phenotype has been proposed thus far either in humans or mice, rendering their study very difficult. Key Breg signalling molecules are missing, and whether there is a Breg lineage commitment driven by specific transcription factor(s) or if they acquire their suppressive function upon environmental conditions remains to be elucidated. To answer this question, we conducted the first meta-analysis of transcriptomic datasets related to cells defined as Bregs in the literature, both in humans and mice in order to identify a common Breg transcriptomic signature. The meta-analysis integrated 4 studies in humans (van de Veen et al. 2013, Lin et al. 2014, Bigot et al. 2016) including the RNAseq analysis we performed herein and 5 studies in mice (Shen et al. 2014, Braza et al. 2015, Khan et al. 2015, Lino et al. 2018, Ray et al. 2019). The diversity of datasets warranted the coverage of various Breg phenotypes and functions. We identified two distinct and unique transcriptional signatures associated with human and mouse Bregs and the comparison between these two signatures did not allow highlighting a common pattern, suggesting distinct species-restricted Breg transcriptional signatures in humans and mice with specific signalling pathways.

Materials and methods

Data collection

To identify a unique gene expression signature of Bregs in humans and mice, we collected 10 publicly available transcriptomic datasets related to Bregs from the Gene Expression Omnibus (GEO) or ArrayExpress databases (Table 1, sample size are indicated while number of experiments were not available). Among these, 3 microarray datasets were specific to human Bregs (GEO accession numbers: GSE35002, GSE50895, GSE76272). In addition, we included our RNAseq analysis of human Breg populations expressing granzyme B (GZMB⁺ Bregs) (GEO accession number: GSE125901). Five microarray and 2 RNAseq datasets were retrieved for mouse Bregs (GSE46245, GSE35998, GSE57772, GSE63426, GSE103458 and GSE111911, ArrayExpress E-MTAB-2100). The studies of Sun *et al.* (GSE63426) (Sun et al. 2015) and Klinker *et al.* (GSE46245) (Klinker et al. 2013) have not been included in the meta-analysis as the small sample size prevents the use of statistical tests with n=2 and n=1 in Bregs compared to non-Bregs in Sun *et al.* and in Klinker *et al.* respectively (Table 1). No experiments were performed using animals but animal data were obtained from previous and published studies as stated above.

GZMB⁺ B cell expansion

Blood samples were obtained from healthy volunteers from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France) after a written consent was obtained. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated after Ficoll density centrifugation (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Total B cells were isolated from freshly purified PBMCs by negative selection on magnetic columns according to the manufacturer's instructions (B Cell Isolation Kit II; Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany). For the expansion of GZMB⁺ B cells, total B cells were

stimulated at 1.10^6 cells/ml for 3 days in complete RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) containing L-glutamine, penicillin/streptomycin (Life Technologies), and 10% FCS (Lonza) in 24-well plates (Nunc) at 37°C and 5% CO₂. Stimulation was performed using CD40L (50 ng/mL; R&D systems, Minneapolis, MN, USA), CpG oligonucleotides (1 µg/ml; ODN 2006, Invivogen, Toulouse, France), F(ab')₂-goat anti-human IgA, IgG, IgM (H+L) (5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), IL-2 (50 UI/ml; Novartis, Bâle, Switzerland) and IL-21 (10 ng/ml; Miltenyi Biotec).

RNaseq Analysis

After 3 days of expansion, B cells were permeabilized, fixed and stained with anti-GZMB-Alexa645 (BD Biosciences) for 30 min at 4°C. Next, GZMB^{+hi} B cells (n=7) and GZMB^{-low} B cells (n=9) were sorted on a FACS ARIA II (BD Biosciences) using FACSDiva software. Because of permeabilization, we followed the Method for Analyzing RNA following Intracellular Sorting (MARIS) to preserve the RNA (Hrvatin et al. 2014). After sorting, total RNA was extracted using a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). RNA quantity was measured with a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), and RNA quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer. All samples had high RNA integrity values (RIN ≥ 6), allowing comparisons of data between GZMB^{+hi} and GZMB^{-low} B cells. Transcriptome analysis was performed according to the SmartSeq2 protocol by the Broad Technology Labs and the Broad Genomics Platform, Boston (Picelli et al. 2013, Picelli et al. 2014), with some modifications (Trombetta et al. 2014). Briefly, total RNA was purified using RNA-SPRI beads. PolyA mRNA was converted to cDNA, and amplified cDNA was subjected to transposon-based fragmentation that used dual indexing to barcode each fragment of each converted transcript with a combination of barcodes specific to each sample. Paired-end

sequencing (2x25 bp) was carried out with an additional 8 cycles for each index. Data were separated by barcode and aligned using Tophat version 2.0.10 (Kim et al. 2013) with default settings. Transcripts were quantified by the Broad Technology Labs computational pipeline using Cuffquant version 2.2. (Trapnell et al. 2012). Briefly, data were processed through CuffNorm if 50% of the reads aligned and if at least 100,000 pairs were aligned per sample. The default settings, including “geometric” normalization, were used for normalization. RNA-Seq data can be accessed under GEO accession number GSE125901.

Data processing

For each dataset, raw data were processed following a homogenous method and running quality controls at each step, notably to assess correlation between samples. Raw data were normalized according to the microarray platform. Single-channel Agilent microarrays were processed with the *limma* R package (Ritchie et al. 2015) with the *backgroundCorrect* and *normalizeBetweenArrays* (quantile) functions, while the normalization of the two-color microarray Van de Veen *et al.* dataset was performed with the *normalizeWithinArrays* (loess) and *normalizeBetweenArrays* (quantile) functions. Control Agilent spots were filtered out, and the average expression values were calculated for probe replicates. Raw data from Affymetrix microarrays were processed with the *affy* package using the robust multichip average (*rma*) normalization. For RNAseq data, fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments (FPKM) values were retrieved from GEO, and log₂-transformed FPKM+0.25 were calculated. Unique Entrez gene identifiers (IDs) (Maglott et al. 2011) were retrieved and updated using the *Biomart* R package (Durinck et al. 2005). For the Lin *et al.* dataset (Lin et al. 2014), probe annotation was not available in Biomart, and we used the *huex10sttranscriptcluster.db* package (MacDonald 2017) with the *annotate* package (Gentleman 2019). Only probes matching a unique gene ID were selected, and average

expression values were calculated for genes with multiple probes. Poorly expressed genes were filtered out using the first quartile of gene medians in each microarray dataset. In RNAseq datasets, genes with a negative mean were filtered out.

Identification of differentially expressed genes in individual datasets

Differentially expressed genes between Bregs and non-Bregs were identified for each dataset independently using the *limma* R package with the linear modelling and empirical Bayes methods (Law et al. 2014). For RNAseq data, estimation of the mean-variance relationship was performed (*limma-trend*) (Law et al. 2014). When information was available, patients and mouse origins as well as batch effects were added as covariates in the linear model. Genes with a Benjamini-Hochberg false-discovery rate (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995) inferior to 5% and a fold change (FC) superior to 2 were considered significantly differentially expressed.

Meta-analysis of gene expression datasets

Considering the sample heterogeneity regarding phenotypes, cell processing and array/RNAseq platforms, we conducted a weighted meta-analysis by combining individual p-values from each study. This method allowed us to integrate study-specific summary statistics to identify a unique gene expression signature for both human and mouse Bregs. The sample size-weighted meta-analysis (Stouffer's Z-score method) was performed using METAL software (Willer et al. 2010). METAL converted the p-value and direction of effect observed in each study into an intermediate Z-score. Then, an overall Z-score and p-value were calculated in a weighted sum across samples, with weights proportional to the square-root of the number of individuals examined in each dataset. Given that all genes may not be detected in every dataset, we kept genes which expression was absent in one dataset (measured in 3 out of 4

datasets in humans and in 5 out of 6 datasets in mice). Then, genes with a Bonferroni corrected p-value <5% and a Z-score >3 that displayed the same differential expression direction across all the studies (up- or downregulation) were considered differentially expressed.

Gene expression visualization and biological relevance

Principal component analysis and clustering were performed using *ade4*, *adegraphics* and *heatmap3* packages (Dray and Dufour 2007, Zhao et al. 2014, Siberchicot et al. 2017). The biological significance of identified Breg-related genes was assessed using *clusterProfiler* package (Yu et al. 2012). Gene ontology (GO) categories enriched from the list of expressed genes with an FDR<20% and with at least five genes were selected. The STRING database was used to construct gene networks based on known and predicted protein-protein interactions (Szklarczyk et al. 2019). The interactions include direct (physical) and indirect (functional) associations. To search for potential enrichment of transcription factor targets, we used oPOSSOM with the CORE JASPAR database (Kwon et al. 2012). The Breg signature gene list was compared to all the genes over the entire dataset as a background. Default parameters were used with Z- and Fisher scores as selection criteria (Z-score > mean plus 2 times standard deviation of Z-scores; Fisher score > mean plus the standard deviation of Fisher scores), as recommended (Kwon et al. 2012).

Results

GZMB⁺ Breg RNAseq analysis

We performed RNAseq on sorted GZMB^{+hi} and GZMB^{-low} B cells after 3 days of expansion (Figure 1A). Sample duplicates displayed greater than 98% correlation. Among the 13,590 expressed genes in B cells, 119 were differentially expressed between GZMB^{+hi} and GZMB^{-low} B cells (Table S1, adjusted p value <0.05 and fold change >2) that well discriminates both populations (Figure 1B). GO analysis highlighted significant enrichment of molecules related to immune system process (GO: 0002376) and particularly to regulation of lymphocyte activation and regulation (such as negative regulation of lymphocyte activation (GO 0051250); negative regulation of leukocyte activation (GO 0002695); negative regulation of cell activation (GO 0050866); and regulation of lymphocyte activation (GO 0051249); all FDR<0.01) (Figure 1C). We also identified an interaction node of genes with functions related to “immune system process” (GO: 0002376, in red) and to “negative regulation of lymphocyte activation” (GO 0051250, in blue) (Figure 1D) associated with GZMB^{+hi} Bregs. These profiles are illustrated by the top gene list including genes such a GZMB, LAG3, FASL up-regulated in GZMB^{+hi} Bregs and already described for their role in regulation in different situations (Figure S1).

Human Breg transcriptomic data processing

In order to highlight a common signature of Breg, independently of their functional properties, we performed a meta-analysis of available transcriptional dataset of Bregs. The bioinformatic analysis workflow is summarized in Figure 2A. Three studies were available in addition to our GZMB-related Breg dataset including three different phenotypes (Table 1). Briefly, Van de Veen *et al.* compared transcriptomic expression of IL-10-producing Bregs (IL-

10⁺ Bregs) to non-IL-10 producing B cells (IL-10⁻ B cells) sorted from purified peripheral B cells and stimulated during 72 hours with CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) (n=6 vs 6, Bregs vs non-Bregs) (van de Veen et al. 2013). Lin *et al.* compared the transcriptomic expression of IL-10⁺ Bregs and IL-10⁻ B cells sorted from purified peripheral B cells and stimulated during 48 hours with CpG ODN and anti-Ig (IgA⁺ IgG⁺ IgM⁺) (n=5 vs 10) (Lin et al. 2014). Bigot *et al.* compared *ex vivo* Bregs characterised as CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells with CD19⁺CD24⁺CD38⁻ and CD19⁺CD24^{int}CD38^{int} non-Bregs (n=10) (Bigot et al. 2016). After normalization and filtration, a total of 10 992 genes were expressed in Lin *et al.*, 15 776 in Bigot *et al.*, 14 434 in Van de Veen *et al.* and 13 590 in the GZMB⁺-Breg dataset. (Figure 2A). Batch effects were identified in the GZMB⁺-Bregs dataset and Bigot *et al.* and were included as “batch effect” covariates in the linear regression models for the differential analysis and corrected using Combat for data visualization (Johnson et al. 2007). The statistical analysis comparing Bregs and non-Bregs for each independent study resulted in the identification of 276, 13, 77 and 119 differentially expressed genes (FDR<5% and a FC>2) from Van de Veen *et al.*, Lin *et al.*, Bigot *et al.*, and GZMB⁺-Bregs dataset respectively (Figure 2A).

While 7 274 genes were commonly expressed in each dataset (Figure S2A), most of the Breg differentially expressed genes were study-specific, with little overlap between studies and no common gene between the 4 studies (Figure S2A). However, the GO pathway enrichment analysis performed in each study revealed one common and enriched GO term (FDR<20%) related to “leukocyte migration” (GO:0050900) in 3 studies: Lin *et al.* (FDR= 0.09%), Van de Veen *et al.* (FDR= 9.8%), and our GZMB⁺-Bregs dataset (FDR= 0.09%; Figure S2B).

Identification of a core gene signature discriminating Bregs from non-Bregs in humans

The absence of a common Breg signature from the direct comparison of independent human studies may be due to the low number of samples in each dataset and to the heterogeneous cell origins and phenotypes, which increased gene expression variability. Meta-analysis are a powerful tool to combine data from different studies while accounting for study-specific issues, including substructure or covariates. Here, we conducted a weighted meta-analysis by combining the data (sample size, p-values and effect size) from the 4 previous independent studies (see Methods) to identify genes differentially expressed in the Breg phenotypes.

The meta-analysis strategy revealed a signature of 165 genes that were differentially expressed between Bregs and non-Bregs and that segregated Bregs from non-Bregs in each dataset individually (Figure 3) (Bonferroni corrected p-value <5%, Z-score >3 and all studies with data and effect sizes in the same direction; Supplementary Table 2A). Previously, known Bregs-related genes, such as *GZMB* and *ENPP1* (Chesneau et al. 2015, Schumacher et al. 2018), were overexpressed, confirming the relevance of the meta-analysis Breg signature. Using the STRING gene network tool, we identified two interaction nodes with functions related to the “Mitotic cell cycle” and “Ribonucleoprotein complex biogenesis” from the 75 upregulated genes (Figure 4A). Similarly, an interaction node related to the receptors of cytokines (IL-10 receptor α , *IL10RA*), of cysteinyl leukotrienes (*CYSLTR1*), to the immunomodulatory receptor *LY9* and the purinergic receptor *P2RY10* was identified from the 90 downregulated genes (Figure 4B). Finally, the pathway analysis revealed a 5.79-fold enrichment for the “negative regulation of leukocyte activation” ontology term (GO:0002695; FDR=19.5%). Eight genes were represented in this pathway, including *BANK1*, *NFKBID* and *LAX1*, which are identified as BCR signalling regulators, and *LRRC32* (*GARP*), which is known to be functionally linked and to

be expressed in complex with latent TGF- β 1 on the surface of Tregs (Figure S2C) (Tran et al. 2009, Cuende et al. 2015).

To highlight transcription factors that could drive regulatory functions, we assessed their presence among the Breg signature and highlighted 13 transcription factors. Six out of 13 were upregulated: *HIVEP3*, *MYBL2*, *HNF1B*, *FOSL1*, *FOSL2* and *KLF5*, which are involved in the regulation of B cell survival, activation and antibody production (Figure S2D) (Grotsch et al. 2014, Luo et al. 2019). The 7 downregulated transcription factors in Bregs, *TFEC*, *ZBTB20*, *ZBTB4*, *RFX3*, *ZNF217*, *BHLHE41* and *PLAG1*, are involved in survival, growth, cell differentiation and the regulation of the circadian rhythm (Huang et al. 2005, Nakashima et al. 2008, Smith et al. 2010) (Figure S2D). Finally, the predicted enrichment of transcription factor binding sites revealed 2 transcription factors among the 165 differentially expressed genes: *FOXA1*, which exhibited an enrichment in the frequency of predicted binding sites, and *GABPA*, which was associated with a high Fisher score, meaning that a high enrichment of genes presented a binding motif of *GABPA* in the Breg signature (Figure 5A). While *GABPA* targeted 98 genes representing 59.4% of the human Breg signature (enrichment: 1.25), *FOXA1* was predicted to target 113 genes among the 165 human Breg signature, which represented 68.5% of the human Breg signature (enrichment: 1.1). Additionally, we retrieved the “negative regulation of leukocyte activation” ontology enrichment among the *FOXA1* targeted genes (GO:0002695; FDR=14.6%, enrichment: 6.28; see Figure 5B).

Altogether, we identified a common human Breg signature of 165 differentially expressed genes, including genes known to be involved in immune regulation and the cell cycle and coding for transcription factors implicated in B cell survival.

Mouse Breg transcriptomic data processing

A similar approach was performed using murine transcriptomic datasets of Bregs. Five studies were included in the meta-analysis (Table 1B): Shen *et al.* compared splenic unstimulated B cells to splenic B cells stimulated with LPS and anti-CD40 antibody for 24 h, leading to IL-35 production and the acquisition of regulatory functions (n= 4 vs 4) (Shen et al. 2014). Khan *et al.* compared CD19⁺CD1d^{high} splenic Bregs sorted from *Schistosoma mansoni*-infected mice to CD19⁺ splenic B cells from non-infected mice (n=3 vs 2) (Khan et al. 2015). Braza *et al.* compared IL-10⁺ Bregs to IL-10⁻ B cells sorted from splenic B cells stimulated with anti-CD40 antibody and LPS obtained from control mice (n=3 vs 3) and from a model of house dust mite (HDM)-induced allergic airway inflammation (n= 3 vs 3) (Braza et al. 2015). Lino *et al.* compared CD138^{hi}IL-10⁺ splenic Bregs to CD138^{hi}IL-10⁻ splenic B cells sorted 24 h after challenge with *Salmonella typhimurium* (n=3 vs 3) (Lino et al. 2018). Finally, Ray *et al.* compared follicular B220⁺IgM^{int}CD21^{int} CD23⁺CD93⁻IgD^{low/-} splenic Bregs to follicular B220⁺IgM^{int}CD21^{int}CD23⁺CD93⁻IgD^{hi} splenic B cells (n=3 vs 3) (Ray et al. 2019). To identify differentially expressed genes between Bregs and non-Bregs in Braza *et al.*, we considered the gene expression analysis between IL-10⁺ Bregs vs. IL-10⁻ B cells in control mice independently from the analysis in HDM mice. Moreover, one HDM-treated mouse was identified through data processing as an outlier on the principal component analysis (PCA) plot and was removed from the analysis. In addition, the study from Klinker *et al.* compared splenic Bregs with a CD5⁺CD1d^{high} phenotype to splenic CD5⁻CD1d^{high} B cells (Bregs vs non-Bregs, n=1 vs 1) but could not be included in the meta-analysis due to small sample size preventing the statistical analysis (Klinker et al. 2013). Overall, 6 studies were available for the meta-analysis with 12 667 expressed genes obtained after normalization and filtration process in Shen *et al.* and Lino *et al.*, 12 671 in Braza *et al.* both in HDM and control mice studies and 9 568 in Ray *et al.* (Figure 2B).

Analysing each dataset independently, 1 386 genes were found to be differentially expressed between Bregs and non-Bregs in Shen *et al.* (FDR<5% and a FC>2), 5 genes were differentially expressed in HDM mice and 5 genes in control mice from Braza *et al.*, 278 in Lino *et al.* and 165 in Ray *et al.* (data not shown). As in humans, likely due to the low sample sizes and cell heterogeneity, the gene lists intersection did not reveal a common Breg gene signature. While there is no GO enrichment in the studies of Braza *et al.* and Khan *et al.*, given the low number of differentially expressed genes, GO enrichment analysis performed in Lino *et al.*, Shen *et al.*, and Ray *et al.* studies revealed 48 common and enriched GO terms related to immune response and cell cycle including “regulation of leukocyte activation” (GO:0002694) and “cell division” (GO:0051301) (Figure S3A).

Identification of a core gene signature discriminating Bregs from non-Bregs in mice

Applying the same meta-analysis strategy as for human datasets, a common Breg mouse signature of 93 genes was identified (Bonferroni corrected p-value <5%, Z-score >3, expression data in at least 5 out of 6 studies and with an effect size going in the same direction in each study; Figure 6; Supplementary Table 2B). Interestingly, using the mouse Breg gene signature, we observed a similar pattern of this signature between Bregs and non-Bregs in Klinker *et al.* used as an independent validation dataset (Figure 6G).

Among the 93 differentially expressed genes, 41 and 52 were up- and downregulated, respectively, in Bregs vs non-Bregs. As in humans, we found an enrichment for the “Negative regulation of leukocyte activation” ontology (GO:0002695) (FDR= 4.38×10^{-5} , enrichment: 11) in the mouse Breg signature (Figure S3B) with the participation of 10 genes mostly up-regulated: *Il10*, *Lag3*, *Ctla4*, *Prdm1*, *Bcl6*, *Peli*, *Axl*, *Ripor2*, *Cd300lf* and *Tbc1d10c*, with 6 of them forming a node in the protein interaction network (Figure S3B).

Regarding transcription factors, 2 were upregulated and 4 were downregulated in the mouse Breg signature, including *Bcl6* and *Prdm1*, which are involved in B cell differentiation and maturation (Crotty et al. 2010). As in human analysis, to investigate whether some of the differentially expressed genes were regulated by common(s) transcription factor(s), we looked at predicted enrichment of transcription factor binding sites in the signature gene list. We highlighted two transcription factors, *Ddit3::Cebpa*, implicated in adipogenesis, erythropoiesis in promoting apoptosis and *Prrx2*, which has possible roles in mechanisms that control mammalian dermal regeneration (Figure S3C). *Ddit3::Cebpa* targeted 36 genes among the 93 genes in the mouse Breg signature, which represented 39% of the mouse Breg signature (enrichment: 1.3), including *Bcl6* and *Prdm1* (Figure S3D). However, *Prrx2* targeted 84 genes representing 39% (enrichment: 1.15).

Altogether, these results show a clear gene mouse signature for Bregs with 93 differentially expressed genes with mostly upregulated genes involved in the regulation of immune response and an enrichment of transcription factor binding sites in genes with B cell differentiation function.

Discussion

To date, multiple subsets of Bregs have been described according to their phenotypes and/or regulatory functions but with little consensus (Mauri and Menon 2015). Several independent studies have been conducted to characterise Bregs, notably by comparing their transcriptomic profile to B cells with no regulatory function but only in very small sample cohorts with different Breg subsets. In this study, we conducted the first meta-analysis of Breg transcriptomic datasets from humans and mice to identify a core pattern of Bregs. Available human Breg datasets were related to IL-10⁺ and CD24^{hi}CD38^{hi} Bregs and we performed a GZMB^{+/hi} RNAseq analysis (GEO accession number: GSE125901) to increase the landscape of Breg subset transcriptomic datasets. By integrating all the data, we identified two distinct and unique transcriptional signatures associated with no common pattern, suggesting distinct species-restricted Breg transcriptional signatures in humans and mice with specific signalling pathways.

By integrating their derived information, this meta-analysis has the advantage of increasing power and identifying more and shared relevant genes with differential expression between Bregs and non-Bregs than crossing gene lists. Our approach benefited from the use of samples considered heterogeneous to define a core signature of the already reported and various Breg subsets, allowing generalization of our findings. Since the meta-analysis integrated studies from different gene expression microarray platforms and RNA sequencing (RNAseq) datasets, we chose to perform a meta-analysis combining p-values instead of a “mega-analysis”, in which all arrays are gathered in a unique expression matrix (Walsh et al. 2015). Both strategies have been found equivalent, the former being less demanding in assumptions (Lin and Zeng 2009). After a rigorous data processing step, including data

normalization and removal of the potential technical effects, the weighted meta-analysis allowed a robust selection of differentially expressed genes. While this approach was flexible, two datasets had to be excluded as only one or two replicates were used (Klinker et al. 2013, Sun et al. 2015). However, the identified Breg signature also discriminated Bregs and non-Bregs in the dataset from Klinker *et al.*, confirming the relevance of our signature. In addition, this analysis was designed to focus on a shared Breg signature and stringent parameters have been used including the conservative Bonferroni multi-testing correction and the need that, for a gene of interest, the same expression direction across all the studies was observed. Thus, whereas GZMB is over-expressed in all the human datasets, this stringent filter discarded genes of potential interest, such as *IL10* and *CD9* which were over-expressed in 3 out of 4 human datasets but downregulated in the latter one (GZMB⁺-Breg and Lin *et al.* datasets respectively) (Figure S4). The same in mice with *Cd9* which was overexpressed in 4 out of 6 datasets and down-regulated in the two others (Shen *et al.* and Lino *et al.* datasets). Such a stringent filter appears as the only way to clearly focus on common Breg molecules.

We found that key immune regulatory coding genes were modulated in accordance with the functions of Bregs in both species. In humans, we identify a signature of 165 genes discriminating Bregs. This signature is composed of 74 upregulated genes with some known genes as immune regulators, such as *GZMB*, or *ENPP1* which is also linked to IL-10⁺ Bregs. Indeed, in humans, ENPP1⁺ B cells did not express IL-10 in contrast with mouse Bregs (Wang et al. 2012, Schumacher et al. 2018) but enhanced IL-10 production by Tregs and suppressed proliferation of activated T cells (Yoon et al. 2016). Bregs also exhibited an up-regulated expression of *IGF2R* encoding a receptor for both insulin-like growth factor 2 and mannose 6-

phosphate (M6PR) (Scott and Kiess 2015). Here again, its expression in mouse B cells was associated with IL-10 production (Geng et al. 2014) and its activation in Tregs enhanced their suppressive function and their role in inhibiting intestine allergic inflammation (Yang et al. 2014). In accordance with these findings, high expression of mannose 6-phosphate receptor (M6PR) has been shown to alter mouse CD8⁺ T cell survival leading to apoptosis induced by GZMB (Ahmed et al. 2015). Accordingly, *IGF2R* may have a similar function in GZMB⁺ Bregs to regulate their expansion. This is in accordance with our recent findings reporting GZMB⁺ Bregs with a higher susceptibility to apoptosis (Chesneau *et al.*, personal communication ESOT 2017). Interestingly, functions related to “mitotic cell cycle” and “ribonucleoprotein complex biogenesis” are also highlighted within upregulated genes forming two protein interaction nodes linked by the GZMB molecule. In addition, *DUSP2* and *DUSP5* that are upregulated in Bregs are involved in the inactivation ERK signaling, which is implicated in plasma cell differentiation (Rui et al. 2006). These results suggest that Bregs exhibit an active proliferation state with tightly regulated mechanisms for their survival and regulatory function.

Similarly, in mice, Bregs exhibited a 93 gene signature also allowing a clear discrimination from non-Bregs with 41 upregulated genes and enriched in immune response-related ontologies. We found upregulation of the gene coding for the Breg-related protein IL-10 and of genes involved in T cell immune regulation, including *Lag3* and *Ctla4* (Liang et al. 2008). While *LAG3* expression has already been associated with a natural mice regulatory plasma cell phenotype (Lino et al. 2018) and in our human GZMB⁺ Bregs dataset, its role in Bregs function needs further investigation, as for *CTLA4*. Other immune-related genes were found, such as *Bcl6* and *Prdm1*, that were involved in the maturation of immunoglobulin-secreting cells (Crotty et al. 2010), and *CD70* was upregulated in Bregs implicated in B cell and T cell activation (Denoeud and Moser 2011).

Thus, not surprisingly, *GZMB* and *IL10*, both associated with Breg subsets in different situations (Mauri and Menon 2015), were found among the most differentially expressed genes in human and mouse Bregs respectively. Although IL-10⁺ Bregs have been evidenced both in humans and mice, GZMB⁺ Bregs have been shown only in humans, which is in accordance with our meta-analysis. Interestingly, we compared the human and mouse Breg signatures by crossing the 165 human gene signatures with the 93 orthologous human genes of the mouse signature and identified only 3 common genes, *PPFIBP2*, *LAPTM4B* and the transcription factor *HIVEP3* (Figure S2D). These data fit together and did not suggest a conserved Breg signature between humans and mice. To our knowledge, the interacting protein PPFIBP2 and the lysosomal protein LAPTM4B have no known roles in B cells, but LAPTM4B is known to be a negative regulator of TGF- β production in human Tregs (Huygens et al. 2015). Interestingly, the transcription factor HIVEP3 appears to be a common transcription factor in Bregs from humans and mice and is known to bind the recognition signal sequences for somatic recombination of immunoglobulins (Allen et al. 2002). It also interacts with TRAF proteins, leading to the inhibition of the nuclear factor NF-kappa-B-mediated response, including apoptosis and proinflammatory cytokine gene expression, in T cells (Oukka et al. 2002). Thus, whether this transcription factor HIVEP3 possesses roles in Breg suppressive activities remains to be elucidated.

Other transcription factors are highlighted in humans, with 7 that were downregulated (*TFEC*, *ZBTB20*, *ZBTB4*, *RFX3*, *ZNF217*, *BHLHE41* and *PLAG1*) and 6 that were upregulated (*HIVEP3*, *MYBL2*, *HNF1B*, *FOSL1*, *FOSL2* and *KLF5*) in Bregs. Among them, FOSL1 is described as a negative regulator of proliferation and a positive regulator of apoptosis in mouse B cells

(Grotsch et al. 2014). KLF-5 may participate in both the promotion and suppression of cell proliferation (Luo et al. 2019). In mice, we found an upregulation and downregulation of the transcription factors *Prdm1* and *Bcl6*, respectively. Both are targeted by Ddit3::Cebpa transcription factor binding sites that were enriched in the Breg signature. Given that *Bcl6* is an important inducer of germinal center B cell differentiation while *Prdm1* coding for *Blimp-1* is crucial in plasma cell differentiation, our results are in accordance with data from the literature identifying Bregs with a plasma cell profile (Crotty et al. 2010, Chesneau et al. 2015).

Altogether, this transcriptional meta-analysis shed light on species-specific molecules, signalisation and extracellular molecules associated with B cell development and maturation. These results support the hypothesis that B cells acquire their regulatory function under certain environmental conditions with possible implication of some common transcription factors but do not support the hypothesis of a specific Breg cell lineage.

Acknowledgment

This work was supported in the context of the ANR project BIKET (ANR-17-CE17-0008), the University Hospital Institute (IHU)-European Center for Transplantation and Immunotherapy Services (CESTI), the DHU Oncogreffe and the LabEX IGO thanks to French government financial support managed by the National Research Agency via the “Investment into the Future” program (ANR-10-IBHU-005 and ANR-11- LABX-0016-01). The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. Richard Danger was supported by a Marie Skłodowska-Curie fellowship (IF-EF) from the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Programme (grant agreement 706296). We thank the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for expert technical assistance. FD, SB, and RD designed the study. FD and MC carried out the experiments. FD, SL, and RD analyzed the data. FD, MC, SL, ND, SB, and RD drafted and revised the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- Ahmed, K. A., L. Wang, P. Griebel, D. D. Mousseau and J. Xiang (2015). "Differential expression of mannose-6-phosphate receptor regulates T cell contraction." *J Leukoc Biol* **98**(3): 313-318.
- Allen, C. E., C. H. Mak and L. C. Wu (2002). "The kappa B transcriptional enhancer motif and signal sequences of V(D)J recombination are targets for the zinc finger protein HIVEP3/KRC: a site selection amplification binding study." *BMC Immunol* **3**: 10.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing." *J. Royal Statist. Soc., Series B* **57**: 289-300.
- Bigot, J., C. Pilon, M. Matignon, C. Grondin, C. Leibler, A. Aissat, F. Pirenne, J. L. Cohen and P. Grimbert (2016). "Transcriptomic Signature of the CD24(hi) CD38(hi) Transitional B Cells Associated With an Immunoregulatory Phenotype in Renal Transplant Recipients." *Am J Transplant* **16**(12): 3430-3442.
- Braza, F., J. Chesne, M. Durand, S. Dirou, C. Brosseau, G. Mahay, M. A. Cheminant, A. Magnan and S. Brouard (2015). "A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation." *Allergy* **70**(11): 1421-1431.
- Chesneau, M., L. Michel, E. Dugast, A. Chenouard, D. Baron, A. Pallier, J. Durand, F. Braza, P. Guerif, D. A. Laplaud, J. P. Soulillou, M. Giral, N. Degauque, E. Chiffolleau and S. Brouard (2015). "Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties." *J Am Soc Nephrol* **26**(10): 2588-2598.
- Chesneau, M., A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S. Le Gallou, D. Baron, M. Giral, R. Danger, P. Guerif, H. Aubert-Wastiaux, A. Neel, L. Michel, D. A. Laplaud, N. Degauque, J. P. Soulillou, K. Tarte and S. Brouard (2014). "Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients." *Am J Transplant* **14**(1): 144-155.
- Crotty, S., R. J. Johnston and S. P. Schoenberger (2010). "Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation." *Nat Immunol* **11**(2): 114-120.
- Cuende, J., S. Lienart, O. Dedobbeleer, B. van der Woning, G. De Boeck, J. Stockis, C. Huygens, D. Colau, J. Somja, P. Delvenne, M. Hannon, F. Baron, L. Dumoutier, J. C. Renaud, H. De Haard, M. Saunders, P. G. Coulie and S. Lucas (2015). "Monoclonal antibodies against GARP/TGF-beta1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo." *Sci Transl Med* **7**(284): 284ra256.
- Denoed, J. and M. Moser (2011). "Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance." *J Leukoc Biol* **89**(2): 195-203.
- Dray, S. and A.-B. e. Dufour (2007). "The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists." *Journal of Statistical Software* **22**(4).
- Durinck, S., Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma and W. Huber (2005). "BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis." *Bioinformatics* **21**(16): 3439-3440.
- Fillatreau, S., C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* **3**(10): 944-950.
- Geng, X. R., G. Yang, M. Li, J. P. Song, Z. Q. Liu, S. Qiu, Z. Liu and P. C. Yang (2014). "Insulin-like growth factor-2 enhances functions of antigen (Ag)-specific regulatory B cells." *J Biol Chem* **289**(25): 17941-17950.
- Gentleman, R. (2019). "annotate: Annotation for microarrays." *R package version 1.62.0*.
- Grotsch, B., S. Brachs, C. Lang, J. Luther, A. Derer, U. Schlotzer-Schrehardt, A. Bozec, S. Fillatreau, I. Berberich, E. Hobeika, M. Reth, E. F. Wagner, G. Schett, D. Mielenz and J. P. David

- (2014). "The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells." *J Exp Med* **211**(11): 2199-2212.
- Hagn, M., V. Ebel, K. Sontheimer, E. Schwesinger, O. Lunov, T. Beyer, D. Fabricius, T. F. Barth, A. Viardot, S. Stilgenbauer, J. Hepp, K. Scharffetter-Kochanek, T. Simmet and B. Jahrsdorfer (2010). "CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B." *Eur J Immunol* **40**(7): 2060-2069.
- Hrvatin, S., F. Deng, C. W. O'Donnell, D. K. Gifford and D. A. Melton (2014). "MARIS: method for analyzing RNA following intracellular sorting." *PLoS One* **9**(3): e89459.
- Huang, G., S. Krig, D. Kowbel, H. Xu, B. Hyun, S. Volik, B. Feuerstein, G. B. Mills, D. Stokoe, P. Yaswen and C. Collins (2005). "ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction." *Hum Mol Genet* **14**(21): 3219-3225.
- Huygens, C., S. Lienart, O. Dedobbeleer, J. Stockis, E. Gauthy, P. G. Coulie and S. Lucas (2015). "Lysosomal-associated Transmembrane Protein 4B (LAPTM4B) Decreases Transforming Growth Factor beta1 (TGF-beta1) Production in Human Regulatory T Cells." *J Biol Chem* **290**(33): 20105-20116.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." *Blood* **117**(2): 530-541.
- Jahrsdorfer, B., S. E. Blackwell, J. E. Wooldridge, J. Huang, M. W. Andreski, L. S. Jacobus, C. M. Taylor and G. J. Weiner (2006). "B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation." *Blood* **108**(8): 2712-2719.
- Johnson, W. E., C. Li and A. Rabinovic (2007). "Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods." *Biostatistics* **8**(1): 118-127.
- Kaltenmeier, C., A. Gawanbacht, T. Beyer, S. Lindner, T. Trzaska, J. A. van der Merwe, G. Harter, B. Gruner, D. Fabricius, R. Lotfi, K. Schwarz, C. Schutz, M. Honig, A. Schulz, P. Kern, M. Bommer, H. Schrezenmeier, F. Kirchhoff and B. Jahrsdorfer (2015). "CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients." *J Immunol* **194**(8): 3768-3777.
- Khan, A. R., S. Amu, S. P. Saunders, E. Hams, G. Blackshields, M. O. Leonard, C. T. Weaver, T. Sparwasser, O. Sheils and P. G. Fallon (2015). "Ligation of TLR7 on CD19(+) CD1d(hi) B cells suppresses allergic lung inflammation via regulatory T cells." *Eur J Immunol* **45**(6): 1842-1854.
- Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley and S. L. Salzberg (2013). "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions." *Genome Biol* **14**(4): R36.
- Klinker, M. W., T. J. Reed, D. A. Fox and S. K. Lundy (2013). "Interleukin-5 supports the expansion of fas ligand-expressing killer B cells that induce antigen-specific apoptosis of CD4(+) T cells and secrete interleukin-10." *PLoS One* **8**(8): e70131.
- Kwon, A. T., D. J. Arenillas, R. Worsley Hunt and W. W. Wasserman (2012). "oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets." *G3 (Bethesda)* **2**(9): 987-1002.
- Law, C. W., Y. Chen, W. Shi and G. K. Smyth (2014). "voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts." *Genome Biol* **15**(2): R29.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit

- dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-5926.
- Lin, D. Y. and D. Zeng (2009). "Proper analysis of secondary phenotype data in case-control association studies." Genet Epidemiol **33**(3): 256-265.
- Lin, W., D. Cerny, E. Chua, K. Duan, J. T. Yi, N. B. Shadan, J. Lum, M. Maho-Vaillant, F. Zolezzi, S. C. Wong, A. Larbi, K. Fink, P. Musette, M. Poidinger and S. Calbo (2014). "Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate." J Immunol **193**(5): 2258-2266.
- Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T. F. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G. U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P. Moller, H. Schrezenmeier and B. Jahrsdorfer (2013). "Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells." Cancer Res **73**(8): 2468-2479.
- Lino, A. C., V. D. Dang, V. Lampropoulou, A. Welle, J. Joedicke, J. Pohar, Q. Simon, J. Thalmensi, A. Baures, V. Fluhler, I. Sakwa, U. Stervbo, S. Ries, L. Jouneau, P. Boudinot, T. Tsubata, T. Adachi, A. Hutloff, T. Dorner, U. Zimber-Strobl, A. F. de Vos, K. Dahlke, G. Loh, S. Korniotis, C. Goosmann, J. C. Weill, C. A. Reynaud, S. H. E. Kaufmann, J. Walter and S. Fillatreau (2018). "LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells." Immunity **49**(1): 120-133.
- Luo, S., S. Ding, J. Liao, P. Zhang, Y. Liu, M. Zhao and Q. Lu (2019). "Excessive miR-152-3p Results in Increased BAFF Expression in SLE B-Cells by Inhibiting the KLF5 Expression." Front Immunol **10**: 1127.
- MacDonald, J. (2017). "Huex10sttranscriptcluster. db: Affymetrix huex10 annotation data (chip huex10sttranscriptcluster)." R package version 8.7.0.
- Maglott, D., J. Ostell, K. D. Pruitt and T. Tatusova (2011). "Entrez Gene: gene-centered information at NCBI." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D52-57.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq and M. Londei (2003). "Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells." J Exp Med **197**(4): 489-501.
- Mauri, C. and M. Menon (2015). "The expanding family of regulatory B cells." Int Immunol **27**(10): 479-486.
- Minagawa, R., S. Okano, Y. Tomita, K. Kishihara, H. Yamada, K. Nomoto, M. Shimada, Y. Maehara, K. Sugimachi, Y. Yoshikai and K. Nomoto (2004). "The Critical Role of Fas-Fas Ligand Interaction in Donor-Specific Transfusion-Induced Tolerance to H-Y Antigen." Transplantation **78**(6): 799-806.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg and A. K. Bhan (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." Immunity **16**(2): 219-230.
- Nakashima, A., T. Kawamoto, K. K. Honda, T. Ueshima, M. Noshiro, T. Iwata, K. Fujimoto, H. Kubo, S. Honma, N. Yorioka, N. Kohno and Y. Kato (2008). "DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression." Mol Cell Biol **28**(12): 4080-4092.
- Oleinika, K., C. Mauri and A. D. Salama (2019). "Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease." Nat Rev Nephrol **15**(1): 11-26.
- Oukka, M., S. T. Kim, G. Lugo, J. Sun, L. C. Wu and L. H. Glimcher (2002). "A mammalian homolog of Drosophila schnurri, KRC, regulates TNF receptor-driven responses and interacts with TRAF2." Mol Cell **9**(1): 121-131.
- Picelli, S., A. K. Bjorklund, O. R. Faridani, S. Sagasser, G. Winberg and R. Sandberg (2013). "Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells." Nat Methods **10**(11): 1096-1098.

- Picelli, S., O. R. Faridani, A. K. Bjorklund, G. Winberg, S. Sagasser and R. Sandberg (2014). "Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2." Nat Protoc **9**(1): 171-181.
- Ray, A., M. I. Khalil, K. L. Pulakanti, R. T. Burns, C. J. Gurski, S. Basu, D. Wang, S. Rao and B. N. Dittel (2019). "Mature IgD(low/-) B cells maintain tolerance by promoting regulatory T cell homeostasis." Nat Commun **10**(1): 190.
- Ray, A., L. Wang and B. N. Dittel (2015). "IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action." Int Immunol **27**(10): 531-536.
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." Nucleic Acids Res **43**(7).
- Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." Immunity **42**(4): 607-612.
- Rui, L., J. I. Healy, J. Blasioli and C. C. Goodnow (2006). "ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation." J Immunol **177**(8): 5337-5346.
- Schumacher, A., S. Ehrentraut, M. Scharm, H. Wang, R. Hartig, H. C. Morse, 3rd and A. C. Zenclussen (2018). "Plasma Cell Alloantigen 1 and IL-10 Secretion Define Two Distinct Peritoneal B1a B Cell Subsets With Opposite Functions, PC1(high) Cells Being Protective and PC1(low) Cells Harmful for the Growing Fetus." Front Immunol **9**: 1045.
- Scott, C. D. and W. Kiess (2015). "Soluble M6P/IGF1IR in the circulation." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **29**(5): 723-733.
- Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R. A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V. D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M. D. Leech, R. C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinel, A. Grutzkau, J. R. Grun, K. Horn, A. A. Kuhl, T. Dorner, A. Bar-Or, S. H. E. Kaufmann, S. M. Anderton and S. Fillatreau (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature **507**(7492): 366-370.
- Siberchicot, A., A. Julien-Laferrrière, A.-B. Dufour, J. Thioulouse and S. Dray (2017). "adegraphics: An S4 Lattice-Based Package for the Representation of Multivariate Data." The R Journal **9**(2): 198-212.
- Smith, S. B., H. Q. Qu, N. Taleb, N. Y. Kishimoto, D. W. Scheel, Y. Lu, A. M. Patch, R. Grabs, J. Wang, F. C. Lynn, T. Miyatsuka, J. Mitchell, R. Seerke, J. Desir, S. Vanden Eijnden, M. Abramowicz, N. Kacet, J. Weill, M. E. Renard, M. Gentile, I. Hansen, K. Dewar, A. T. Hattersley, R. Wang, M. E. Wilson, J. D. Johnson, C. Polychronakos and M. S. German (2010). "Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans." Nature **463**(7282): 775-780.
- Sun, J., J. Wang, E. Pefanis, J. Chao, G. Rothschild, I. Tachibana, J. K. Chen, Ivanov, II, R. Rabadan, Y. Takeda and U. Basu (2015). "Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells." Cell Rep **13**(6): 1110-1117.
- Szklarczyk, D., A. L. Gable, D. Lyon, A. Junge, S. Wyder, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, N. T. Doncheva, J. H. Morris, P. Bork, L. J. Jensen and C. V. Mering (2019). "STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets." Nucleic Acids Res **47**(D1): D607-D613.
- Tran, D. Q., J. Andersson, R. Wang, H. Ramsey, D. Unutmaz and E. M. Shevach (2009). "GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13445-13450.

- Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D. R. Kelley, H. Pimentel, S. L. Salzberg, J. L. Rinn and L. Pachter (2012). "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks." Nat Protoc **7**(3): 562-578.
- Trombetta, J. J., D. Gennert, D. Lu, R. Satija, A. K. Shalek and A. Regev (2014). "Preparation of Single-Cell RNA-Seq Libraries for Next Generation Sequencing." Curr Protoc Mol Biol **107**: 4 22 21-17.
- van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Sollner, D. G. Akdis, B. Ruckert, C. A. Akdis and M. Akdis (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." J Allergy Clin Immunol **131**(4): 1204-1212.
- Walsh, C. J., P. Hu, J. Batt and C. C. Santos (2015). "Microarray Meta-Analysis and Cross-Platform Normalization: Integrative Genomics for Robust Biomarker Discovery." Microarrays (Basel) **4**(3): 389-406.
- Wang, H., D. M. Shin, S. Abbasi, S. Jain, A. L. Kovalchuk, N. Beaty, S. Chen, I. Gonzalez-Garcia and H. C. Morse, 3rd (2012). "Expression of plasma cell alloantigen 1 defines layered development of B-1a B-cell subsets with distinct innate-like functions." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(49): 20077-20082.
- Wasik, M., K. Nazimek and K. Bryniarski (2018). "Regulatory B cell phenotype and mechanism of action: the impact of stimulating conditions." Microbiol Immunol **62**(8): 485-496.
- Willer, C. J., Y. Li and G. R. Abecasis (2010). "METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans." Bioinformatics **26**(17): 2190-2191.
- Yang, G., X. R. Geng, J. P. Song, Y. Wu, H. Yan, Z. Zhan, L. Yang, W. He, Z. Q. Liu, S. Qiu, Z. Liu and P. C. Yang (2014). "Insulin-like growth factor 2 enhances regulatory T-cell functions and suppresses food allergy in an experimental model." J Allergy Clin Immunol **133**(6): 1702-1708.
- Yoon, J., H. Wang, Y. C. Kim, M. Yoshimoto, S. Abbasi and H. C. Morse Iii (2016). "Plasma cell alloantigen ENPP1 is expressed by a subset of human B cells with potential regulatory functions." Immunol Cell Biol **94**(8): 719-728.
- Yu, G., L. G. Wang, Y. Han and Q. Y. He (2012). "clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters." OMICS **16**(5): 284-287.
- Zhao, S., Y. Guo, Q. Sheng and Y. Shyr (2014). Heatmap3: An improved heatmap package with more powerful and convenient features.

Figures

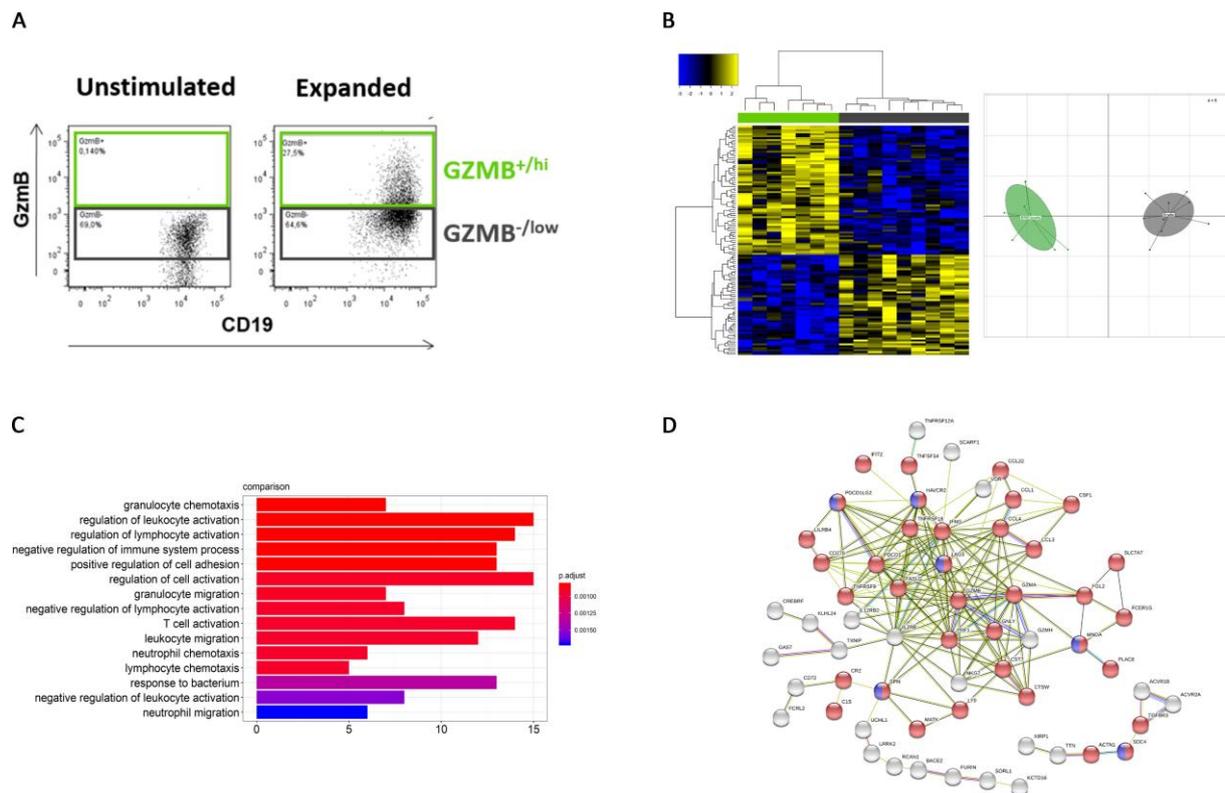


Figure 1: Gzmb^{+/hi} Breg RNAseq analysis

(A) Gating strategy of sorting expanded GZMB^{+/hi} Breg and GZMB^{-/low} B cells. (B) 119 genes are differentially expressed between expanded GZMB^{+/hi} Bregs (Green, n=7) and GZMB^{-/low} B cells (Black, n=9). Data were generated from 2 independent experiments. Heatmaps (left panels) represent the differentially expressed genes (upregulated in yellow and downregulated in blue) with a two-way hierarchical clustering. Principal component analysis (PCA, right panels) of GZMB^{+/hi} Bregs and GZMB^{-/low} B cells. (C) Enrichment of biological processes among the GZMB^{+/hi} signature using the clusterProfiler R package. (D) Protein interactions using STRING for the GZMB^{+/hi} signature displaying 1 nodes of gene related to “immune system process” (GO: 0002376, in red) and to “negative regulation of lymphocyte activation” (GO 0051250, in blue).

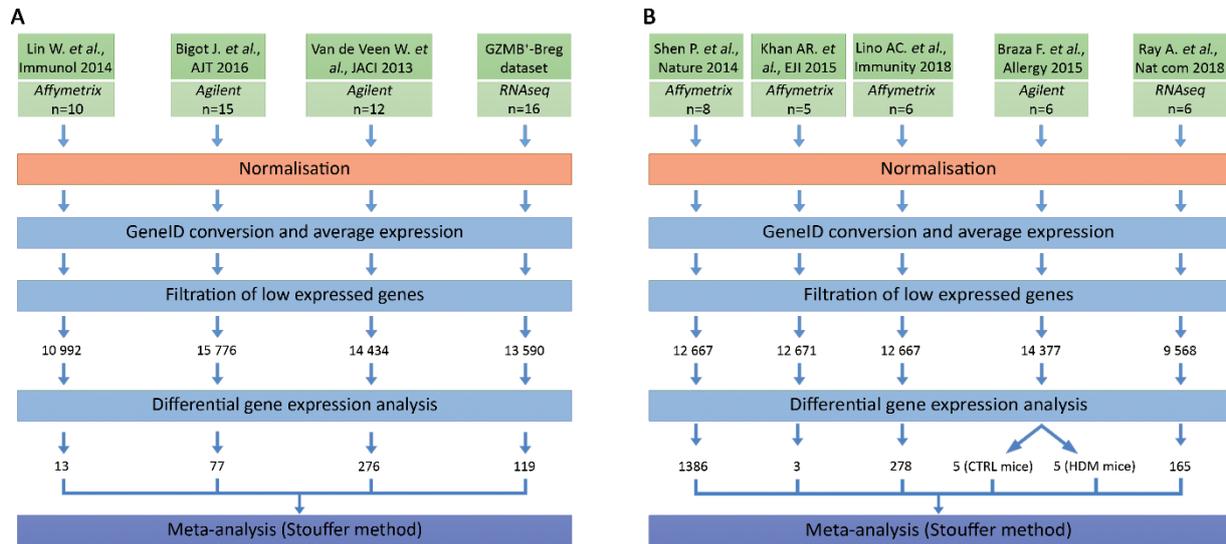


Figure 2: Transcriptomic data processing workflow

Homogeneous processing of transcriptomic data (A) in humans and (B) in mice with number of final expressed genes obtained after normalization/filtration and number of differentially expressed genes between Bregs and non-Bregs, obtained in each study and used within meta-analysis. For more information, see Table 1.

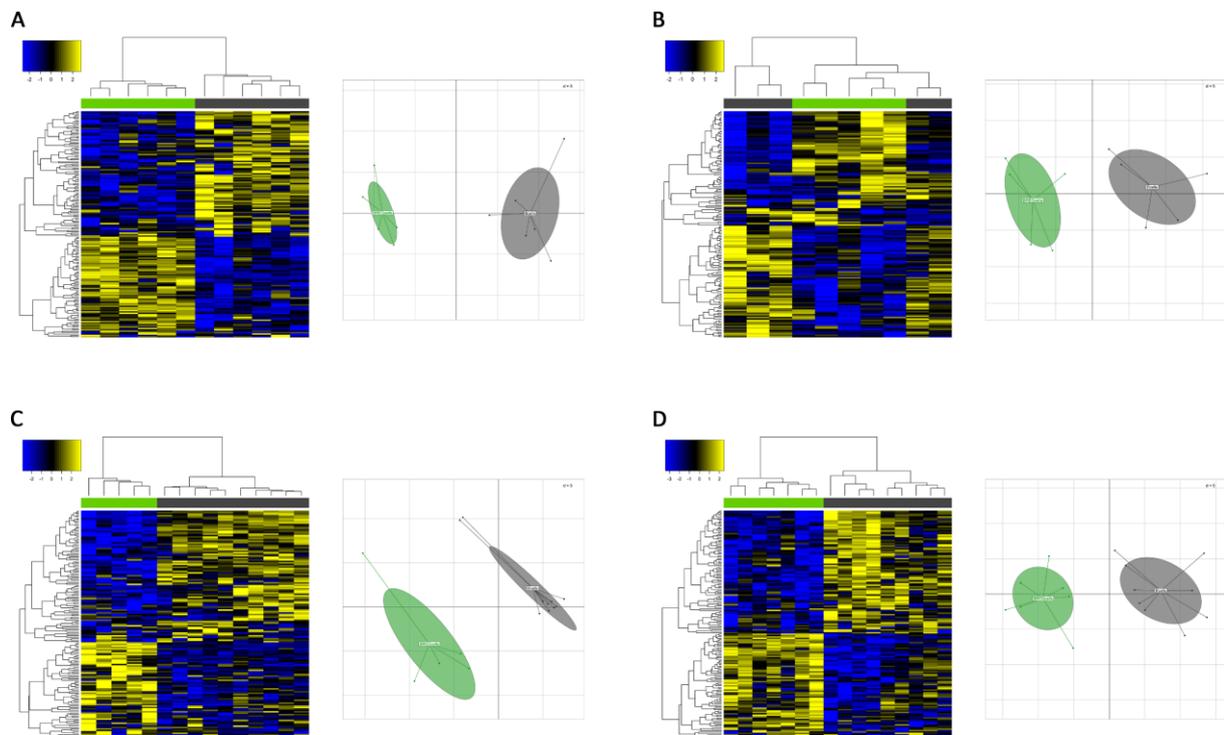


Figure 3: Human Breg signature composed of 165 differentially expressed genes

165 genes are differentially expressed between Bregs (green) and non-Bregs (Black). Genes from the meta-analysis (Stouffer's method) are considered significant with a Bonferroni corrected p-value <5%, a Z-score >3 and with the same differential expression direction across all the studies. Heatmaps (left panels) represent the differentially expressed genes (upregulated in yellow and downregulated in blue) with a two-way hierarchical clustering. PCA (right panels) of Bregs and non-Bregs. In (A) Van de Veen *et al.* dataset (164 genes, n=6 Bregs vs 6 non-Bregs), (B) Lin *et al.* dataset (154 genes, n=5 Bregs vs 5 non-Bregs), (C) Bigot *et al.* dataset (158 genes, n=5 Bregs vs 10 non-Bregs) and (D) GZMB⁺-Breg dataset (163 genes, n=7 Bregs vs 9 non-Bregs). Data were retrieved from published dataset as detailed in Method section.

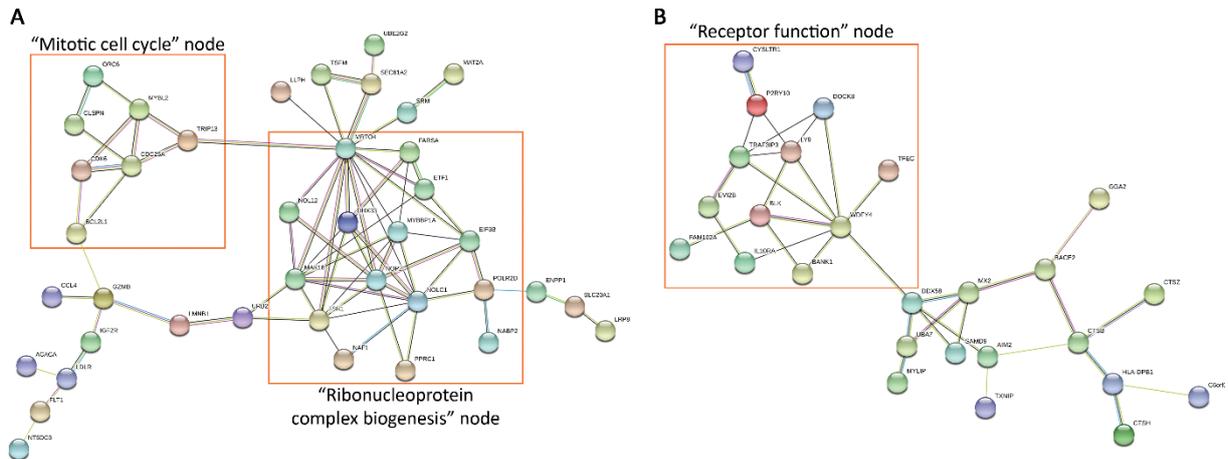


Figure 4: Gene network displaying interactions among the 165 human Breg gene signature

Protein interactions using STRING for (A) up-regulated genes displaying 2 nodes of gene related to « mitotic cell cycle » and « Ribonucleoprotein complex biogenesis » and (B) Down-regulated genes showing a node of genes with receptor functions.

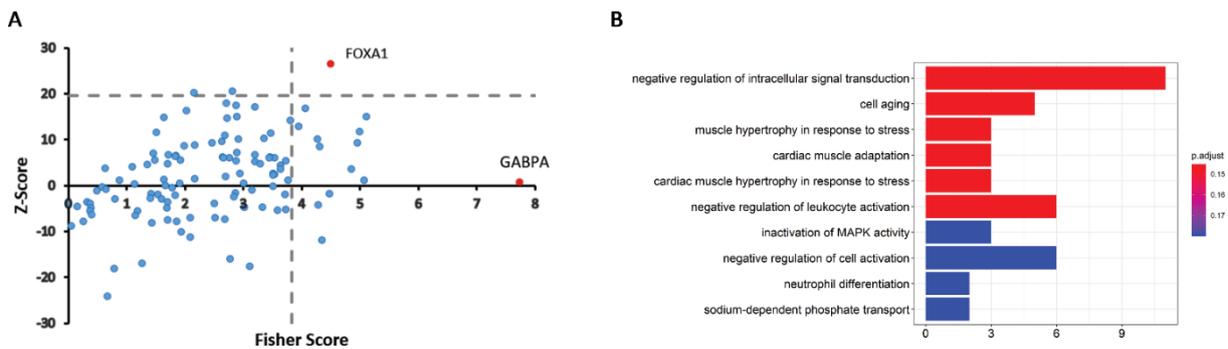


Figure 5: Enrichment of transcription factor binding sites

(A) Enrichment of transcription factor binding sites among the 165 Breg gene signature using the oPOSSUM software. Z-scores and Fisher scores are plotted with their respective threshold indicated with grey line. (B) Enrichment of biological processes among the *FOXA1* regulated target genes using the *clusterProfiler* R package.

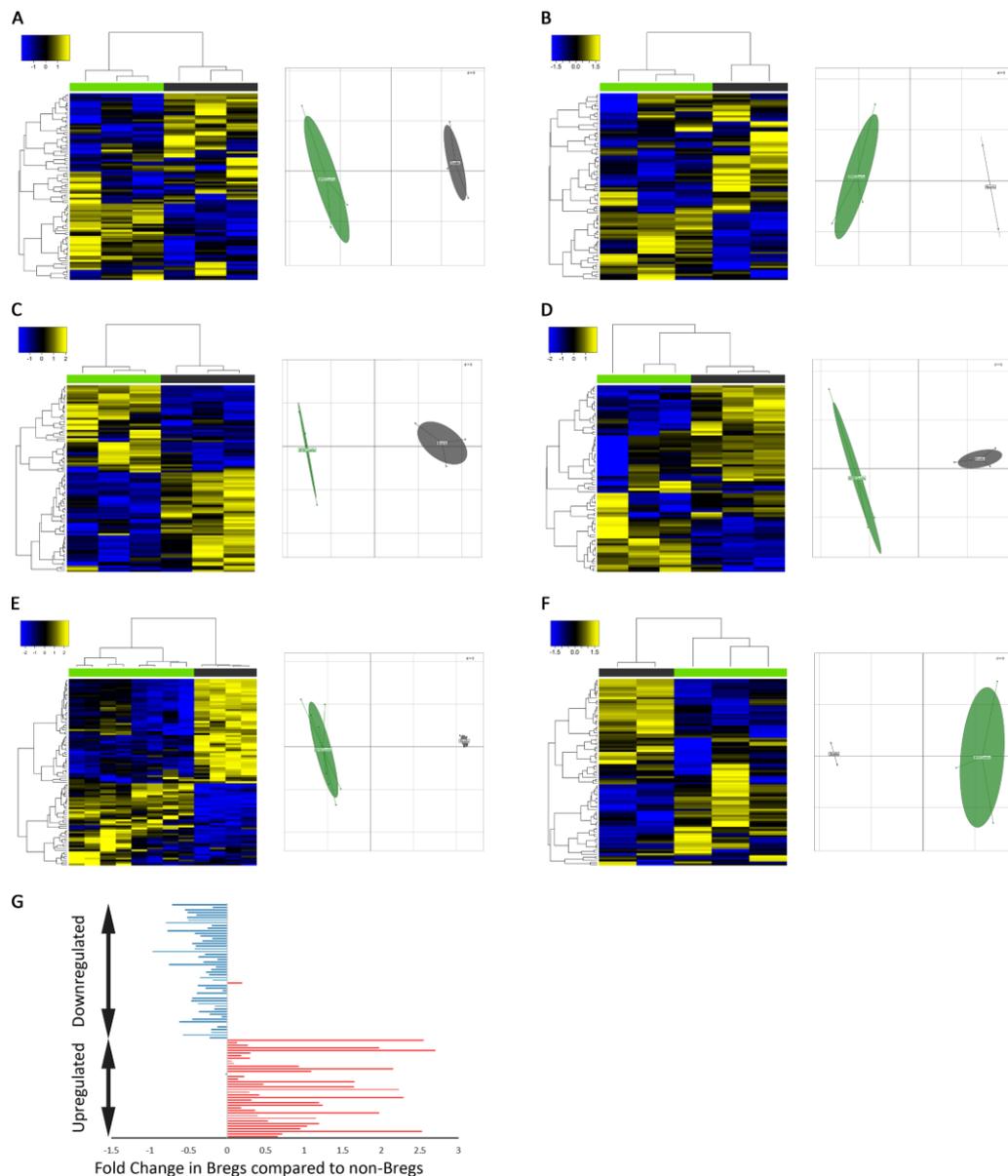


Figure 6: Mouse Breg signature composed of 93 differentially expressed genes

93 genes are differentially expressed between Bregs (green) and non-Bregs (Black). Genes from the meta-analysis (Stouffer's method) are considered significant with a Bonferroni corrected p-value <5%, a Z-score >3 and with the same differential expression direction across all the studies. Heatmaps (left panels) represent the differentially expressed genes with a two-way hierarchical clustering. Principal component analysis (PCA, right panels) of Bregs and non-Bregs. In (A) Braza *et al.* dataset WT mice (93 gene, n=3 Bregs vs 3 non-Bregs). (B) Braza *et al.* dataset HDM mice (93 genes, n=3 Bregs vs 3 non-Bregs). (C) Lino *et al.* dataset (92 gene, n=3 Bregs vs 3 non-Bregs). (D) Ray *et al.* dataset (78 genes, n=3 Bregs vs 3 non-Bregs). (E) Shen *et al.* dataset (93 genes, n=4 Bregs vs 4 non-Bregs). (F) Khan *et al.* dataset (92 genes, n=3 Bregs

vs 2 non-Bregs). (G) Representation of the Breg signature in Klinker *et al.*'s study (90 genes, n=1 Bregs vs 1 non-Bregs). Barplot represents Fold change between Bregs and non-Bregs in Klinker *et al.*'s study and genes were ordered by the Z-score of the meta-analysis. Data were retrieved from published dataset as detailed in Method section.

| Organism | Reference | GEO/ArrayExpress N° | Breg population | Non-Breg population | Cell processing | Platform |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|---|---|-------------------------|
| Human | Van de Veen W. et al., JACI 2013 | GSE35002 | CD19 ⁺ IL-10 ⁺ (n=6) | CD19 ⁺ IL-10 ⁻ (n=6) | Stimulation CpG (72H) | Microarray (Agilent) |
| | Lin W. et al., Immunol 2014 | GSE50895 | CD19 ⁺ IL-10 ⁺ (n=5) | CD19 ⁺ IL-10 ⁻ (n=5) | Stimulation CpG +BCR (48H) | Microarray (Affymetrix) |
| | Bigot J. et al., AJT 2016 | GSE76272 | Breg CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD38 ^{hi} (n=5) | CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁻ (n=5) and CD19 ⁺ CD24 ^{int} CD38 ^{int} (n=5) | Unstimulated | Microarray (Agilent) |
| | GZMB ⁺ -Breg dataset | GSE125901 | CD19 ⁺ Gzmb ^{+/hi} (n=7) | CD19 ⁺ Gzmb ^{+/low} (n=9) | BCR + TLR + Cytokines stimulation (72H) | RNAseq (Illumina) |
| Mouse | Shen P. et al., Nature 2014 | GSE35998 | Bregs ex-vivo stimulation (n=4) | Naive B cells (n=4) | Sorted from splenic B cells stimulated (Bregs) or not (Non-Breg) with LPS and aCD40 during 24H | Microarray (Affymetrix) |
| | Khan AR. et al., Eur. J. Immunol 2015 | E-MTAB-2100 | CD19 ⁺ CD1d ^{hi} from s.mansoni infected mice (n=3) | CD19 ⁺ from not infected mice (n=2) | Sorted from splenic B cells | Microarray (Affymetrix) |
| | Braza F. et al., Allergy 2015 | GSE57772 | CD19 ⁺ IL-10 ⁺ in WT mice (n=3) and in HDM mice (n=3) | CD19 ⁺ IL-10 ⁻ in WT mice (n=3) and in HDM mice (n=3) | Sorted from splenic B cells stimulated with aCD40 during 48H, LPS, PMA, ionomycin and monensin was added during the last 5H | Microarray (Agilent) |
| | Lino AC. et al., Immunity 2018 | GSE103458 | CD138 ^{hi} IL10 ⁺ (n=3) | CD138 ^{hi} IL10 ⁻ (n=3) | Sorted from splenic B cells 24H after challenge with Salmonella typhimurium | Microarray (Affymetrix) |
| | Ray A. et al., Nat com 2018 | GSE111911 | Follicular B220 ⁺ IgM ^{int} CD21 ^{int} CD23+CD93-IgDlow/- (n=3) | Follicular B220 ⁺ IgM ^{int} CD21 ^{int} CD23+CD93-IgDhi (n=3) | Sorted from splenic B cells | RNAseq |
| | Sun J. et al., 2015* | GSE63426 | CD19 ⁺ CD1d ^{hi} CD5 ⁺ IL-10 ⁺ (n=2) | CD19 ⁺ CD1d ⁻ CD5 ⁺ IL-10 ⁻ (n=2) | Sorted from splenic B cells stimulated with aCD40 during 48H. LPS, PMA, and ionomycin were added during the last 5H | RNAseq |
| Klinker MW et al., Plos One 2013* | GSE46245 | CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ^{hi} (n=1) | CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD1d ^{hi} (n=1) | Sorted from splenic B cells | Microarray (Affymetrix) | |

Table 1: Transcriptomic datasets on Breg and non-Breg populations

A) in humans and B) in mice. *:Studies excluded from the meta-analysis

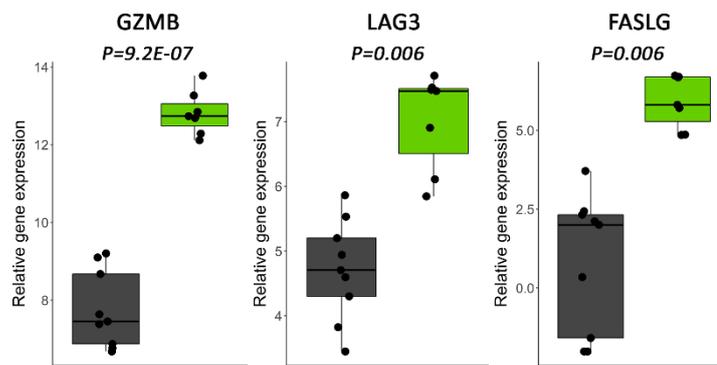


Figure S1: Immunomodulatory genes differentially expressed between GZMB^{+hi} and

GZMB^{-low} B cells

Gene expression of GZMB, LAG3 and FASLG between GZMB^{+hi} Bregs (green, n=7) and GZMB^{-low} B cells (black, n=9) in the GZMB⁺-Breg dataset. Adjusted p-value, whiskers boxes with first and third quartiles and median are displayed.

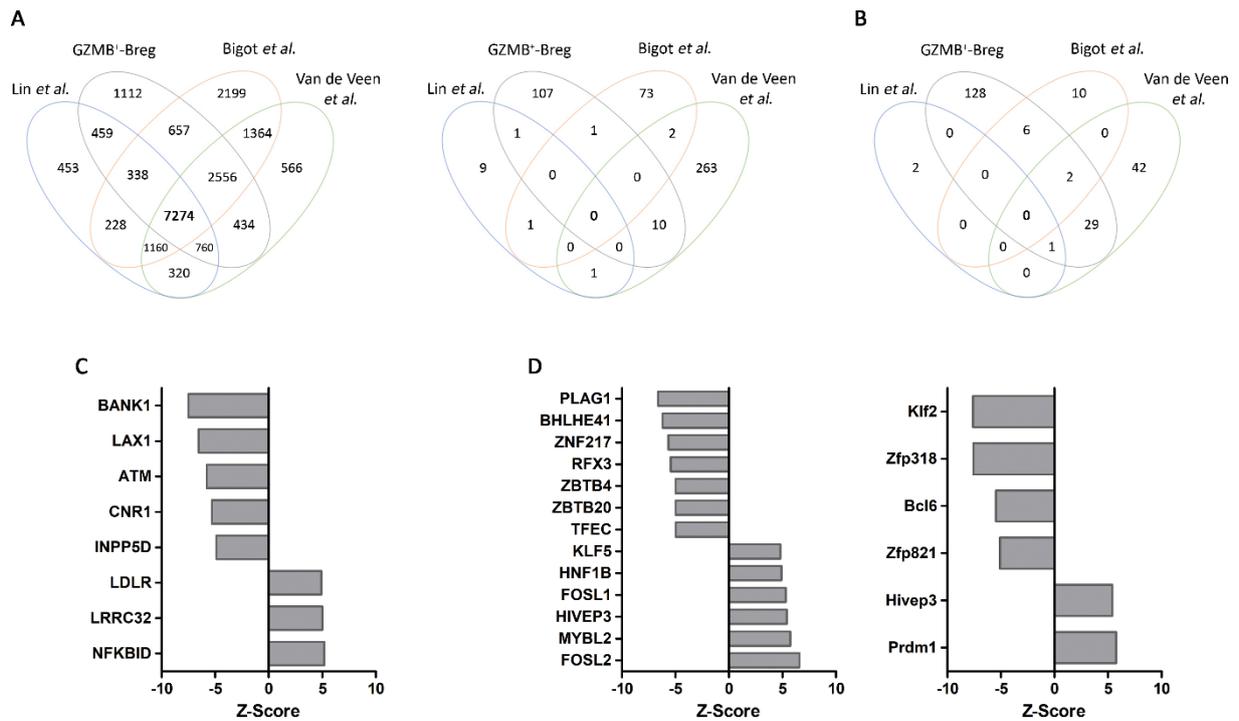


Figure S2: Common gene and enriched GO term in human studies and human and mouse transcription factors

(A) Venn’s diagrams of the human Breg differentially expressed genes (left panel) and every expressed genes (right panel) in each human transcriptomic study. (B) Venn’s diagram of the enriched GO terms in each study (FDR<20%). Right panel from left to right: Lin *et al.*, GZMB⁺-Breg, Bigot *et al.* and Van de Veen *et al.* Datasets. (C) Barplot of the 8 differentially expressed genes represented in the enriched « negative regulation of leukocyte activation » GO term (GO:0002695; FDR=19.5%). (D) Barplot of the differentially expressed transcription factors in humans (left panel) and in mice studies (right panel), Z-score are plotted.

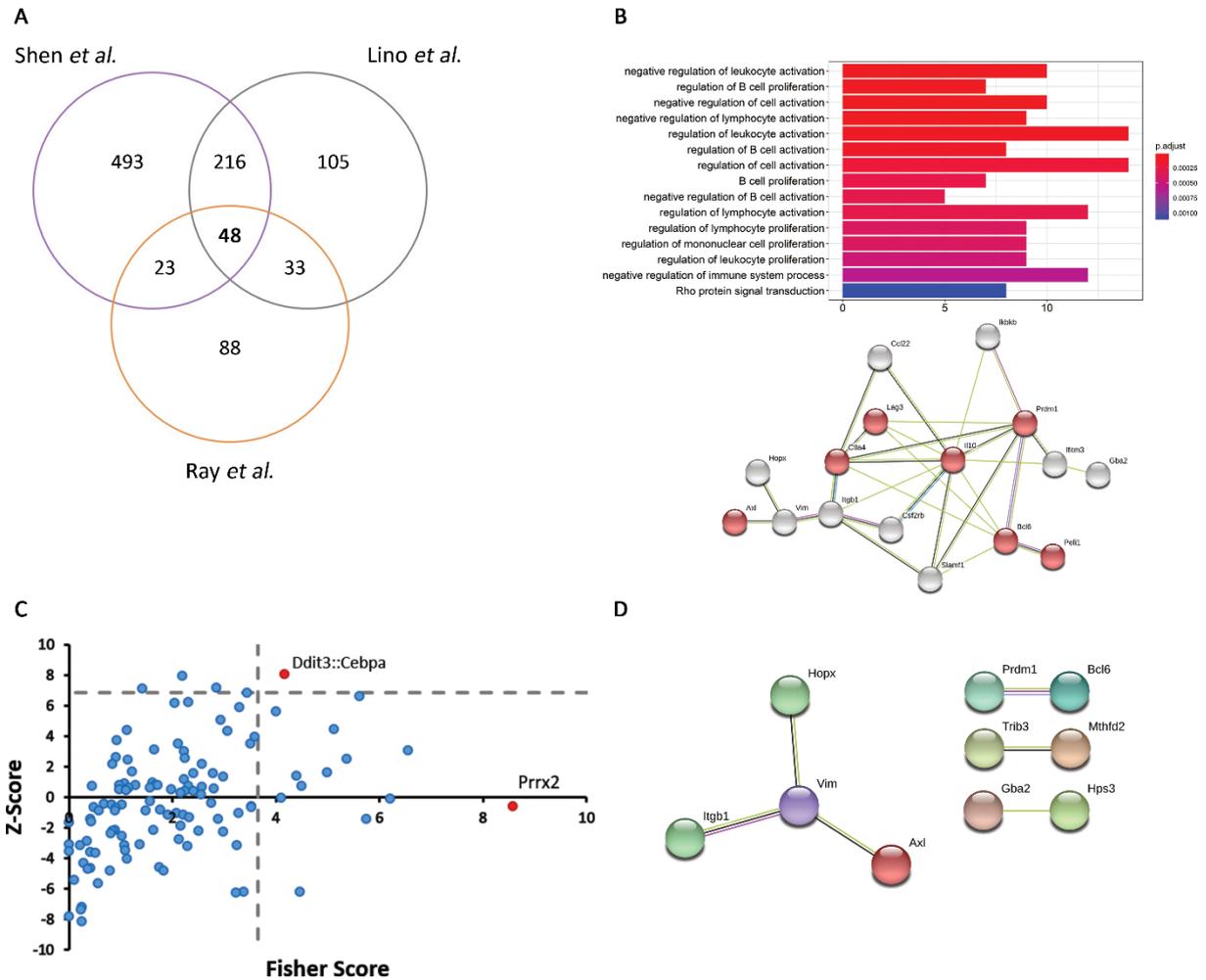


Figure S3: Enrichment analysis and common Breg signature between humans and mice

(A) Venn’s diagrams of the enriched GO in Shen *et al.*, Lino *et al.*, and Ray *et al.* studies (FDR<20%). (B) Enrichment of biologic process (Upper panel) among the 93 differentially expressed genes in mouse Bregs and their predicted protein interaction (Lower panel) using STRING. (C) Enrichment of transcription factors binding sites among the 93 mouse Breg signature using oPOSSUM software. Z-score and Fisher score are plotted with their threshold indicated with grey line. (D) Protein interaction using STRING of the Ddit3::Cebpa related target genes.

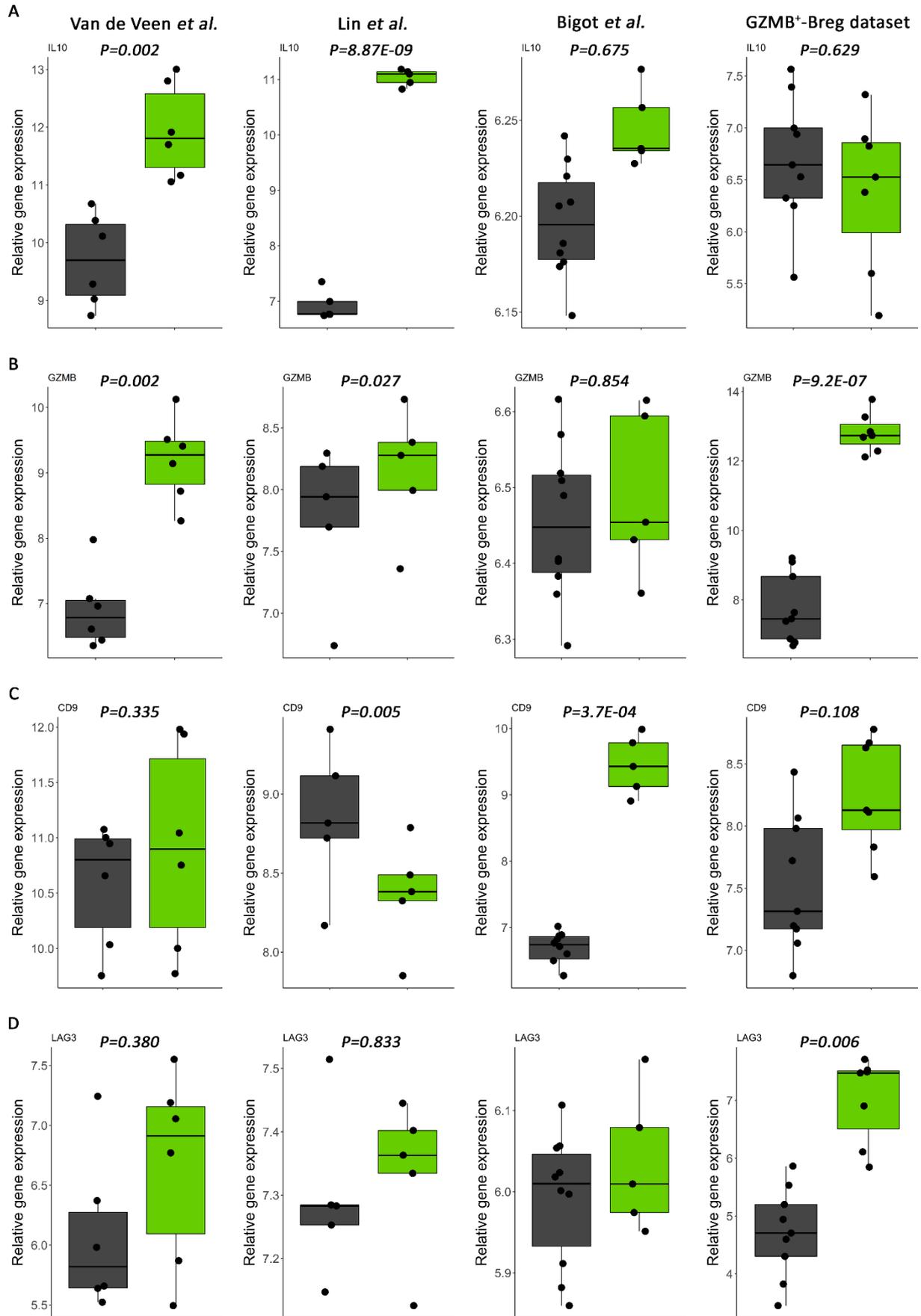


Figure S4: Immunomodulatory genes expression between GZMB^{+hi} and GZMB^{-low} B**cells in human datasets**

Gene expression of (A) IL-10, (B) GZMB, (C) CD9, and (D)LAG3 between GZMB^{+hi} Bregs (green) and GZMB^{-low} B cells (black) in the 4 human datasets. From left to right: Van de Veen *et al.* dataset (n=6 Bregs vs 6 non-Bregs), Lin *et al.* dataset (n=5 Bregs vs 5 non-Bregs), Bigot *et al.* dataset (n=5 Bregs vs 10 non-Bregs) and GZMB⁺-Breg dataset (n=7 Bregs vs 9 non-Bregs). Adjusted p-value, whiskers boxes with first and third quartiles and median are displayed.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Génération de Bregs GZMB⁺ à partir de cellules souches pluripotentes induites

Les lymphocytes B occupent une place particulière dans le système immunitaire. Ils produisent des anticorps lors de la réponse humorale et ils ont un rôle de présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les lymphocytes B possèdent également une fonction de régulation de la réponse immunitaire leur conférant ainsi la double casquette effecteur/régulateur du système immunitaire. Les Bregs sont impliqués dans la prévention des maladies auto-immunes et des allergies. A l'inverse, lors d'infections et de développement de cancer, ils participent à l'échappement du système immunitaire des agents infectieux et des cellules tumorales. Les lymphocytes B ont donc un intérêt tout particulier en thérapie cellulaire, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la génération de lymphocytes B et plus particulièrement de Bregs GZMB⁺ à partir d'hIPSC. En effet, l'utilisation des hIPSC apporte une ressource presque illimitée en cellules, le choix des cellules d'origines ainsi que la possibilité de modifier leur expression génétique afin de générer des lymphocytes B aux propriétés régulatrices et au potentiel d'utilisation en clinique. De plus, des banques d'hIPSC peuvent être réalisées pour une application à large échelle des thérapies cellulaires (de Rham and Villard, 2014). En effet, la transplantation de cellules dérivées d'hIPSC est contrainte à la compatibilité entre le donneur et le receveur pour éviter leur rejet par le système immunitaire de l'hôte. La transfection autologue présenterait une solution, cependant elle reste trop onéreuse à grande échelle. De plus, en cas de thérapie d'une maladie génétique, la correction du défaut génétique est nécessaire au sein des hIPSC avant transplantation et les hIPSC mal caractérisées pourraient exprimer un antigène du non-soi les rendant immunogènes (de Rham and Villard, 2011). Pour remédier à ce problème, la création de banques d'hIPSC très bien caractérisées, à l'instar des banques de cellules du sang de cordon, pourrait être réalisée. Plusieurs études ont montré la faisabilité de telles banques d'hIPSC et qu'avec un nombre raisonnable de lignées d'hIPSC homologues pour le HLA, il est possible de couvrir une grande proportion de receveurs. Gourraud *et al.* ont notamment montré que 20 lignées d'hIPSC possédant les haplotypes les plus fréquents, seraient capables de couvrir plus de la moitié de la population européenne étudiée (Gourraud et al., 2012).

Pour différencier des cellules hPSC en lymphocytes B il est nécessaire de les orienter vers la lignée hématopoïétique et plus particulièrement vers les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les progéniteurs hématopoïétiques. French *et al.* sont parvenus à générer des lymphocytes B à partir d'hPSC. Dans leur protocole, ils ont réalisé une première étape de différenciation des hPSC en progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ sur un tapis de cellules stromales OP9 pendant 10 jours et sans cytokine. Après isolation et différenciation pendant 21 jours sur un tapis de cellules stromales MS-5 en présence de cytokines, ces cellules CD34⁺ génèrent 5% de lymphocytes B. Nous avons utilisé ce protocole à partir d'hPSC et d'hESC qui sont plus faciles à manipuler et apportent l'équivalence d'un réplicat biologique (Choi et al., 2015; Mallon et al., 2014). Nos résultats montrent la génération de progéniteurs CD34⁺ sur cellules OP9 mais ces progéniteurs ne permettent pas une différenciation de plus de 0,2% de lymphocytes B sur MS-5. Le CD43 est le premier marqueur de la différenciation hématopoïétique (Vodyanik et al., 2006) et french *et al.* ont montré que son expression par les progéniteurs CD34⁺ est cruciale pour la différenciation en lymphocytes B. Or, les CD34⁺ que nous obtenons après différenciation n'expriment pas le CD43, témoignant ainsi d'une faible efficacité de cette étape de différenciation. Il existe une autre méthode permettant la différenciation des hPSC en cellules hématopoïétiques CD34⁺, qui consiste à la formation de corps embryonnaires et à leur différenciation en présence de cytokines mais sans feeder (Chadwick et al., 2003; Chicha et al., 2011; Kennedy et al., 2007). Nous nous sommes appuyés sur ces études et avons utilisé différentes conditions de concentration et composition de ces cytokines dans le modèle de différenciation sur cellules OP9 afin d'améliorer la génération de cellules CD34⁺CD43⁺. Nos résultats montrent que l'ajout des cytokines SCF, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et Flt3L durant les jours 1 à 10 de différenciation CD34⁺ et accompagnées d'IL-3 durant les jours 4 à 10, améliore la génération de cellules CD34⁺CD43⁺. De plus, contrairement à nos attentes, la condition sans BMP4 est la plus optimale. Le BMP4 est connu pour induire la différenciation des hPSC en mésoderme, endoderme et trophoblaste (Roberts et al., 2018; Teo et al., 2012; Zhang et al., 2018). Le BMP4 est également impliqué dans la formation de l'hémangioblaste et de la génération des progéniteurs hématopoïétiques (Chicha et al., 2011; Kardel and Eaves, 2012; Kennedy et al., 2007). Ainsi, bien que le BMP4 soit impliqué dans la différenciation hématopoïétique et nécessaire *in vitro* en condition feeder-free, nos résultats ne montrent pas de synergie de son effet avec celui apporté par les cellules stromales OP9.

Nos résultats suggèrent que l'expression du marqueur CD43 n'est pas suffisante pour identifier des progéniteurs capables de se différencier en lymphocytes B sur MS-5. En effet, malgré une meilleure proportion de CD34⁺CD43⁺, leur différenciation en lymphocytes B pendant 21 jours sur MS-5 ne permet pas de générer plus de 0,7% de lymphocytes B. Étant donné que les cellules CD34⁺ de sang de cordon (UCB-CD34⁺) se différencient très efficacement en lymphocytes B dans les mêmes conditions sur MS-5, nous les avons comparées avec les cellules CD34⁺ différenciées à partir d'hPSC. Les cellules UCB-CD34⁺ sont toutes CD43⁺, et elles expriment le marqueur endothélial CD31 et le marqueur hématopoïétique CD45 à un niveau intermédiaire, tandis que les CD34⁺ dérivées d'hPSC sont majoritairement CD31^{hi} et CD45⁻. L'expression du CD45 étant plus tardive que celle du CD43 dans la différenciation hématopoïétique, cela suggère que les cellules UCB-CD34⁺ sont à un stade de différenciation plus avancé. De plus, les cellules CD31^{hi}CD45^{int} apparaissent au jour 8 de différenciation à partir d'hPSC et leur proportion augmente aux jours 10 et 12, ce qui suggère que les cellules sont d'abord CD31^{hi} puis elles perdent leur expression du CD31. Cependant, bien que la proportion de CD31^{int}CD45^{int} soit plus élevée à 12 jours de différenciation en CD34⁺, ces progéniteurs ne permettent pas une meilleure différenciation en lymphocytes B comparés aux progéniteurs à 10 jours de différenciation. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules CD31^{int}CD45^{int} ne représentent pas la majorité des cellules CD45⁺. En effet, dans l'une de nos expériences ces progéniteurs CD31^{int}CD45^{int} représentent la majorité des CD45⁺ et permettent la meilleure différenciation avec 0,7% de lymphocytes B au jour 21 (J21) sur MS-5.

Nous avons suivi les différents stades de différenciation des lymphocytes B durant les 21 jours de différenciation sur MS-5. À J21 sur MS-5, on obtient une faible expression par les cellules totales différenciées à partir de cellules CD34⁺-UCB ou CD34⁺ dérivées d'hESC, des gènes *PAX5*, *EBF1* et *IL-7RA* qui sont responsables de l'engagement dans la lymphopoïèse B. On observe également une expression d'*IGLL1* et de *VPREB1* associée à une augmentation de l'expression de *RAG1* de J7 à J21 de différenciation sur MS-5. Ces gènes, sous le contrôle de *PAX5*, témoignent de l'expression de la chaîne légère substitutive, de l'initiation des mécanismes de recombinaison des chaînes lourdes des Ig et donc, de la mise en place du Pré-BCR. Les expressions à J21 d'*IGLL1*, *VPREB1* et *RAG1* sont 10 à 100 fois plus élevées dans les cellules différenciées à partir de CD34⁺-UCB que dans les cellules différenciées à partir de

CD34⁺ dérivées d'hESC. Ces résultats soulignent encore la plus grande efficacité de différenciation en lymphocytes B des cellules CD34⁺-UCB mais également que la différenciation à partir d'hPSC concorde avec un profil de différenciation en lymphocytes B au stade précoce. De plus, au cours de la différenciation en lymphocytes B de J7 à J21 à partir de CD34⁺ dérivées d'hESC, la proportion de progéniteurs CLP parmi les CD45⁺CD10⁺ diminue de 99% à 78%, tandis que celle des progéniteurs CD79⁺CD19⁻ Pré-pro B augmente de 0 à 11% et celle de la fraction CD79⁺CD19⁺ Pro-B et Pré-B augmente de 0 à 9%. Contrairement aux résultats de French *et al.*, le tri des cellules CD45⁺ différenciées sur MS-5 à J21 et leur mise en culture sur MS-5 à nouveau pendant 21 jours sans cytokines, ne permettent pas d'obtenir de lymphocytes B immatures CD19⁺IgM⁺. Ainsi, bien que certains progéniteurs expriment les gènes nécessaires à l'engagement en lymphocytes B et à la production d'un pré-BCR, nos résultats montrent une différenciation qui s'arrête aux stades Pro-B et Pré-B.

Pourquoi obtenons-nous une proportion de lymphocytes B si différente de celle de French *et al.* ? Etant donné que les cellules CD34⁺-UCB permettent une grande production de lymphocytes B dans les mêmes conditions de culture, cette faible différenciation en lymphocytes B est due à la faible efficacité de différenciation des progéniteurs CD34⁺ générés à partir de hPSC sur OP9. Une des difficultés des protocoles de différenciation est leur reproductibilité. Dans leur protocole, French *et al.* analysent la différenciation en lymphocytes B d'une lignée cellulaire hPSC seulement. Cependant, leur groupe ne parvient pas à générer des lymphocytes B à J21 à partir de hESC H1 (Carpenter *et al.*, 2011), tandis que Vodyanick *et al.*, l'équipe dont French *et al.* ont obtenu les cellules OP9, y parviennent à partir d'hESC H1 et H9 en utilisant le même protocole (Vodyanik *et al.*, 2005). De plus, Larbi *et al.* décrivent la génération de lymphocytes B à partir d'hESC H1 avec un protocole en 3 étapes dans lequel ils génèrent des progéniteurs hématopoïétiques via la formation de corps embryonnaires, qu'ils différencient ensuite en lymphocytes B après deux étapes de culture successives sur MS-5 (Larbi *et al.*, 2014). Ces résultats, et le fait que la lignée hPSC que nous utilisons soit également dérivée de fibroblastes (Gaignerie *et al.*, 2018), montrent la difficulté à obtenir des résultats reproductibles dans la différenciation hématopoïétique *in vitro*. Ces écarts de reproductibilité sont dus aux multiples variables des protocoles parmi lesquelles, l'activité protéique des enzymes, la qualité des cellules stromales, la densité des tapis de cellules stromales et surtout les hPSC utilisées, impactent le plus la variabilité. Ainsi, les temps de différenciation pour

chaque étape du protocole peuvent varier selon les expérimentations et c'est pourquoi il est important d'identifier quel type cellulaire est attendu à chaque étape de différenciation. Une autre variabilité intrinsèque aux hPSC qui doit être prise en compte est qu'elles peuvent garder une mémoire épigénétique du tissu d'origine dont elles sont dérivées, ce qui peut amener à un défaut de différenciation vers certains types cellulaires (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010). Pour contourner cet inconvénient, différentes lignées d'hPSC pourront être utilisées, notamment des hPSC dérivées de lymphocytes B (Bueno et al., 2016) qui pourraient se différencier en lymphocytes B avec plus d'efficacité que celles dérivées de fibroblastes. Néanmoins, les lignées hPSC dérivées de lymphocytes B possèdent un réarrangement monoclonal et complet de leur segments V(D)J des chaînes des immunoglobulines. Leur différenciation conduira donc à la génération de lymphocytes B monoclonaux aux BCR complets. Nous utiliserons également différentes cellules stromales OP9 et hPSC pour optimiser la différenciation en CD34⁺.

L'étape de différenciation en progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ est donc une étape clé qui nécessitera de nouvelles études et amélioration car elle conditionne les résultats de la différenciation sur MS-5. Lorsque nous obtiendrons des progéniteurs permettant de générer plus de lymphocytes B, nous pourrons optimiser les conditions de différenciation sur MS-5 et analyser par PCR l'état d'avancement de recombinaison des Ig. Il est avant tout crucial d'identifier quels sont les progéniteurs et à quel temps de différenciation en CD34⁺ ils doivent être isolés pour poursuivre la différenciation sur MS-5. Cette problématique de génération d'HSC et leur identification représente un enjeu actuel tant pour les thérapies par greffe de cellules souches que pour l'étude et l'optimisation de la différenciation hématopoïétique *in vitro*.

Une fonction régulatrice sera apportée à ces lymphocytes B générés à partir de hPSC par l'induction de l'expression du GZMB et sera réalisée par CRISPR/Cas9. Nos résultats de coupure de l'Ex2GZMB avec le sgRNA82-B dans les HEK293T sont très satisfaisants et assurent une forte efficacité de coupure. Si le plasmide est transfecté avec la même efficacité que le plasmide contrôle pGK-GFP, nous obtiendrons des hPSC KO *GZMB*. Cependant, cette efficacité risque d'être plus faible étant donné la taille plus élevée du plasmide CRISPR/Cas9 comparé au plasmide contrôle. Après validation de la coupure des hPSC par CRISPR/Cas9, la transfection du plasmide CRISPR/Cas9 accompagnée de l'oligonucléotide sera faite en grande

quantité afin de trier un grand nombre de cellules OFP⁺ qui auront le plasmide CRISPRCas9. Les cellules triées seront mises en culture sur plusieurs passages. Afin de sélectionner les cellules KO, plusieurs colonies seront récupérées et la moitié de chaque colonie sera mise en culture seule dans un puits, tandis que l'autre moitié de la colonie servira au screening du KO. L'ADNg sera amplifié par PCR et la moitié des produits PCR sera digéré par ECORI puis mise à migrer au Caliper, tandis que l'autre moitié sera envoyée à séquencer. Si la digestion par ECORI révèle des bandes de coupures, cela indiquera l'intégration de l'oligonucléotide au site de coupure, sur chaque allèle si présence de 2 bandes et sur 1 allèle si présence de 3 bandes. Si le séquençage confirme l'intégration attendue de l'oligonucléotide, la colonie correspondante sera amplifiée et banquée. Nous vérifierons également la capacité de différenciation en lymphocytes B des lignées hPSC KO *GZMB*. Les lignées KO *GZMB* seront ensuite transfectées par CRISPR/Cas9 pour permettre l'intégration dans le locus *AAVS1* de la cassette d'expression du *GZMB*. De la même manière, les cellules GFP⁺ auront intégré la cassette et seront triées puis mises en culture. Après plusieurs passages nous sélectionnerons par microscopie en fluorescence, les cellules GFP afin de les isoler et de vérifier, par séquençage, l'intégration attendue de la cassette d'expression. Les clones valides seront banqués et leurs caryotypes vérifiés.

Une fois les lymphocytes B *GZMB*⁺ générés, la deuxième partie du travail sera centrée sur l'étude fonctionnelle de ces cellules. Tout d'abord, nous validerons par cytométrie en flux leur expression du *GZMB* et l'absence de fuite d'expression du système Tet-off en présence de doxycycline. Leur pouvoir régulateur sera ensuite testé sur la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques et nous analyserons, *in vitro*, la fonction des lymphocytes B *GZMB*⁺ ainsi générés en présence et en absence de doxycycline. Leur rôle régulateur sera étudié *in vivo* dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) chez la souris humanisée NSG SGM3 transgénique qui exprime le SCF (Stem cell factor), le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et l'IL-3. Le modèle murin NSG SGM3 permet une reconstitution rapide des lymphocytes B, lymphocytes T et cellules myéloïdes après la greffe de cellules humaines CD34⁺ (Jangalwe et al., 2016). L'humanisation de ces souris par une injection de PBMC humaines aboutit à une GvHD médiée par les lymphocytes T humains, qui sont les seules cellules à survivre dans ce modèle. Lors d'expériences préliminaires, l'injection de Bregs *GZMB*⁺ expandus *in vitro* n'a pas permis le contrôle de la GvHD. Cependant, les lymphocytes

B injectés n'étaient pas retrouvés dans les souris receveuses, nous pensons donc qu'ils ne survivaient pas. Afin de fournir un environnement propice à leur survie, nous pensons injecter les Bregs dans des souris NSG SGM3 qui ont été humanisées par des cellules souches hématopoïétiques développant des lymphocytes B. Après la reconstitution du compartiment hématopoïétique humain 4 à 8 semaines après injection de CD34⁺-UCB d'un donneur A, une GvHD sera induite par injection des cellules du sang de cordon déplétées en CD34⁺ du même donneur. En effet, les lymphocytes T naïfs présents dans le sang de cordons ont été sélectionnés dans le thymus fœtal et induira une GvHD xénogénique. Dans ce modèle, des lymphocytes B GZMB⁺ générés à partir d'hpSC seront injectés lors de l'induction de la GvHD et certaines souris recevront des administrations de doxycycline pour stopper l'expression du GZMB par les cellules injectées (Cawthorne et al., 2007). Ainsi, nous étudierons le rôle de la production du GZMB par les lymphocytes B sur le développement de la GvHD.

Bien que ces cellules soient encore en développement, certaines questions seront à appréhender. Hormis la question centrale de savoir si ces lymphocytes B GZMB⁺ auront un effet régulateur, il sera intéressant d'étudier si l'expression d'un BCR complet est nécessaire ou si un stade Pro-B ou Pré-B de nos lymphocytes B GZMB⁺ serait suffisant pour permettre un effet régulateur. Le signal BCR est important pour la survie des lymphocytes B (Schweighoffer and Tybulewicz, 2018), son activation pourrait permettre une stimulation des cellules et ainsi les préparer avant leur transfert adoptif. De même, l'activation par le TLR augmente la survie des lymphocytes B (Buchta and Bishop, 2014), apportant une alternative en cas d'absence de BCR. En somme, comment se comporteront ces cellules après activation en présence des facteurs seuls ou en combinaison anti-BCR, anti-CD40, CpG ODN et IL-21 ? Garderont-elles leur propriété régulatrice ? pourront-elles s'activer et sécréter des cytokines ou se différencier ? L'utilisation du reporter GFP permettra un suivi des lymphocytes B GZMB⁺ après transfert chez la souris. Ce modèle permettra ainsi de connaître leur demi-vie *in vivo* et leur capacité de régulation et de différenciation en fonction des différentes conditions de stimulation avant transfert.

Méta-analyse transcriptomique des lymphocytes B régulateurs

Nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq des Bregs GZMB^{+/hi} (GEO accession number: GSE125901) que nous avons incluse dans une méta-analyse afin d'étendre le champ d'études transcriptomiques des Bregs humains car celui-ci était restreint aux Bregs IL-10⁺ et aux Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} (Bigot et al., 2016; Lin et al., 2014; van de Veen et al., 2013). L'avantage de cette approche, consistant à intégrer les informations des différents jeux de données, est d'augmenter la puissance et permettre d'identifier les gènes les plus pertinents dans leur expression différentielle entre Bregs et non-Bregs, contrairement au simple croisement des listes de gènes. De plus, notre approche bénéficie de l'intégration de jeux de données hétérogènes en termes de sous-types de Bregs dans le but de définir une signature commune des différents sous-types de Bregs déjà décrits.

Différents types d'analyses permettent l'intégration de plusieurs jeux de données transcriptomiques pour définir une liste de gènes d'intérêt. Une des méthodes est la « méga-analyse », qui consiste à incorporer les valeurs d'expression de chaque jeu de données en un jeu de données unique et de réaliser un test statistique sur l'ensemble du jeu de données pour identifier les différences d'expression entre les groupes (Walsh et al., 2015). L'inconvénient de cette approche est le potentiel apport de biais techniques/méthodologiques non désirés (effet batch) dus aux différentes études et notamment aux différentes plateformes de puces à ADN utilisées (Taminau et al., 2014; Walsh et al., 2015). De plus, avant d'être analysées, les valeurs d'expression de chaque jeu de données doivent être normalisées afin de corriger ces différents biais et/ou l'effet confondant des études doit être pris en compte dans le modèle statistique d'analyse. Les méthodes de normalisation par centrage médian ou la méthode Combat par exemple ont été utilisées dans plusieurs études. Cependant, il n'y a pas de consensus quant aux méthodes de préparation des jeux de données issus de différentes plateformes ni aux méthodes de normalisation à réaliser pour obtenir un « méga » jeu de données homogènes (Deshwar and Morris, 2014; Rudy and Valafar, 2011). Par ailleurs, ces normalisations sont susceptibles d'augmenter les biais et de faire perdre de l'information, notamment en retirant des variations biologiques intéressantes et en changeant les dimensions d'expression globale de chaque étude (Hicks and Irizarry, 2015). De plus, les sondes utilisées entre les différentes plateformes ne sont pas les mêmes. Elles ne se fixent donc pas aux mêmes endroits sur les ARN cibles et risquent d'apporter des différences

d'expression selon les épissages alternatifs. Enfin, les données transcriptomiques issues de puces à ADN présentent une distribution continue alors que les valeurs d'expressions des analyses RNAseq correspondent à des valeurs discrètes puisqu'elles correspondent à des comptages de fragments d'ADN (reads). La combinaison de ces données de natures différentes pose alors un autre problème méthodologique qui n'est pas encore réglé.

Une autre méthode est la méta-analyse qui consiste à traiter indépendamment chaque jeu de données en termes de normalisation et de test statistique, puis de combiner les P-values générées (Walsh et al., 2015). Nous avons choisi cette méthode car elle permet l'intégration des résultats de RNAseq avec des données de puces à ADN et génère potentiellement moins de biais techniques liés aux différentes études et aux processus de normalisation (Lin and Zeng, 2009). L'inconvénient de cette méthode est l'impossibilité de création d'un jeu de données commun et impose une visualisation des données dans chaque jeu indépendamment. Plusieurs méthodes ont été décrites concernant la combinaison des P-values. Etant donnée la variation du nombre d'échantillons entre les études, nous avons choisi la méthode de Stouffer qui est préférée dans ces conditions car elle attribue un poids aux P-values des différentes études selon leur nombre d'échantillons (Weighted méta-analysis) (Heard and Rubin-Delanchy, 2017). De plus, nous utilisons le logiciel METAL qui permet d'intégrer la direction de l'effet observé aux P-values. Ainsi, après des étapes de préparation rigoureuses en termes de normalisation et de correction des potentiels effets techniques pour chaque étude, notre méta-analyse par la méthode de Stouffer permet une sélection robuste des gènes exprimés de façon différentielle dans l'ensemble des Bregs par rapport aux non-Bregs.

Notre étude est possible grâce à la disponibilité de plusieurs études transcriptomiques portant sur différents sous-types de Bregs. La méta-analyse chez l'Homme inclue ainsi 4 datasets, dont deux portent sur les Bregs IL-10⁺ et les deux autres sur les Bregs CD24^{hi}CD38^{hi} et les Bregs GZMB⁺. Chez la souris, la méta-analyse regroupe les Bregs après stimulation par LPS et anti-CD40, les Bregs IL-10⁺, les Bregs CD138⁺IL-10⁺, les Bregs CD1d^{hi} et les Bregs folliculaires IgM^{int}CD21^{int}CD23⁺CD93⁻IgD^{low/-}. Bien que l'approche de la méta-analyse soit flexible, deux jeux de données de Bregs murins, Klinker *et al.*, et Sun *et al.*, ont dû être exclus car ils représentaient seulement un et deux échantillons respectivement, incompatibles avec la réalisation de tests statistiques (Klinker et al., 2013; Sun et al., 2015). Notre but étant

d'identifier une signature commune, nous avons utilisé des paramètres de sélection stringents pour écarter les faux positifs. Nous avons sélectionné les gènes en utilisant la correction de Bonferroni qui est conservatrice et avons exclu les gènes pour lesquels la direction de l'expression n'est pas la même pour toutes les études. C'est pourquoi chez l'Homme, des gènes tels que *IL10* et le *CD9* qui sont up-régulés dans 3 datasets sur 4 ne font pas partie de la signature Bregs. Bien que ce filtre de sélection soit stringent, il est nécessaire pour centrer les résultats sur des molécules communes aux Bregs. Une des limites de cette étude est l'hétérogénéité de la nature des cellules analysées. En effet, bien que cela permette une analyse des Bregs dans leur ensemble, la plupart des Bregs et des non Bregs sont isolés après activation *in vitro*, alors que seul le jeu de données provenant de Bigot *et al.* concerne des Bregs transitionnels *ex vivo*. Une méta-analyse sans ce jeu de données est en cours afin de vérifier si la différence de stimulation influe sur nos résultats.

Nous avons abordé la question d'une signature transcriptomique commune des Bregs. Les résultats chez l'Homme ont permis d'identifier une signature transcriptomique de 165 gènes spécifiques des Bregs. Elle est composée de 74 gènes surexprimés dont certains ont été associés avec le rôle régulateur des Bregs tels que le *GZMB* et *ENPP1*. En effet, les lymphocytes B *ENPP1*⁺ humains augmentent la production d'IL-10 par les Tregs permettant à ces derniers d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (Yoon *et al.*, 2016). Cependant, chez l'Homme, les lymphocytes B *ENPP1*⁺ ne présentent pas d'expression de l'IL-10 contrairement à ceux de la souris (Schumacher *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2012). Parmi les gènes surexprimés, on retrouve la formation de deux noyaux d'interactions protéiques reliés par le *GZMB* dont les fonctions sont associées aux ontologies « mitotic cell cycle » et « ribonucleoprotein complex biogenesis ». De plus, des gènes non identifiés chez les Bregs pourraient avoir un rôle potentiel dans leur fonction. C'est le cas de *IGF2R*, qui est plus fortement exprimé par les Bregs humains dans la méta-analyse, et qui code pour un récepteur à la fois à l'Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) et au Mannose-6-phosphate (M6P) (Scott and Kiess, 2015). L'expression d'*IGF2R* est retrouvée associée à l'expression de l'IL-10 par les lymphocytes B de la souris et cette production augmente très fortement en présence d'IGF2 (Geng *et al.*, 2014). Enfin, le signal d'activation de l'*IGF2R* exprimé par les Tregs augmente leurs fonctions suppressives et leur rôle dans l'inhibition de l'inflammation allergique de l'intestin (Yang *et al.*, 2014). De manière intéressante, l'*IGF2R* est un récepteur cation indépendant du manose-6-phosphate,

tandis que le M6PR est un récepteur au M6P cation dépendant et tous les deux sont capables de fixer le GZMB (Motyka et al., 2000). Motyka *et al.* ont montré que la fixation du GZMB au niveau de IGF2R et non de M6PR induit l'apoptose de cellules Jurkat. Ramakrishnan *et al.* ont montré que les cellules tumorales traitées par chimiothérapie ont une plus forte expression membranaire de IGF2R *in vitro* et *in vivo* (Ramakrishnan et al., 2010; Ramakrishnan and Gabrilovich, 2013). De plus, ils montrent que cette surexpression membranaire de IGF2R par les cellules tumorales, augmente leur fixation du GZMB et leur susceptibilité à l'apoptose médiée par les lymphocytes T activés et indépendamment de la perforine (Ramakrishnan et al., 2010). Ce mécanisme de fixation du GZMB à l'IGF2R pourrait être un mécanisme de l'apoptose médié par les Bregs GZMB⁺ envers les lymphocytes T. Cette hypothèse pourra être vérifiée dans des expériences de coculture de lymphocytes T avec des Bregs GZMB⁺ par l'ajout de M6P qui inhibe l'interaction entre le GZMB et l'IGF2R (Motyka et al., 2000).

En suivant la même méthodologie, nous avons identifié une signature transcriptomique des Bregs murins de 93 gènes dont 41 sont surexprimés et enrichis pour les ontologies associées à la régulation de la réponse immunitaire. Les résultats montrent une surexpression de l'*IL-10*, déjà identifiée comme cytokine immunosuppressive des Bregs, mais également de gènes impliqués dans la régulation de la réponse des lymphocytes T tels que *Lag3* et *Ctla4* (Liang et al., 2008). Bien que *Lag3* soit déjà associé aux Bregs CD138⁺ (Lino et al., 2018), son rôle et celui de *Ctla4* dans la fonction des Bregs restent inconnus et nécessitent d'autres études.

Nos résultats mettent également en évidence la capacité intrinsèque des Bregs à se différencier. Chez l'Homme, la méta-analyse révèle une surexpression de DUSP2 et DUSP5 par les Bregs et ces phosphatases sont impliquées dans l'inhibition de la voie ERK des lymphocytes B conduisant ainsi à leur différenciation en plasmocytes (Rui et al., 2006). En effet, Rui *et al.* ont montré que la stimulation prolongée du BCR de lymphocytes B naïfs entraîne l'activation de la voie ERK et l'inhibition de la différenciation en plasmocytes, qui se traduit par une diminution de l'expression de Blimp-1 et de CD138. À l'inverse, la stimulation très bien caractérisée des lymphocytes B par les lymphocytes T et leur production d'IL-2 et IL-5, induit l'activation de la phosphatase DUSP5 qui inhibe la voie ERK et empêche l'inhibition de la différenciation en plasmocytes (Rui et al., 2006). De même, DUSP2 est impliqué dans l'inhibition de ERK2 (Ward et al., 1994). Chez la souris, d'autres gènes impliqués dans la

différenciation en plasmocytes ont été identifiés différemment exprimés tels que *Bcl6* et *Prdm1*. Étant donné que *Bcl6* est un activateur important de la différenciation des lymphocytes B du centre germinatif et que *Prdm1*, codant pour Blimp-1, est crucial dans la différenciation en plasmocytes, ces résultats concordent avec la littérature identifiant les Bregs aux stades de plasmocytes (Chesneau et al., 2015; Crotty et al., 2010; Lino et al., 2018; Matsumoto et al., 2014) et aux Bregs capables de se différencier (Maseda et al., 2012). L'identification de gènes associés à différents stades de différenciation des lymphocytes B suggèrent que le développement des Bregs est indépendant d'un stade de différenciation particulier mais serait plutôt le résultat de conditions de stimulation particulières. Cependant, les voies de stimulation identifiées comme associées aux Bregs se rapprochent des voies de différenciation en plasmocyte et il en est de même pour les facteurs d'activation. Il reste donc à identifier ces voies et les mécanismes qui régissent la plasticité et l'orientation des Bregs/lymphocytes B effecteurs.

Une de nos interrogations concernait l'existence ou non d'une signature commune entre les Bregs humains et murins. La comparaison des Bregs humains et murins en croisant les listes de gènes différentiels, met en évidence seulement 3 gènes : *PPFIBP2*, *LAPTM4B* et le facteur de transcription *HIVEP3*. La protéine d'interaction *PPFIBP2* et la protéine lysosomale *LAPTM4B* n'ont pas de rôle connu dans la fonction des Bregs. Cependant, *LAPTM4B* est impliqué dans l'inhibition de la production du TGF- β par les lymphocytes Tregs humains (Huygens et al., 2015). D'une manière intéressante, *HIVEP3* apparaît comme un facteur de transcription des Bregs humains et murins et est connu pour reconnaître et fixer le signal de recombinaison des Ig (Allen et al., 2002a). *HIVEP3* interagit également avec TRAF, conduisant à l'inhibition de la réponse des facteurs nucléaires NF-kappa-B incluant ainsi l'apoptose et l'expression des gènes pro-inflammatoires par les lymphocytes T (Oukka et al., 2002). Ainsi, le rôle de *HIVEP3* dans la fonction suppressive des Bregs reste à étudier. Cependant, ces données ne suggèrent pas une signature des Bregs conservée entre les espèces.

D'autres facteurs de transcription ont été identifiés et pourraient avoir un rôle dans la biologie des Bregs. Nous avons identifié 7 facteurs de transcription qui sont sous-exprimés (*TFEC*, *ZBTB20*, *ZBTB4*, *RFX3*, *ZNF217*, *BHLHE41* et *PLAG1*) et 6 qui sont surexprimés (*HIVEP3*, *MYBL2*, *HNF1B*, *FOSL1*, *FOSL2* et *KLF5*) par les Bregs humains. Parmi eux, *FOSL1* est décrit comme étant un régulateur de la prolifération et un activateur de l'apoptose par les

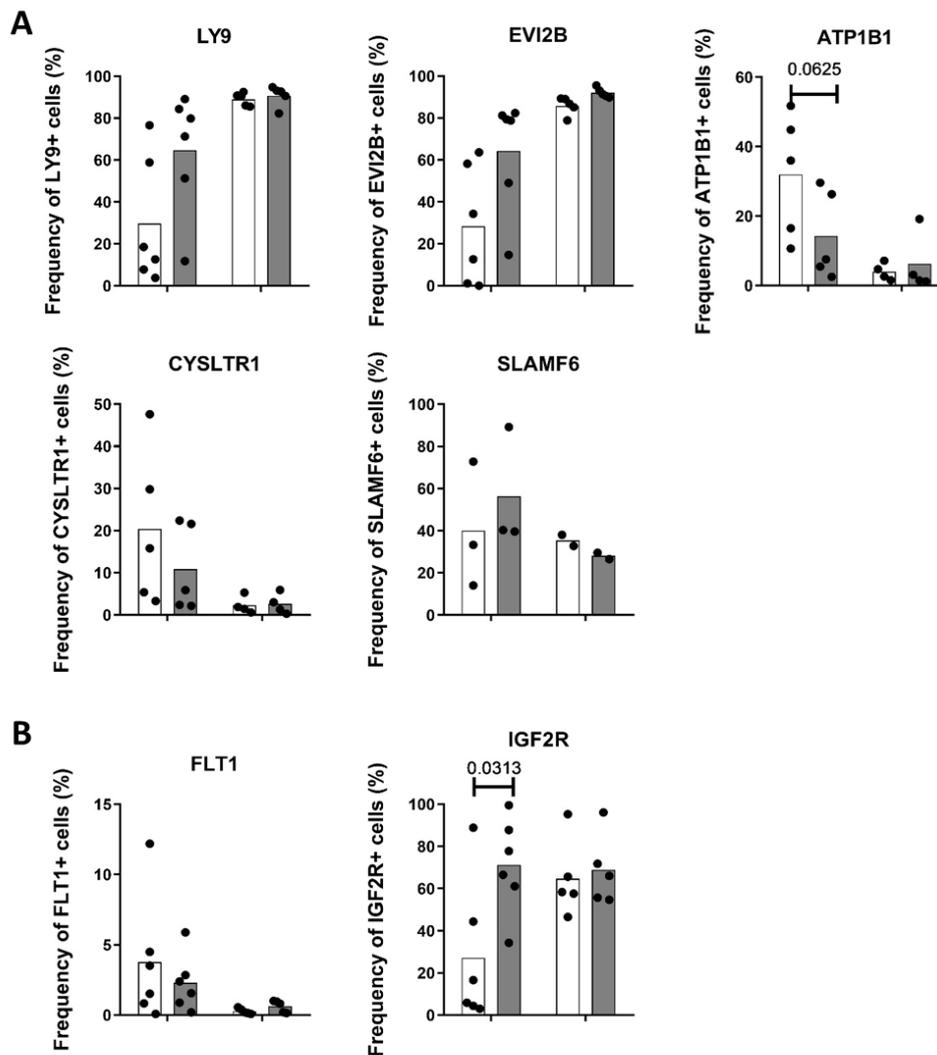
lymphocytes B murins (Grotsch et al., 2014). KLF-5 pourrait également participer à l'activation et à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Luo et al., 2019). Chez la souris nous montrons dans la signature Breg, un enrichissement en sites de fixation pour le facteur de transcription Ddit3::Cebpa qui cible *Prdm1* et *Bcl6*. Des études focalisées sur certains facteurs de transcription pourront être réalisées afin de comprendre leur rôle dans le développement et l'activation des Bregs. L'étude des facteurs de transcription pourra se faire *in vitro* par inhibition de leur expression via la transfection de siRNA et *in vivo* grâce aux modèles murins KO pour les gènes *HIVEP3* (Allen et al., 2002b) et *FOSL1* (Eferl et al., 2004).

Afin d'identifier des molécules extracellulaires spécifiques des Bregs qui permettraient de mieux les identifier et de les isoler, nous avons restreint notre sélection aux molécules exprimées à la surface membranaire des Bregs et avec un seuil de significativité de 1% (p-value ajustée avec correction de Bonferroni). Nous avons ainsi sélectionné 6 gènes dont les anticorps étaient disponibles, afin d'étudier leur expression entre les GZMB⁺ et les GZMB⁻ et entre les IL-10⁺ et les IL-10⁻ (**Annexe 1**). De plus, malgré une p-value de 2,5% nous avons sélectionné le gène codant IGF2R du fait de son intérêt biologique comme discuté précédemment. Seules les expressions protéiques d'ATP1B1 et d'IGF2R concordent avec leur expression transcriptomique respectivement sous-exprimée et surexprimée par les Bregs GZMB⁺. Cependant, ces deux marqueurs associés ne permettent pas d'isoler les Bregs GZMB⁺ des GZMB⁻ et leur expression n'est pas validée chez les Bregs IL-10⁺. Ce résultat pourrait correspondre aux différences fonctionnelles entre Bregs IL-10⁺ et GZMB⁺. Par ailleurs, nous avons récemment montré que les lymphocytes B GZMB^{+/hi} ont une plus grande sensibilité à l'apoptose que les GZMB⁻, suggérant un mécanisme d'autorégulation (Chesneau *et al.* en préparation). Ce mécanisme pourrait être médié par la fixation du GZMB à l'IGF2R exprimé à la surface des Bregs GZMB⁺. Ce mécanisme pourra également être vérifié par l'ajout de M6P inhibant l'interaction GZMB/IGF2R.

Les résultats de ces méta-analyses mettent donc en évidence des molécules potentiellement impliquées dans les fonctions régulatrices des Bregs et spécifiques aux espèces étudiées. Des études mécanistiques, centrées sur ces molécules identifiées, sont donc nécessaires pour comprendre leurs rôles dans les Bregs. Nous mettons en évidence des molécules impliquées dans les voies de signalisation qui tendent vers un profil Bregs en différenciation. Certaines questions restent en suspens quant à l'origine des Bregs. Les voies

d'activation et de différenciation des lymphocytes B et les voies d'acquisition d'une fonction régulatrice étant partagées, quels sont les facteurs et mécanismes responsables de l'orientation vers telle ou telle fonction ? Est-ce que cette capacité est intrinsèque à un clone de lymphocytes B donné et si oui, quels mécanismes génétiques et/ou épigénétiques sont responsables de cette susceptibilité de différenciation en Bregs ?

ANNEXES



Annexe 1 : Caractérisation phénotypique des Bregs

Pour analyser l'expression différentielle des marqueurs membranaires identifiés par la méta-analyse entre les Bregs et les non-Bregs, nous avons stimulé des lymphocytes B isolées de PBMC humains. Les lymphocytes B ont été stimulés suivant deux conditions de stimulations, l'une permettant la génération de Bregs GZMB⁺ et l'autre, la génération de Bregs IL-10⁺. L'expression à la surface des marqueurs (A) LY9, EVI2B, ATP1B1, CYSLTR1 et SLAMF6 sous-exprimés par les Bregs et (B) FLT1 et IGF2R surexprimés par les Bregs, ont été analysés entre les Bregs GZMB⁺ et les non-Bregs GZMB⁻ et entre les Bregs IL-10⁺ et les non-Bregs IL-10⁻ dans leur condition de stimulation respective. Les histogrammes montrent la proportion des cellules positives pour le marqueur parmi les Bregs (en gris) et parmi les non-Bregs (en blanc), n=3 à 6 expériences indépendantes. Test statistique de Wilcoxon pour échantillons appariés.

RÉFÉRENCES

- Allen, C.E., Mak, C.H., and Wu, L.C. (2002a). The kappa B transcriptional enhancer motif and signal sequences of V(D)J recombination are targets for the zinc finger protein HIVEP3/KRC: a site selection amplification binding study. *BMC Immunol* 3, 10.
- Allen, C.E., Muthusamy, N., Weisbrode, S.E., Hong, J.W., and Wu, L.C. (2002b). Developmental anomalies and neoplasia in animals and cells deficient in the large zinc finger protein KRC. *Genes Chromosomes Cancer* 35, 287-298.
- Baba, Y., Matsumoto, M., and Kurosaki, T. (2015). Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int Immunol* 27, 487-493.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., *et al.* (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.
- Banko, Z., Pozsgay, J., Szili, D., Toth, M., Gati, T., Nagy, G., Rojkovich, B., and Sarmay, G. (2017). Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *J Immunol* 198, 1512-1520.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 105, 193-210.
- Bellin, M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., and Mummery, C.L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 713-726.
- Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 6, 48-58.
- Bigot, J., Pilon, C., Maignon, M., Grondin, C., Leibler, C., Aissat, A., Pirenne, F., Cohen, J.L., and Grimbert, P. (2016). Transcriptomic Signature of the CD24(hi) CD38(hi) Transitional B Cells Associated With an Immunoregulatory Phenotype in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant* 16, 3430-3442.
- Bjarnadottir, K., Benkhoucha, M., Merkler, D., Weber, M.S., Payne, N.L., Bernard, C.C.A., Molnarfi, N., and Lalive, P.H. (2016). B cell-derived transforming growth factor-beta1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. *Sci Rep* 6, 34594.
- Blair, P.A., Norena, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32, 129-140.
- Boboila, C., Alt, F.W., and Schwer, B. (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv Immunol* 116, 1-49.
- Boothby, M.R., Hodges, E., and Thomas, J.W. (2019). Molecular regulation of peripheral B cells and their progeny in immunity. *Genes Dev* 33, 26-48.
- Bradley, C.K., Scott, H.A., Chami, O., Peura, T.T., Dumevska, B., Schmidt, U., and Stojanov, T. (2011). Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* 20, 495-502.

- Braza, F., Chesne, J., Durand, M., Dirou, S., Brosseau, C., Mahay, G., Cheminant, M.A., Magnan, A., and Brouard, S. (2015). A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* *70*, 1421-1431.
- Buchta, C.M., and Bishop, G.A. (2014). Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol Res* *59*, 12-22.
- Bueno, C., Sardina, J.L., Di Stefano, B., Romero-Moya, D., Munoz-Lopez, A., Ariza, L., Chillon, M.C., Balanzategui, A., Castano, J., Herreros, A., *et al.* (2016). Reprogramming human B cells into induced pluripotent stem cells and its enhancement by C/EBPalpha. *Leukemia* *30*, 674-682.
- Carpenter, L., Malladi, R., Yang, C.T., French, A., Pilkington, K.J., Forsey, R.W., Sloane-Stanley, J., Silk, K.M., Davies, T.J., Fairchild, P.J., *et al.* (2011). Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis. *Blood* *117*, 4008-4011.
- Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Munoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., and Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol* *186*, 5569-5579.
- Cawthorne, C., Swindell, R., Stratford, I.J., Dive, C., and Welman, A. (2007). Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol Tech* *18*, 120-123.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* *102*, 906-915.
- Cheng, H., Zheng, Z., and Cheng, T. (2019). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell*.
- Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.A., *et al.* (2015). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J Am Soc Nephrol* *26*, 2588-2598.
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., *et al.* (2014). Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* *14*, 144-155.
- Chicha, L., Feki, A., Boni, A., Irion, O., Hovatta, O., and Jaconi, M. (2011). Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34- and CD34+ progenitors with distinct characteristics. *PLoS One* *6*, e14733.
- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G.M., Lim, H., Choi, I.Y., Ferrari, F., Tsankov, A.M., Pop, R., *et al.* (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol* *33*, 1173-1181.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* *125*, 725-732.
- Correale, J., and Farez, M. (2007). Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* *61*, 97-108.
- Correale, J., Farez, M., and Razzitte, G. (2008). Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol* *64*, 187-199.
- Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* *11*, 114-120.

- Davidson, N.J., Leach, M.W., Fort, M.M., Thompson-Snipes, L., Kuhn, R., Muller, W., Berg, D.J., and Rennick, D.M. (1996). T helper cell 1-type CD4⁺ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* *184*, 241-251.
- de Pooter, R., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). T-cell potential and development in vitro: the OP9-DL1 approach. *Curr Opin Immunol* *19*, 163-168.
- de Rham, C., and Villard, J. (2011). How to cross immunogenetic hurdles to human embryonic stem cell transplantation. *Semin Immunopathol* *33*, 525-534.
- de Rham, C., and Villard, J. (2014). Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy. *J Immunol Res* *2014*, 518135.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* *16*, 297-309.
- Deshwar, A.G., and Morris, Q. (2014). PLIDA: cross-platform gene expression normalization using perturbed topic models. *Bioinformatics* *30*, 956-961.
- Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Vadasz, Z., Toubi, E., and Giacomelli, R. (2019). Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* *18*, 102369.
- Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A., and Vieira, P. (2005). Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* *201*, 971-979.
- Dick, J.E. (1996). Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol* *8*, 197-206.
- Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest* *121*, 3645-3656.
- Dominique, B. (2000). Les cellules souches hématopoïétiques chez la souris et chez l'homme : CD34 positives et/ou négatives ? *Hématologie* *5*, 431-438.
- Dworzak, M.N., Fritsch, G., Froschl, G., Printz, D., and Gadner, H. (1998). Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* *92*, 3203-3209.
- Eferl, R., Hoebertz, A., Schilling, A.F., Rath, M., Karreth, F., Kenner, L., Amling, M., and Wagner, E.F. (2004). The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J* *23*, 2789-2799.
- Egawa, T., Kawabata, K., Kawamoto, H., Amada, K., Okamoto, R., Fujii, N., Kishimoto, T., Katsura, Y., and Nagasawa, T. (2001). The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* *15*, 323-334.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., *et al.* (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* *1*, 568-577.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* *178*, 7868-7878.
- Fehres, C.M., van Uden, N.O., Yeremenko, N.G., Fernandez, L., Franco Salinas, G., van Duivenvoorde, L.M., Huard, B., Morel, J., Spits, H., Hahne, M., *et al.* (2019). APRIL

- Induces a Novel Subset of IgA(+) Regulatory B Cells That Suppress Inflammation via Expression of IL-10 and PD-L1. *Front Immunol* *10*, 1368.
- Fesik, S.W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* *103*, 273-282.
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* *3*, 944-950.
- Fishman, J.A. (2017). Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant* *17*, 856-879.
- Fitzsimmons, D., Hodsdon, W., Wheat, W., Maira, S.M., Wasylyk, B., and Hagman, J. (1996). Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes Dev* *10*, 2198-2211.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- French, A., Yang, C.T., Taylor, S., Watt, S.M., and Carpenter, L. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived B lymphocytes express sIgM and can be generated via a hemogenic endothelium intermediate. *Stem Cells Dev* *24*, 1082-1095.
- Gaignerie, A., Lefort, N., Rousselle, M., Forest-Choquet, V., Flippe, L., Francois-Campion, V., Girardeau, A., Caillaud, A., Chariou, C., Francheteau, Q., *et al.* (2018). Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Sci Rep* *8*, 14363.
- Geng, X.R., Yang, G., Li, M., Song, J.P., Liu, Z.Q., Qiu, S., Liu, Z., and Yang, P.C. (2014). Insulin-like growth factor-2 enhances functions of antigen (Ag)-specific regulatory B cells. *J Biol Chem* *289*, 17941-17950.
- Gourraud, P.A., Gilson, L., Girard, M., and Peschanski, M. (2012). The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells* *30*, 180-186.
- Grotsch, B., Brachs, S., Lang, C., Luther, J., Derer, A., Schlotzer-Schrehardt, U., Bozec, A., Fillatreau, S., Berberich, I., Hobeika, E., *et al.* (2014). The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells. *J Exp Med* *211*, 2199-2212.
- Hagn, M., Ebel, V., Sontheimer, K., Schwesinger, E., Lunov, O., Beyer, T., Fabricius, D., Barth, T.F., Viardot, A., Stilgenbauer, S., *et al.* (2010). CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur J Immunol* *40*, 2060-2069.
- Hagn, M., Schwesinger, E., Ebel, V., Sontheimer, K., Maier, J., Beyer, T., Syrovets, T., Laumonnier, Y., Fabricius, D., Simmet, T., *et al.* (2009). Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. *J Immunol* *183*, 1838-1845.
- Hagn, M., Sontheimer, K., Dahlke, K., Brueggemann, S., Kaltenmeier, C., Beyer, T., Hofmann, S., Lunov, O., Barth, T.F., Fabricius, D., *et al.* (2012). Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol Cell Biol* *90*, 457-467.
- Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmiler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H.R., and Tschoop, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J Immunol* *26*, 721-724.
- Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* *5*, 645-650.
- Heard, N., and Rubin-Delanchy, P. (2017). Choosing Between Methods for Combining p-values. *Biometrika* *105*.

- Hicks, S.C., and Irizarry, R.A. (2015). *quantro*: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method. *Genome Biol* 16, 117.
- Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2011). Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 121, 4268-4280.
- Horikawa, M., Weimer, E.T., DiLillo, D.J., Venturi, G.M., Spolski, R., Leonard, W.J., Heise, M.T., and Tedder, T.F. (2013). Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice. *J Immunol* 190, 1158-1168.
- Hu, J., and Wan, Y. (2011). Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology* 132, 307-314.
- Hua, C., Audo, R., Yeremenko, N., Baeten, D., Hahne, M., Combe, B., Morel, J., and Daien, C. (2016). A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun* 73, 64-72.
- Huygens, C., Lienart, S., Dedobbeleer, O., Stockis, J., Gauthy, E., Coulie, P.G., and Lucas, S. (2015). Lysosomal-associated Transmembrane Protein 4B (LAPTM4B) Decreases Transforming Growth Factor beta1 (TGF-beta1) Production in Human Regulatory T Cells. *J Biol Chem* 290, 20105-20116.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., *et al.* (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106, 1590-1600.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., *et al.* (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530-541.
- Jahrsdorfer, B., Blackwell, S.E., Wooldridge, J.E., Huang, J., Andreski, M.W., Jacobus, L.S., Taylor, C.M., and Weiner, G.J. (2006). B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood* 108, 2712-2719.
- Jangalwe, S., Shultz, L.D., Mathew, A., and Brehm, M.A. (2016). Improved B cell development in humanized NOD-scid IL2Rgamma(null) mice transgenically expressing human stem cell factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Immun Inflamm Dis* 4, 427-440.
- Julien, E., El Omar, R., and Tavian, M. (2016). Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett* 590, 3987-4001.
- Kaltenmeier, C., Gawanbacht, A., Beyer, T., Lindner, S., Trzaska, T., van der Merwe, J.A., Harter, G., Gruner, B., Fabricius, D., Lotfi, R., *et al.* (2015). CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J Immunol* 194, 3768-3777.
- Kardel, M.D., and Eaves, C.J. (2012). Modeling human hematopoietic cell development from pluripotent stem cells. *Exp Hematol* 40, 601-611.
- Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L. (1974). B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251, 550-551.
- Kee, B.L., and Murre, C. (1998). Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* 188, 699-713.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704.

- Keller, G., Lacaud, G., and Robertson, S. (1999). Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp Hematol* 27, 777-787.
- Kennedy, M., D'Souza, S.L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109, 2679-2687.
- Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.L., and Kondo, M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med* 201, 1197-1203.
- Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Iino, T., Mori, Y., Iwasaki, H., Niino, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Harada, M., *et al.* (2008). Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol* 180, 7358-7367.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- Klinker, M.W., Reed, T.J., Fox, D.A., and Lundy, S.K. (2013). Interleukin-5 supports the expansion of fas ligand-expressing killer B cells that induce antigen-specific apoptosis of CD4(+) T cells and secrete interleukin-10. *PLoS One* 8, e70131.
- Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., *et al.* (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315-323.
- Korniotis, S., Gras, C., Letscher, H., Montandon, R., Megret, J., Siegert, S., Ezine, S., Fallon, P.G., Luther, S.A., Fillatreau, S., *et al.* (2016). Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells. *Nat Commun* 7, 12134.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 12, 2662-2672.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Kumar, A., D'Souza, S.S., and Thakur, A.S. (2019). Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Stem Cells Int* 2019, 2141475.
- Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., Boudinot, P., Anderton, S.M., and Fillatreau, S. (2010). Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol Rev* 233, 146-161.
- Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., *et al.* (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 180, 4763-4773.
- Larbi, A., Mitjavila-Garcia, M.T., Flamant, S., Valogne, Y., Clay, D., Usunier, B., l'Homme, B., Feraud, O., Casal, I., Gobbo, E., *et al.* (2014). Generation of multipotent early lymphoid progenitors from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23, 2983-2995.
- Laurenti, E., and Gottgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418-426.
- Lee, C.C., and Kung, J.T. (2012). Marginal zone B cell is a major source of Il-10 in *Listeria monocytogenes* susceptibility. *J Immunol* 189, 3319-3327.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., *et al.* (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells

- by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* *180*, 5916-5926.
- Lin, D.Y., and Zeng, D. (2009). Proper analysis of secondary phenotype data in case-control association studies. *Genet Epidemiol* *33*, 256-265.
- Lin, W., Cerny, D., Chua, E., Duan, K., Yi, J.T., Shadan, N.B., Lum, J., Maho-Vaillant, M., Zolezzi, F., Wong, S.C., *et al.* (2014). Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. *J Immunol* *193*, 2258-2266.
- Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., *et al.* (2013). Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* *73*, 2468-2479.
- Lindsey, S.E., Butcher, J.T., and Yalcin, H.C. (2014). Mechanical regulation of cardiac development. *Front Physiol* *5*, 318.
- Lino, A.C., Dang, V.D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., Simon, Q., Thalmensi, J., Baures, A., Fluhler, V., *et al.* (2018). LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* *49*, 120-133.
- Liu, B.S., Cao, Y., Huizinga, T.W., Hafler, D.A., and Toes, R.E. (2014). TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells. *Eur J Immunol* *44*, 2121-2129.
- Luo, S., Ding, S., Liao, J., Zhang, P., Liu, Y., Zhao, M., and Lu, Q. (2019). Excessive miR-152-3p Results in Increased BAFF Expression in SLE B-Cells by Inhibiting the KLF5 Expression. *Front Immunol* *10*, 1127.
- Ma, A., Datta, M., Margosian, E., Chen, J., and Horak, I. (1995). T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med* *182*, 1567-1572.
- Macallan, D.C., Wallace, D.L., Zhang, Y., Ghattas, H., Asquith, B., de Lara, C., Worth, A., Panayiotakopoulos, G., Griffin, G.E., Tough, D.F., *et al.* (2005). B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells. *Blood* *105*, 3633-3640.
- Maeda, T., Merghoub, T., Hobbs, R.M., Dong, L., Maeda, M., Zakrzewski, J., van den Brink, M.R., Zelent, A., Shigematsu, H., Akashi, K., *et al.* (2007). Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* *316*, 860-866.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W.S. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* *23*, 945-974.
- Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* *1*, 635-645.
- Mallon, B.S., Hamilton, R.S., Kozhich, O.A., Johnson, K.R., Fann, Y.C., Rao, M.S., and Robey, P.G. (2014). Comparison of the molecular profiles of human embryonic and induced pluripotent stem cells of isogenic origin. *Stem Cell Res* *12*, 376-386.
- Mandel, E.M., and Grosschedl, R. (2010). Transcription control of early B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* *22*, 161-167.
- Martensson, I.L., and Ceredig, R. (2000). Review article: role of the surrogate light chain and the pre-B-cell receptor in mouse B-cell development. *Immunology* *101*, 435-441.
- Martin, R., McFarland, H.F., and McFarlin, D.E. (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* *10*, 153-187.
- Maseda, D., Smith, S.H., DiLillo, D.J., Bryant, J.M., Candando, K.M., Weaver, C.T., and Tedder, T.F. (2012). Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo. *J Immunol* *188*, 1036-1048.

- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., *et al.* (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* *41*, 1040-1051.
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., and Tedder, T.F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* *185*, 2240-2252.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* *197*, 489-501.
- Mauri, C., and Menon, M. (2015). The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* *27*, 479-486.
- Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest* *127*, 772-779.
- McGrath, K.E., and Palis, J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol* *33*, 1021-1028.
- McNiece, I.K., Langley, K.E., and Zsebo, K.M. (1991). The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* *146*, 3785-3790.
- Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest* *125*, 2203-2210.
- Minagawa, R., Okano, S., Tomita, Y., Kishihara, K., Yamada, H., Nomoto, K., Shimada, M., Maehara, Y., Sugimachi, K., Yoshikai, Y., *et al.* (2004). The Critical Role of Fas-Fas Ligand Interaction in Donor-Specific Transfusion-Induced Tolerance to H-Y Antigen. *Transplantation* *78*, 799-806.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Smith, R.N., Preffer, F.I., and Bhan, A.K. (1997). Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med* *186*, 1749-1756.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* *16*, 219-230.
- Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Bhan, A.K., and Tonegawa, S. (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* *75*, 274-282.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* *6*, 283-294.
- Montandon, R., Korniotis, S., Layseca-Espinosa, E., Gras, C., Megret, J., Ezine, S., Dy, M., and Zavala, F. (2013). Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E2199-2208.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibei, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., *et al.* (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* *103*, 491-500.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* *6*, 107-116.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2305-2309.
- Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* *265*, 1098-1101.

- Neta, R., and Salvin, S.B. (1974). Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol* *113*, 1716-1725.
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kuhl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., *et al.* (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* *33*, 777-790.
- Nocentini, G., and Riccardi, C. (2009). GITR: a modulator of immune response and inflammation. *Adv Exp Med Biol* *647*, 156-173.
- Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* *26*, 715-725.
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Mandal, M., Triggs, J.R., Bertolino, E., Sciammas, R., Dinner, A.R., Clark, M.R., and Singh, H. (2012). A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat Immunol* *13*, 300-307.
- Oleinika, K., Mauri, C., and Salama, A.D. (2019). Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol* *15*, 11-26.
- Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., and Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res* *71*, 3505-3515.
- Oukka, M., Kim, S.T., Lugo, G., Sun, J., Wu, L.C., and Glimcher, L.H. (2002). A mammalian homolog of *Drosophila schnurri*, KRC, regulates TNF receptor-driven responses and interacts with TRAF2. *Mol Cell* *9*, 121-131.
- Parekh, V.V., Prasad, D.V., Banerjee, P.P., Joshi, B.N., Kumar, A., and Mishra, G.C. (2003). B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J Immunol* *170*, 5897-5911.
- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* *180*, 1955-1960.
- Pettinato, G., Wen, X., and Zhang, N. (2014). Formation of well-defined embryoid bodies from dissociated human induced pluripotent stem cells using microfabricated cell-repellent microwell arrays. *Sci Rep* *4*, 7402.
- Pettinato, G., Wen, X., and Zhang, N. (2015). Engineering Strategies for the Formation of Embryoid Bodies from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* *24*, 1595-1609.
- Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Gottgens, B., and Passegue, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* *17*, 35-46.
- Piper, C.J.M., Rosser, E.C., Oleinika, K., Nistala, K., Krausgruber, T., Rendeiro, A.F., Banos, A., Drozdov, I., Villa, M., Thomson, S., *et al.* (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep* *29*, 1878-1892 e1877.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and

- functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **28**, 848-855.
- Pronk, C.J., Rossi, D.J., Mansson, R., Attema, J.L., Norddahl, G.L., Chan, C.K., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., and Bryder, D. (2007). Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* **1**, 428-442.
- Puliaeva, I., Puliaev, R., Shustov, A., Haas, M., and Via, C.S. (2008). Fas expression on antigen-specific T cells has costimulatory, helper, and down-regulatory functions in vivo for cytotoxic T cell responses but not for T cell-dependent B cell responses. *J Immunol* **181**, 5912-5929.
- Radtke, F., Wilson, A., and MacDonald, H.R. (2004). Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol* **16**, 174-179.
- Ragonnaud, E., Moritoh, K., Bodogai, M., Gusev, F., Garaud, S., Chen, C., Wang, X., Baljinnyam, T., Becker, K.G., Maul, R.W., *et al.* (2019). Tumor-Derived Thymic Stromal Lymphopoietin Expands Bone Marrow B-cell Precursors in Circulation to Support Metastasis. *Cancer Res* **79**, 5826-5838.
- Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H.I., Antonia, S., Altiock, S., Celis, E., and Gabrilovich, D.I. (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* **120**, 1111-1124.
- Ramakrishnan, R., and Gabrilovich, D.I. (2013). The role of mannose-6-phosphate receptor and autophagy in influencing the outcome of combination therapy. *Autophagy* **9**, 615-616.
- Ray, A., Basu, S., Williams, C.B., Salzman, N.H., and Dittel, B.N. (2012). A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* **188**, 3188-3198.
- Repasky, J.A., Corbett, E., Boboila, C., and Schatz, D.G. (2004). Mutational analysis of terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated N-nucleotide addition in V(D)J recombination. *J Immunol* **172**, 5478-5488.
- Rich, R.F., Cook, W.J., and Green, W.R. (2006). Spontaneous in vivo retrovirus-infected T and B cells, but not dendritic cells, mediate antigen-specific Fas ligand/Fas-dependent apoptosis of anti-retroviral CTL. *Virology* **346**, 287-300.
- Roberts, R.M., Ezashi, T., Sheridan, M.A., and Yang, Y. (2018). Specification of trophoblast from embryonic stem cells exposed to BMP4. *Biol Reprod* **99**, 212-224.
- Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J., and Launois, P. (2010). Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol* **184**, 886-894.
- Rudy, J., and Valafar, F. (2011). Empirical comparison of cross-platform normalization methods for gene expression data. *BMC Bioinformatics* **12**, 467.
- Rui, L., Healy, J.I., Blasioli, J., and Goodnow, C.C. (2006). ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation. *J Immunol* **177**, 5337-5346.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol* **34**, 317-334.

- Samuelsson, A., Sonnerborg, A., Heuts, N., Coster, J., and Chiodi, F. (1997). Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* *13*, 1031-1038.
- Sanz, I., Wei, C., Jenks, S.A., Cashman, K.S., Tipton, C., Woodruff, M.C., Hom, J., and Lee, F.E. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front Immunol* *10*, 2458.
- Saxena, A., Khosraviani, S., Noel, S., Mohan, D., Donner, T., and Hamad, A.R. (2015). Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* *74*, 27-34.
- Schumacher, A., Ehrentraut, S., Scharm, M., Wang, H., Hartig, R., Morse, H.C., 3rd, and Zenclussen, A.C. (2018). Plasma Cell Alloantigen 1 and IL-10 Secretion Define Two Distinct Peritoneal B1a B Cell Subsets With Opposite Functions, PC1(high) Cells Being Protective and PC1(low) Cells Harmful for the Growing Fetus. *Front Immunol* *9*, 1045.
- Schweighoffer, E., and Tybulewicz, V.L. (2018). Signalling for B cell survival. *Curr Opin Cell Biol* *51*, 8-14.
- Scott, C.D., and Kiess, W. (2015). Soluble M6P/IGFIIR in the circulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* *29*, 723-733.
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* *2*, 640-653.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., *et al.* (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* *507*, 366-370.
- Sitnicka, E., Brakebusch, C., Martensson, I.L., Svensson, M., Agace, W.W., Sigvardsson, M., Buza-Vidas, N., Bryder, D., Cilio, C.M., Ahlenius, H., *et al.* (2003). Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *J Exp Med* *198*, 1495-1506.
- Slayton, W.B., Juul, S.E., Calhoun, D.A., Li, Y., Braylan, R.C., and Christensen, R.D. (1998). Hematopoiesis in the liver and marrow of human fetuses at 5 to 16 weeks postconception: quantitative assessment of macrophage and neutrophil populations. *Pediatr Res* *43*, 774-782.
- Slukvin, II (2016). Generating human hematopoietic stem cells in vitro -exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition. *FEBS Lett* *590*, 4126-4143.
- Smith, M.R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* *22*, 7359-7368.
- Solnica-Krezel, L., and Sepich, D.S. (2012). Gastrulation: making and shaping germ layers. *Annu Rev Cell Dev Biol* *28*, 687-717.
- Somasundaram, R., Prasad, M.A., Ungerback, J., and Sigvardsson, M. (2015). Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* *126*, 144-152.
- Stallone, G., Infante, B., and Gesualdo, L. (2009). There is a choice for immunosuppressive drug nephrotoxicity: Is it time to change? *J Nephrol* *22*, 326-332.
- Sudo, T., Ito, M., Ogawa, Y., Iizuka, M., Kodama, H., Kunisada, T., Hayashi, S., Ogawa, M., Sakai, K., and Nishikawa, S. (1989). Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med* *170*, 333-338.

- Sun, J., Wang, J., Pefanis, E., Chao, J., Rothschild, G., Tachibana, I., Chen, J.K., Ivanov, II, Rabadan, R., Takeda, Y., *et al.* (2015). Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. *Cell Rep* *13*, 1110-1117.
- Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., and Holmgren, J. (2008). B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol* *181*, 8278-8287.
- Tadmor, T., Zhang, Y., Cho, H.M., Podack, E.R., and Rosenblatt, J.D. (2011). The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol Immunother* *60*, 609-619.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Taminou, J., Lazar, C., Meganck, S., and Nowe, A. (2014). Comparison of merging and meta-analysis as alternative approaches for integrative gene expression analysis. *ISRN Bioinform* *2014*, 345106.
- Tanner, J.E., and Alfieri, C. (1999). Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* *94*, 3439-3447.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H.S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* *87*, 67-72.
- Teo, A.K., Ali, Y., Wong, K.Y., Chipperfield, H., Sadasivam, A., Poobalan, Y., Tan, E.K., Wang, S.T., Abraham, S., Tsuneyoshi, N., *et al.* (2012). Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells* *30*, 631-642.
- Tian, J., Okabe, T., Miyazaki, T., Takeshita, S., and Kudo, A. (1997). Pax-5 is identical to EBB-1/KLP and binds to the VpreB and lambda5 promoters as well as the KI and KII sites upstream of the Jkappa genes. *Eur J Immunol* *27*, 750-755.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* *167*, 1081-1089.
- Tian, J., Zekzer, D., Lu, Y., Dang, H., and Kaufman, D.L. (2006). B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among beta cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol* *176*, 2654-2661.
- Tinhofer, I., Marschitz, I., Kos, M., Henn, T., Egle, A., Villunger, A., and Greil, R. (1998). Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *91*, 4273-4281.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* *20*, 707-718.
- Touraine, J.L., and Traeger, J. (1987). Malignant lymphoproliferative disorders of viral origin in transplant patients undergoing immunosuppressive therapy. *Cancer Detect Prev Suppl* *1*, 159-164.

- Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2009). Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol* *39*, 2317-2324.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* *79*, 901-912.
- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Sollner, S., Akdis, D.G., Ruckert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* *131*, 1204-1212.
- van der Vlugt, L.E., Mlejnek, E., Ozir-Fazalalikhani, A., Janssen Bonas, M., Dijkman, T.R., Labuda, L.A., Schot, R., Guigas, B., Moller, G.M., Hiemstra, P.S., *et al.* (2014). CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy* *44*, 517-528.
- van Olfen, R.W., Koning, N., van Gisbergen, K.P., Wensveen, F.M., Hoek, R.M., Boon, L., Hamann, J., van Lier, R.A., and Nolte, M.A. (2009). GITR triggering induces expansion of both effector and regulatory CD4+ T cells in vivo. *J Immunol* *182*, 7490-7500.
- Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A., and Slukvin, II (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* *105*, 617-626.
- Vodyanik, M.A., Thomson, J.A., and Slukvin, II (2006). Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* *108*, 2095-2105.
- Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L., and Borsellino, G. (2016). Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* *7*, 382.
- Walsh, C.J., Hu, P., Batt, J., and Santos, C.C. (2015). Microarray Meta-Analysis and Cross-Platform Normalization: Integrative Genomics for Robust Biomarker Discovery. *Microarrays (Basel)* *4*, 389-406.
- Wamaitha, S.E., and Niakan, K.K. (2018). Human Pre-gastrulation Development. *Curr Top Dev Biol* *128*, 295-338.
- Wang, H., Shin, D.M., Abbasi, S., Jain, S., Kovalchuk, A.L., Beaty, N., Chen, S., Gonzalez-Garcia, I., and Morse, H.C., 3rd (2012). Expression of plasma cell alloantigen 1 defines layered development of B-1a B-cell subsets with distinct innate-like functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 20077-20082.
- Wang, K., Tao, L., Su, J., Zhang, Y., Zou, B., Wang, Y., Zou, M., Chen, N., Lei, L., and Li, X. (2017). TLR4 supports the expansion of FasL(+)CD5(+)CD1d(hi) regulatory B cells, which decreases in contact hypersensitivity. *Mol Immunol* *87*, 188-199.
- Wang, R.X., Yu, C.R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M.B., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.H., and Egwuagu, C.E. (2014). Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* *20*, 633-641.
- Wang, W.W., Yuan, X.L., Chen, H., Xie, G.H., Ma, Y.H., Zheng, Y.X., Zhou, Y.L., and Shen, L.S. (2015). CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget* *6*, 33486-33499.
- Wang, X., Wang, G., Wang, Z., Liu, B., Han, N., Li, J., Lu, C., Liu, X., Zhang, Q., Yang, Q., *et al.* (2019). PD-1-expressing B cells suppress CD4(+) and CD8(+) T cells via PD-1/PD-L1-dependent pathway. *Mol Immunol* *109*, 20-26.

- Ward, Y., Gupta, S., Jensen, P., Wartmann, M., Davis, R.J., and Kelly, K. (1994). Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature* *367*, 651-654.
- Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.R. (2002). Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* *17*, 277-288.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 387-403.
- Wentink, M.W.J., Kalina, T., Perez-Andres, M., Del Pino Molina, L., H, I.J., Kavelaars, F.G., Lankester, A.C., Lecrevisse, Q., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., *et al.* (2019). Delineating Human B Cell Precursor Development With Genetically Identified PID Cases as a Model. *Front Immunol* *10*, 2680.
- Whitlock, C.A., and Witte, O.N. (1982). Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 3608-3612.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* *135*, 1118-1129.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* *6*, 93-106.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A., Jr. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* *184*, 2271-2278.
- Wu, A.M., Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1968). Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *59*, 1209-1215.
- Xu, Y., Chen, C., Hellwarth, P.B., and Bao, X. (2019). Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioact Mater* *4*, 366-379.
- Yang, G., Geng, X.R., Song, J.P., Wu, Y., Yan, H., Zhan, Z., Yang, L., He, W., Liu, Z.Q., Qiu, S., *et al.* (2014). Insulin-like growth factor 2 enhances regulatory T-cell functions and suppresses food allergy in an experimental model. *J Allergy Clin Immunol* *133*, 1702-1708.
- Yang, M., Deng, J., Liu, Y., Ko, K.H., Wang, X., Jiao, Z., Wang, S., Hua, Z., Sun, L., Srivastava, G., *et al.* (2012). IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *Am J Pathol* *180*, 2375-2385.
- Yoon, J., Wang, H., Kim, Y.C., Yoshimoto, M., Abbasi, S., and Morse Iii, H.C. (2016). Plasma cell alloantigen ENPP1 is expressed by a subset of human B cells with potential regulatory functions. *Immunol Cell Biol* *94*, 719-728.
- Yoshida, T., Ng, S.Y., Zuniga-Pflucker, J.C., and Georgopoulos, K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* *7*, 382-391.
- Zambidis, E.T., Peault, B., Park, T.S., Bunz, F., and Civin, C.I. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* *106*, 860-870.
- Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., and Flake, A.W. (1996). The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int J Hematol* *63*, 179-192.

- Zhang, B., He, L., Liu, Y., Zhang, J., Zeng, Q., Wang, S., Fan, Z., Fang, F., Chen, L., Lv, Y., *et al.* (2018). Prostaglandin E2 Is Required for BMP4-Induced Mesoderm Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 10, 905-919.
- Zhang, J., Wan, M., Ren, J., Gao, J., Fu, M., Wang, G., Liu, Y., and Li, W. (2016). Positive selection of B10 cells is determined by BCR specificity and signaling strength. *Cell Immunol* 304-305, 27-34.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.
- Zovein, A.C., Hofmann, J.J., Lynch, M., French, W.J., Turlo, K.A., Yang, Y., Becker, M.S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J.C., *et al.* (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 625-636.

Titre : Caractérisation et génération des lymphocytes B régulateurs à partir de cellules souches pluripotentes

Mots clés : Lymphocytes B régulateurs, Cellules souches pluripotentes induites, Cellules souches embryonnaires, Méta-analyse, Expression de gènes, régulation immunitaire.

Résumé : Les lymphocytes B régulateurs (Bregs) sont d'importants acteurs de l'immunité intervenant dans plusieurs pathologies. Cependant, les Bregs regroupent plusieurs populations cellulaires sans consensus concernant leur phénotype, ce qui complique leur étude et leur potentielle utilisation en thérapie cellulaire ou en tant que biomarqueur. Nous avons identifié une population Breg capable de bloquer une réponse T effectrice par des mécanismes dépendant du granzyme B (GZMB) et du contact cellulaire. Mon travail de thèse, centré sur l'étude de ces Bregs GZMB⁺, avait comme objectifs 1) de générer des Bregs GZMB⁺ possédant une expression répressible du GZMB, induite par génie génétique, à partir de cellules souches pluripotentes, et 2) de mieux caractériser ces Bregs GZMB⁺ ainsi que les sous-types de Bregs décrits par une méta-analyse transcriptomique.

Malgré une faible proportion de lymphocytes B différenciés à partir de cellules souches, nous avons amélioré la génération de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺CD43⁺ mais qui s'avèrent insuffisants pour la production de lymphocytes B. Nous avons montré que le phénotype CD31^{int}CD45^{int} pourrait enrichir les progéniteurs capables de se différencier en lymphocyte B et validé les outils CRISPR/Cas9 nécessaires aux étapes de modifications géniques pour induire l'expression du GZMB. Notre méta-analyse a permis d'identifier deux signatures transcriptomiques de 165 et 93 gènes spécifiques respectivement des Bregs humains et murins et soutient l'hypothèse d'une plasticité des lymphocytes B et d'une différenciation des Bregs en réponse à leur environnement. Ces travaux constituent une première étape vers la compréhension et l'utilisation de ces Bregs GZMB⁺.

Title : Regulatory B cell characterization and generation from pluripotent stem cells

Keywords : Regulatory B cells, Induced pluripotent stem cells, Embryonic stem cells, Meta-analysis, Gene expressions, Immune regulation.

Abstract : Regulatory B cells (Bregs) are key players in the immune response and are involved in various pathological situations. However, Bregs is a heterogeneous family with no consensual phenotype that has been proposed thus far rendering their study and their use in cell-based therapy or as biomarker very difficult. We identified a Breg subset able to block a T cell effector response in a Granzyme B (GZMB) production and in a cell contact dependent manner. The objectives of my thesis work, focused on GZMB⁺ Bregs study, were 1) to generate GZMB⁺ Bregs with a repressible GZMB expression, induced by genetic engineering, from pluripotent stem cells and 2) to better characterize these GZMB⁺ Bregs and their different described subsets by performing a transcriptomic meta-analysis.

While we obtained a low yield of B cells from stem cells, we improved the generation of CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitors, which appeared insufficient for B cell production. We found that the CD31^{int}CD45^{int} phenotype might enrich the progenitors suitable for B cell differentiation and we validated CRISPR/Cas9 tools needed for the first step of genetic modification leading to GZMB expression. Our meta-analysis identified two distinct and unique transcriptional signatures of 165 and 93 genes, respectively associated with human and mouse Bregs and support the hypothesis of B cells plasticity into Bregs which acquire their regulatory function under certain environmental conditions. This thesis work constitutes a first step in the understanding and for the use of these GZMB⁺ Bregs.