

Thèse de Doctorat

Justine DURAND

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie Médecine Santé
Spécialité : Immunologie
Unité de recherche : UMR Inserm U1064

Soutenue le 6 octobre 2014
Thèse N° :

Etude de lymphocytes B régulateurs dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

JURY

Rapporteurs : **Dr Flora ZAVALA**, Directeur de Recherche, Institut Necker, CNRS UMR8253 Paris
Dr Jacques-Olivier PERS, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, EA 2216 Brest

Examineur : **Dr Sophie BROUARD**, Directeur de Recherche, UMR Inserm U1064 Nantes

Directeur de Thèse : **Dr Elise CHIFFOLEAU**, Chargé de Recherche, UMR Inserm U1064 Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les docteurs Flora Zavala et Jacques-Olivier Pers pour avoir gentiment accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que le docteur Sophie Brouard d'avoir également examiné ce travail et d'avoir suivi l'évolution de ma thèse en étant membre de mon comité de suivi. Merci également au docteur Yves Delneste d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour le temps que vous m'avez accordé.

Je remercie le Dr Ignacio Anegon pour m'avoir accueillie au sein de l'unité U1064 durant ces 4 années pendant lesquelles j'ai pu bénéficier de divers moyens et techniques qui me serviront pour le reste de ma vie professionnelle j'en suis sûre.

Je remercie le Dr Cristina Cuturi pour m'avoir intégrée dans son équipe et le Dr Élise Chiffolleau pour m'avoir encadrée durant ces quatre années, merci pour ton soutien et la confiance que tu m'as accordée, en me faisant toujours voir le bon côté de mes résultats.

Merci encore à Manu et Claire, votre gentillesse et votre bonne humeur m'ont toujours aidé à supporter le fait de descendre assez souvent à l'animalerie malgré mon allergie.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé pour les manips et éclairé ma lanterne à un moment donné : Laurent T, Flora C, Laurence D, Aurélie M, Mercedes, Michèle, Cédric, Gaëlle B, Reynald, Séverine R, et tant d'autres... merci pour votre bonne humeur.

Merci à toutes (tous pardon) mes collègues de bureau encore présents ou déjà partis : Laure-Hélène (la pipelette), Gaëlle T (qui m'a supporté encore plus longtemps que tous les autres), Laura (mon espagnole préférée), Alison (la pro du nail art), Amélie (une de mes premières formatrices dans ce dur monde de la recherche), merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou moins scientifiques, qui m'ont toujours tenue au courant de tous les potins du labo ; Alexis, je te souhaite bon courage, pour ta thèse mais pas seulement (tu vois ce que je veux dire j'en suis sûre).

Merci à tous les membres de l'équipe 10 du début, à ceux déjà partis pour d'autres contrées : Laetitia LT (on fêtera bientôt ton retour), Antoine et Elo M (mes neurobio préférés : promis je prendrai de vos nouvelles très bientôt), Annie (ma coupine du dancefloor), Gaelle P (un petit trip à SD ou au Portugal s'impose), Laetitia L (notre mamie nationale) ; à ceux bientôt partis : Elo P (qu'aurais-je fait sans toi à mes côtés, que ce soit pendant les excellents moments forro ou les moments les plus tristes), Marion S (et tes petites marionnettes qui m'ont fait tant rire), Angie (ma super coloc, merci encore de m'avoir supportée dans les bons comme dans les mauvais moments), Mélanie C, Flora G, Athénaïs, aux piliers qui resteront toujours là coûte que coûte : Alex (notre maman à tous, merci pour tous ces bons moments partagés autour d'un verre ou autre), Mélanie N, Sév B (tu seras bien obligée de me prendre dans tes bras le jour de ma soutenance) et aux nouvellement arrivés : Michelle (good luck for the last year of thesis), Sabrina (mine de rien ça fait pas mal de temps qu'on se connaît ! bon courage avec les membres de ton bureau), Appo, Stéph, Elo A, Aurélie L, Jason (bon courage, il va vous en falloir j'en suis sûre). Merci pour tous ces verres/repas partagés avec vous, une super ambiance assurée à tous les coups !

Merci à Laura, Elo P, Sév B, JN, Sab, Seba, Roberto, Nico, Michelle, Nacho, Marco et les autres. Ces dîners internationaux ont été vraiment très enrichissants pour moi, que ce soit pour

la découverte des habitudes culinaires de chacun ou pour tout simplement de supers moments passés avec vous.

Merci à vous les filles Marie et Mélanie d'avoir été là même si on ne s'est pas beaucoup vu ces derniers temps, vous avez toujours été là pour moi. A vous aussi les miss fruits, j'ai nommé Soso, Popo et Génie (promis, je vais me rattraper et venir voir plus souvent les ptites bouilles). Merci à vous les filles Flo, Béné, Céline, Angie et Aurélie pour les verres en ville, les cinés et les soirées à la maison.

Merci à tous mes amis du forro, Véro, Anne, Caro, Camille, Elo, Estelle, Agnès et tous les autres, sans vous les derniers mois auraient été très difficiles. Même si je n'étais pas toujours de très bonne humeur, le fait de vous retrouver les mardis soirs m'aidait à supporter tout ça.

Et pour finir, je remercie de tout cœur ma famille qui m'a supportée pendant cette période pas forcément très facile à vivre tous les jours. Merci d'avoir été à mes côtés et de m'avoir poussée jusqu'ici. Papa, Maman, j'espère vous rendre fiers aujourd'hui. A mes sœurs chéries Popi et Alex, même si ce n'était de la façon dont je l'espérais, merci pour votre soutien et courage pour la suite de vos études. Merci enfin à toi Ahmed, tu as été ma bouffée d'air frais à un moment où je ne m'y attendais pas, merci d'avoir été là pour les bons comme pour les mauvais moments, tu as toujours su me faire rire en n'importe quelle occasion et me faire oublier les petits tracas du quotidien, j'espère que le destin nous laissera profiter de tout ça le plus longtemps possible.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION	7
I - LA TRANSPLANTATION	8
<i>A/Généralités</i>	8
<i>B/Limites de la transplantation</i>	8
1) Pénurie d'organes.....	8
2) Phénomènes de rejet.....	9
2.1. Le rejet hyper aigu.....	10
2.2. Le rejet aigu.....	10
2.3. Le rejet chronique.....	11
a) Les facteurs non-immunologiques	11
b) Les facteurs immunologiques	12
II-LA TOLERANCE EN TRANSPLANTATION	16
<i>A/Les mécanismes immunologiques de la tolérance</i>	16
1) Tolérance centrale	16
2) Tolérance périphérique.....	17
2.1. La délétion clonale/apoptose	18
2.2. L'anergie	19
2.3. La suppression.....	19
<i>B/Les stratégies d'induction de la tolérance en transplantation</i>	20
1) Les immunosuppresseurs	20
1.1. Les corticoïdes	20
1.2. Les immunosuppresseurs à petite molécule	20
1.3. Les immunosuppresseurs de type protéine	21
2) Le chimérisme hématopoïétique.....	27
3) Le blocage de la costimulation	28
4) L'inhibition de la migration cellulaire.....	30
5) L'induction et le transfert de cellules régulatrices	31
5.1. Les lymphocytes T régulateurs.....	32
a) Les Treg CD4 ⁺	33
b) Les Treg CD8 ⁺	35
c) Les Treg double négatives	35
d) Les cellules NKT	36
5.2. Les cellules dendritiques tolérogènes	36
5.3. Les macrophages régulateurs	37
5.4. Les Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC)	38
5.5. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC)	38
5.6. Les cellules B régulatrices.....	39
III- LE LYMPHOCYTE B, UN ACTEUR ESSENTIEL DE L'IMMUNITE	41
<i>A/Développement du lymphocyte B</i>	41
1) Le développement dans la moelle osseuse	41
2) L'activation dans la rate	42
3) Le lymphocyte B en périphérie/circulation	43
4) Les facteurs de transcription régulant la maturation des LB	45
<i>B/La fonction des anticorps</i>	47
1) Schéma d'un anticorps	47
2) Mécanismes d'action des anticorps en transplantation et stratégies d'intervention.....	48
2.1) Les LB : des acteurs importants du rejet de greffe	48
2.2) Le second rôle protecteur des LB et de leurs anticorps.....	50
<i>C/Emergence de lymphocytes B régulateurs</i>	52
1) Phénotype des LB régulateurs	53
1.1. Les Breg chez le rongeur.....	53
1.2. Les Breg chez l'Homme.....	55
2) Induction de LB régulateurs	57
2.1. Le CD40	57
2.2. Le BCR	58

2.3. Les Toll Like Receptors	59
3) Des LB régulateurs dans différents modèles	59
3.1. Les Breg en cancérologie	59
3.2. Les Breg en autoimmunité	60
a) Modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA)	62
b) Modèle de lupus.....	62
c) Modèle de sclérose.....	64
d) Modèle de diabète de type 1	64
3.3. Les Breg dans la tolérance à long terme.....	66
<i>D/Mécanismes de régulation des lymphocytes B.....</i>	<i>67</i>
1) Les anticorps naturels.....	67
2) La sécrétion d'interleukines 10 et 35.....	69
3) L'expression et la sécrétion de Granzyme B	72
4) L'expression de FasL et TRAIL : les LB « killers »	73
5) L'expression de PD-L1 et PD-L2.....	74
6) Les IgG sialylées	75
RESULTATS.....	78
I-MODELES D'ALLOGREFFES CARDIAQUES CHEZ LE RAT.....	79
A/Modèle de rejet chronique : DST.....	79
B/Modèle de tolérance : LF15-0195.....	81
1) Le LF15-0195	81
2) Etudes précédentes du modèle de tolérance	83
II-ETUDE DE LA REPOSE LYMPHOCYTAIRE B DANS LE MODELE DE TOLERANCE.....	86
DISCUSSION/PERSPECTIVES	118
I-CARACTERISATION DES BREG	119
A/Caractérisation phénotypique des LB régulateurs.....	119
B/Caractérisation fonctionnelle des Breg	123
II-EXPANSION DE LB IN VITRO ET ISOLEMENT DES LB AMPLIFIES	126
A/Expansion de LB in vitro.....	126
B/ Isolement des LB par des tétramères	128
C/Test de suppression in vitro	128
BIBLIOGRAPHIE.....	129
ANNEXES	163
A. ANNEXE 1 : LIMLE, A NEW MOLECULE OVER-EXPRESSED FOLLOWING ACTIVATION, IS INVOLVED IN THE STIMULATORY PROPERTIES OF DENDRITIC CELLS	164

LISTE DES ABBREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Antigène
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
AICD	Activation Induced Cell Death
AP-1	Activator Protein-1
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAFF	B cell-Activating Factor
BANK-1	B-Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1
BCL6	B cell lymphoma 6
BCR	B cell receptor
BLIMP-1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BLys	B-Lymphocyte Stimulator
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cells
Breg	Cellule B régulatrice
CD	Cluster de Différenciation
CIA	Arthrite induite par le collagène
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cell
DSA	Anticorps spécifiques du donneur
DSG	Déoxyspergualine
DST	Donor Specific Transfusion (= transfusion de sang du donneur)
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
Foxp3	Forkhead box P3
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GC	Centre germinatif
GITR	Glucocorticoid-Induced TNF-related Receptor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HO-1	Hème Oxygénase-1
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
IBD	Maladie inflammatoire intestinale
IDO	Indoléamine 2,3- Dioxygénase
IFN γ	Interféron-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IRF	IFN regulatory factor
IS	ImmunoSuppresseur
KO	Knock-Out

LB	Lymphocytes B
LT	Lymphocytes T
LEW	Lewis
LPS	Lipopolysaccharide
MAI	Maladie Auto-Immune
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
MLR	Mixed Leucocyte Reaction
MO	Moelle osseuse
MSC	Cellules stromales mésenchymateuses
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NF κ B	nuclear factor- κ B
NK	Natural killer
NOD	Non-Obese Diabetic
Nrp-1	Neuropilin-1
OLS	Organe Lymphoïde Secondaire
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed Death 1
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SLE	Lupus érythémateux systémique
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T Cell receptor
TGF β	Transforming Growth Factor-beta
Th	LT helper
TLR	Toll-Like Receptor
TLT	Tissu lymphoïde tertiaire
TNF α	Tumor necrosis Factor alpha
Treg	Cellule T régulatrice

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Schéma représentant les signaux d'activation du lymphocyte T lors d'une réponse immunitaire (exemple avec un lymphocyte B comme cellule présentatrice d'antigène).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 2 : Schéma représentant les différents isotypes d'immunoglobulines et les cytokines impliquées (d'après Sridhar Rao PN).....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 3 : Schéma représentant les différents mécanismes de la tolérance périphérique (d'après Walker et Abbas) (Walker and Abbas, 2002).....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 4 : Schéma représentant les modes d'action de différents immunosuppresseurs (d'après Halloran)(Halloran, 2004).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 5 : Schéma représentant les molécules de costimulation et leurs inhibiteurs (d'après Bedke et Stenzl) (Bedke and Stenzl, 2010).....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 6 : Schéma représentant les différentes cellules régulatrices et leurs cibles (d'après Wood) (Wood et al., 2012).....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 7 : Schéma représentant les réarrangements des gènes des chaînes des immunoglobulines (d'après Ollila et Vihinen) (Ollila and Vihinen, 2005).....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 8 : Schéma représentant le développement des lymphocytes B, de la moelle jusqu'en périphérie, et les différents marqueurs qu'ils expriment (d'après Pieper et al)(Pieper et al., 2013).</i>	<i>45</i>
<i>Figure 9 : Les gènes de régulation de la différenciation des lymphocytes B au sein des centres germinatifs (d'après Martínez et al)(Martínez et al., 2012).....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 10 : Représentation schématique d'un anticorps.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 11 : Le rôle ambivalent des lymphocytes B (d'après Thauinat et al)(Thauinat et al., 2010b).</i>	<i>52</i>
<i>Figure 12 : Schéma représentant les différentes sous-populations de lymphocytes B régulateurs chez la souris (d'après Stolp, Turka et Wood)(Stolp et al., 2014).....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 13 : Schéma représentant les différentes sous-populations de lymphocytes B régulateurs dans le sang périphérique chez l'Homme (d'après Stolp, Turka et Wood)(Stolp et al., 2014).....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 14 : Schéma représentant le développement des lymphocytes B effecteurs et régulateurs (d'après Clatworthy)(Clatworthy, 2011).....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 15 : Schéma représentant les différents mécanismes de régulation des lymphocytes B (d'après Klinker et Lundy)(Klinker and Lundy, 2012).....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 16 : Schéma représentant les différents modèles de tolérance et de rejet chronique à l'allogreffe cardiaque chez le rat dans mon projet.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 17 : Images représentant les lésions et l'infiltration cellulaire dans des greffes cardiaques (J100) syngéniques (Syng), en rejet chronique (CR) ou tolérées (Tol) à partir de Heslan et al. (Heslan et al., 2006a).....</i>	<i>81</i>

Figure 18 : Expression de l'ARNm de la chaîne constante de l'IgG dans des greffons de rats tolérants (Tol) en rejet chronique (CR) ou syngéniques (Syng) (Heslan et al, 2006)..... 85

INTRODUCTION

I - La transplantation

A/Généralités

Actuellement, la greffe d'organes ou de cellules constitue un moyen thérapeutique efficace pour pallier les dysfonctionnements d'organes vitaux (cœur, foie, rein, poumon, ...), ou bien dans certains cas de cancers (moelle osseuse). Il existe différents types de greffes, définis par le degré d'identité génétique entre le donneur et le receveur. Les greffes syngéniques sont réalisées entre individus génétiquement identiques. Chez l'Homme, ce cas est rencontré lors de greffes autologues, c'est-à-dire, lorsqu'un patient reçoit une greffe de tissus ou de cellules dérivées de son propre organisme ou plus rarement, dans le cas d'isogreffe qui a lieu entre de "vrais" jumeaux. Ce type de greffe est habituellement bien accepté par le système immunitaire du receveur pour lequel la greffe ne constitue pas un élément étranger. Lorsque la greffe a lieu entre des individus génétiquement différents mais d'une même espèce, on parle d'allogreffe. Enfin, la xéno greffe correspond à la greffe réalisée entre deux espèces différentes comme dans le cas de greffe de tissu porcine chez l'Homme. Dans ces deux derniers cas, la greffe est considérée comme étrangère par l'organisme (c'est le « non-soi ») et entraîne une réponse immunitaire qui vise à la détruire. Cependant, dans le cas de la xéno greffe, la très grande disparité génétique entre le receveur et le donneur donne lieu à une réponse immunitaire plus forte.

B/Limites de la transplantation

1) Pénurie d'organes

Ces dernières années, des avancées remarquables ont été réalisées non seulement sur la connaissance des mécanismes de rejet et l'amélioration des techniques chirurgicales, mais également sur l'optimisation de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs, qui ont toutes contribué à améliorer la qualité de vie des patients transplantés. Ces progrès ont fait de la transplantation une thérapeutique de choix. En France en 2013, près de 18 000 malades étaient en attente d'une greffe d'organe, chiffre qui ne cesse d'augmenter depuis 1997. Pourtant, seulement 5 123 d'entre eux ont été greffés (données de l'Agence de la Biomédecine). Ces chiffres sont révélateurs de la pénurie d'organes à laquelle nous faisons face. En effet, les besoins ne cessent d'augmenter sans que le nombre d'organes disponibles n'augmente. En 2013 par exemple, le nombre de candidats en attente d'un greffon cardiaque

était de 2.1 pour seulement un greffon disponible. La grande majorité des greffons sont prélevés sur des donneurs décédés de mort encéphalique (77%) en comparaison avec des donneurs vivants (20%) ou des donneurs décédés après un arrêt cardiaque (3%), et dont l'âge moyen en France est de 56,6 ans, avec plus de 37% des donneurs âgés de plus de 65 ans. En France en 2013, 3 336 sujets en état de mort encéphalique ont été recensés. Cependant, après opposition de la famille du défunt ou du défunt lui-même de son vivant, ou après obstacle médical pour « antécédents du donneur », seuls 1 627 d'entre eux ont été prélevés d'au moins un organe et 1 579 greffons viables ont été transplantés. En effet, certains donneurs sont récusés notamment à cause de facteurs de risques d'échec de la greffe qui sont nombreux (hypertension artérielle, diabète, créatinémie élevée,...) ou de l'apparition de différentes pathologies entre le moment du recensement et celui du décès, comme par exemple des maladies tumorales, infectieuses ou neurodégénératives. De plus, bien qu'il ne soit plus un frein pour les greffes hépatiques (55,7 d'âge moyen) ou rénales (54,8), l'âge du donneur représente un risque de non-prélèvement pour les greffes de cœur (42,3) et poumons (46,4 d'âge moyen) (Agence de la biomédecine). C'est pourquoi la xénotransplantation et la greffe de tissus composites sont des stratégies thérapeutiques de plus en plus envisagées sur lesquelles les chercheurs travaillent actuellement. De plus, un organe greffé n'est pas toujours accepté à long terme par le système immunitaire du patient (c'est le rejet de greffe) et entraîne donc la nécessité pour certains patients de recevoir plusieurs greffes au cours de leur vie. La pénurie d'organes rend alors chaque organe prélevé très précieux et souligne le fait qu'il doit être préservé dans les meilleures conditions et être utilisé le plus rapidement possible. L'induction de tolérance des greffons à long terme pourrait ainsi permettre d'éviter à une même personne de se retrouver plusieurs fois en attente de greffe et ainsi contribuer à diminuer le nombre de personnes en liste d'attente. L'objectif de notre recherche est donc de trouver des solutions thérapeutiques pour prolonger au maximum la durée de vie des greffons.

2) Phénomènes de rejet

Le rôle du système immunitaire est de protéger l'organisme contre les pathogènes. Pour cela, il est capable de distinguer le "soi" du "non-soi" (Janeway, 1992) et ainsi d'éliminer ce qui est alors reconnu comme étranger. Les greffes étant principalement réalisées entre individus génétiquement différents, le système immunitaire du receveur va considérer comme étranger les cellules, le tissu ou l'organe du donneur et va s'employer à le détruire, c'est le phénomène de rejet. Il existe différents types de rejets qui se distinguent par les

réactions immunologiques mises en cause et par leur cinétique d'apparition. Les différents rejets survenant suite à la greffe sont le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique.

2.1. Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu intervient dans les heures voire les minutes qui suivent la greffe. Il est dû à la présence d'anticorps (Ac) préexistants dans le sérum du receveur. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes du système ABO ou les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) du donneur. La présence de ces Ac est généralement due à une précédente transplantation, une transfusion sanguine ou une immunisation lors d'une grossesse. Ces anticorps vont se fixer sur les cellules endothéliales du greffon, activer la voie classique du complément et attirer les granulocytes neutrophiles qui libèrent des enzymes lytiques. Les cellules endothéliales sont alors détruites, les plaquettes adhèrent au tissu lésé et provoquent une thrombose des vaisseaux, ce qui entraîne la nécrose du greffon. Ce type de rejet est devenu rare, de par l'optimisation de la compatibilité des systèmes ABO et HLA entre donneur et receveur (test du crossmatching réalisé en pré-transplantation). En revanche, il survient toujours dans le cas de xéno greffes. Ce type de greffe étant une solution envisagée pour faire face à la pénurie d'organes, le rejet hyper aigu continue d'être le sujet de nombreuses études.

2.2. Le rejet aigu

Le rejet aigu est la principale cause de la perte du greffon en allogreffe et prend place dans les premières semaines à premiers mois suivant la greffe. Il peut être induit par une réponse immunitaire à médiation cellulaire. En effet, les cellules présentatrices d'antigènes (APC) du donneur ou du receveur induisent l'activation des cellules T alloréactives du receveur (Lechler and Batchelor, 1982)(Benichou et al., 1992), qui vont alors sécréter des molécules pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$ ou l' $IFN\gamma$ (Wu et al., 1992) et permettre le recrutement de macrophages au niveau du greffon, qui vont à leur tour sécréter du $TNF\alpha$ ou des radicaux libres et activer les cellules endothéliales et cellules NK (Natural Killer). Les lymphocytes T (LT) cytotoxiques vont ensuite détruire le greffon via l'activation de la voie Fas/FasL ou par l'exocytose de perforines et granzymes (Krupnick et al., 2002).

La réponse à médiation humorale via la production d'Ac par les lymphocytes B (LB) peut également jouer un rôle important dans le rejet aigu. Une fois activés, les LB vont se différencier en plasmocytes et produire des anticorps dirigés contre les antigènes du donneur,

qui vont alors se fixer sur les cellules endothéliales, activer le complément et contribuer ainsi à la destruction du greffon (Saadi et al., 1995)(Hippen et al., 2005).

Grâce aux avancées sur la connaissance des mécanismes immunologiques mis en jeu lors de ce rejet et donc, grâce à l'utilisation adaptée de différents types de traitements immunosuppresseurs (IS), le rejet aigu est actuellement bien contrôlé. Par exemple, le taux de survie à un an des greffes rénales n'a cessé d'augmenter depuis les années 1980 en passant de 83% à plus de 91% aujourd'hui (données de l'Agence de la Biomédecine 2013). Malgré cela, la survie à long terme des greffons n'a quant à elle pas été améliorée par ces IS, ceux-ci pouvant même contribuer à la perte du greffon à long terme en raison de leur toxicité (Bennett et al., 1996)(Nankivell et al., 2003). De plus, ils ne permettent pas d'éviter le rejet chronique qui est la cause principale de la perte du greffon 5 à 10 ans après la greffe. Ceci explique un faible taux de survie du greffon qui ne dépasse pas 63% pour les greffes rénales ou 53% pour les greffes cardiaques (données de l'Agence de la Biomédecine 2013).

2.3. Le rejet chronique

Le rejet chronique peut survenir des mois voire des années après la greffe. Il se manifeste par une occlusion lente et progressive des vaisseaux par artériosclérose, entraînant une ischémie responsable de la nécrose et de la fibrose du greffon. Ce phénomène induit l'altération de la fonction du greffon au cours du temps. Les mécanismes induisant le rejet chronique sont encore mal connus et font intervenir à la fois des réponses immunitaires innée et adaptative, mais différents facteurs de risques immunologiques et non immunologiques associés à ce rejet ont été identifiés.

a) Les facteurs non-immunologiques

En effet, parmi ces facteurs non-immunologiques, une augmentation du risque de rejet du greffon a été démontrée lorsque l'organe provient d'un donneur décédé (Terasaki et al., 1995)(Sánchez-Fructuoso et al., 2007). La mort cérébrale entraîne différentes réactions immunologiques conduisant à l'activation de l'endothélium, qui exprime alors des molécules d'adhésion (E- et P-sélectines, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), LFA-1 (Leucocyte-Function-Associated Molecule 1)), des molécules du CMH de classe II et produit des cytokines pro-inflammatoires (Wilhelm et al., 2002). Ceci va favoriser l'infiltration des leucocytes au sein du greffon et augmenter le risque de dysfonctionnement à long terme (Pratschke et al., 2008).

De même, l'administration de Cyclosporine A (Islam et al., 2001), un immunosupresseur anti-calcineurine, cause une néphrotoxicité médiée par la production de TGF β qui va favoriser la fibrose (Cohen and Nast, 1998). De plus, l'acte chirurgical en lui-même peut influencer le rejet. Il peut en effet être à l'origine du phénomène d'ischémie-reperfusion dont les conséquences favorisent l'apparition de rejet chronique (Chin et al., 2011). L'ischémie correspond à une privation d'oxygène due à une diminution de l'apport sanguin dans le greffon durant l'acte chirurgical. L'ischémie et la reperfusion de l'organe greffé induisent une hypoxie cellulaire aboutissant à la génération de dérivés de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) appelés "Reactive Oxygen Species" (ROS). Ces dérivés provoquent une attaque oxydative des cellules du greffon entraînant la nécrose, l'apoptose cellulaire ainsi que la libération de DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) tels que les protéines de choc thermique appelées "Heat Shock Protein" (Hsp). Les DAMPs se lient alors aux récepteurs de l'immunité innée, les "Toll like Receptor" (TLR), exprimés à la surface et dans les endosomes des cellules endothéliales vasculaires, des monocytes et des cellules dendritiques (DC) du greffon. L'activation de ces cellules via la stimulation des TLR va entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, ainsi que l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium. Ces molécules vont favoriser, une fois de plus, le recrutement des leucocytes sur le site de la greffe en créant un environnement inflammatoire (Goldstein, 2006). Certaines études mettent en évidence le rôle majeur du TLR4 dans le phénomène d'ischémie-reperfusion montrant l'absence de lésions chez les rats "Knock Out" (KO) pour le TLR4 (Zhao et al., 2009). La liaison du ligand sur le TLR va induire l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF κ B (nuclear factor- κ B), AP-1 (activating protein-1), et IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) impliqués dans l'inflammation et notamment dans la maturation des DC. Les DC présentes dans le greffon vont alors être activées puis devenir matures et servir de relai pour activer la réponse immunitaire adaptative.

b) Les facteurs immunologiques

Parmi les facteurs immunologiques, l'alloréactivité des cellules T, la production d'Ac dirigés contre les greffons et l'activation des cellules endothéliales semblent jouer un rôle clé dans le rejet chronique (Takeda et al., 2011). En effet, dans les un ou deux jours suivants l'exposition à l'antigène, les LT CD4⁺ naïfs reconnaissent l'antigène présenté par des APC professionnelles dans la zone T des organes lymphoïdes, déclenchant ainsi les mécanismes de

la réponse immunitaire adaptative. Les LB qui reconnaissent aussi l'antigène dans le follicule s'activent et sortent du follicule vers la zone T. La rencontre initiale entre les LT et LB activés spécifiques de l'antigène a donc lieu à l'interface entre les follicules et la zone T. Cet événement se déroule en moyenne dans les trois à sept jours suivant l'exposition à l'antigène. Les LB se lient alors à leur antigène via leur récepteur de surface Ig (Immunoglobuline), l'internalisent (via l'endocytose médiée par les récepteurs) et le découpent en plus petits fragments dans des vésicules endosomales. Les fragments peptidiques de l'antigène sont alors présentés à leur surface sous forme de complexes [peptides-CMH de classe II]. Les anticorps qui sont alors produits sont spécifiques des déterminants conformationnels de l'antigène. Un LB unique peut alors lier et endocyter un seul antigène, et présenter différents peptides complexés avec des molécules de CMH de classe II à de nombreux LT. La réponse anticorps qui en découle reste spécifique de l'antigène natif. La liaison spécifique du LT au LB, ou plus largement à n'importe quelle APC, via la reconnaissance du complexe CMH-peptide présenté par l'APC par le TCR (T cell receptor) du LT, représente le premier signal d'activation pour le LT (*Figure 1*).

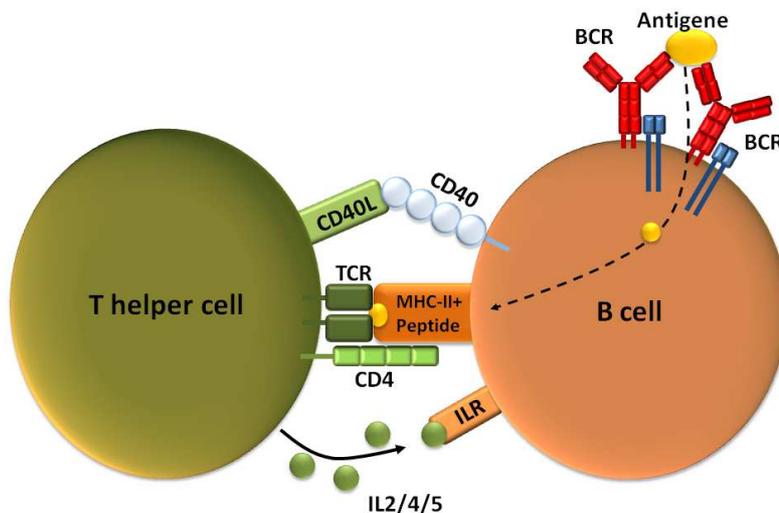


Figure 1 : Schéma représentant les signaux d'activation du lymphocyte T lors d'une réponse immunitaire (exemple avec un lymphocyte B comme cellule présentatrice d'antigène)(d'après Janeway, Immunologie 2002)

La liaison de l'antigène aux Ig membranaires augmente alors l'expression de co-stimulateurs à la surface des LB. Lors de la phase de fragmentation de l'antigène internalisé, les LB expriment également les molécules de co-stimulation B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). Les LT helper (Th) qui reconnaissent les complexes CMH-peptide exprimés par les LB se lient également à ces molécules B7 via la molécule CD28 qu'ils expriment à leur surface et sont induits à proliférer ; c'est le deuxième signal d'activation. Une fois activés par la reconnaissance de l'antigène et les molécules de co-stimulation, les LT expriment à leur surface le CD40L (CD154), qui se lie alors à la molécule CD40 exprimée par les LB. Cet engagement conduit alors à l'initiation d'une cascade enzymatique menant à la transcription de différents gènes. La liaison CD40-CD40L conduit également à l'augmentation de l'expression des molécules B7 à la surface des LB, induisant ainsi une activation plus importante des LT.

Enfin, la reconnaissance de l'antigène par les LB augmente l'expression de récepteurs pour les cytokines. Les Th activés sécrètent alors des cytokines qui stimulent la prolifération des LB ; c'est le troisième signal d'activation. Les cytokines ont deux fonctions principales lors des réponses anticorps. Elles favorisent tout d'abord l'amplification de la réponse par la prolifération et la différenciation des LB, puis elles déterminent le type d'anticorps produits en induisant la recombinaison isotypique des Ig (CSR). Les anticorps sécrétés initialement sont d'isotype IgM (chaîne lourde μ). En réponse à l'engagement du CD40 et des cytokines, certains des LB activés subissent le processus de recombinaison isotypique de la chaîne lourde. Ceci mène à la production d'anticorps avec des chaînes lourdes de différentes classes comme γ (IgG), α (IgA) et ϵ (IgE). L'isotype IgD (chaîne lourde δ) sécrété est très rare et n'est donc pas retrouvé dans le plasma (« The Elements of Immunology », Khan 2009). En dehors du signal médié par le CD40, les cytokines jouent également un rôle important dans la régulation de cette recombinaison des chaînes des Ig (*Figure 2*). Par exemple, l'IL-4 induit la plupart du temps le switch en IgE. De nombreuses cytokines qui régulent le switch des Ig sont sécrétées par différentes sous-populations de Th qui sont générés en réponse à des types distincts de microbes. Le TGF β qui est produit par différents types cellulaires, associé à l'IL-5 sécrétée par les LT, stimule préférentiellement la production d'IgA dans les tissus lymphoïdes des muqueuses, induisant une immunité locale. Les cytokines peuvent aussi avoir des fonctions antagonistes. Par exemple, l'IFN γ inhibe le switch en IgE médié par l'IL-4. En effet, différentes études ont associé les cellules T effectrices de type Th1 et Th2 au rejet chronique (Illigens et al., 2009; Obata et al., 2005), par

le biais de cytokines favorisant la production d'anticorps chez les patients transplantés, alors synonyme d'un mauvais pronostic pour la survie des greffons à long terme (Piazza et al., 2001). La fixation de ces anticorps sur les cellules endothéliales du greffon est à l'origine de lésions vasculaires observées lors du rejet chronique (Li et al., 2009). De plus, il a été démontré que la survenue d'épisodes de rejet aigu augmente le risque d'apparition du rejet chronique (Matas et al., 1994).

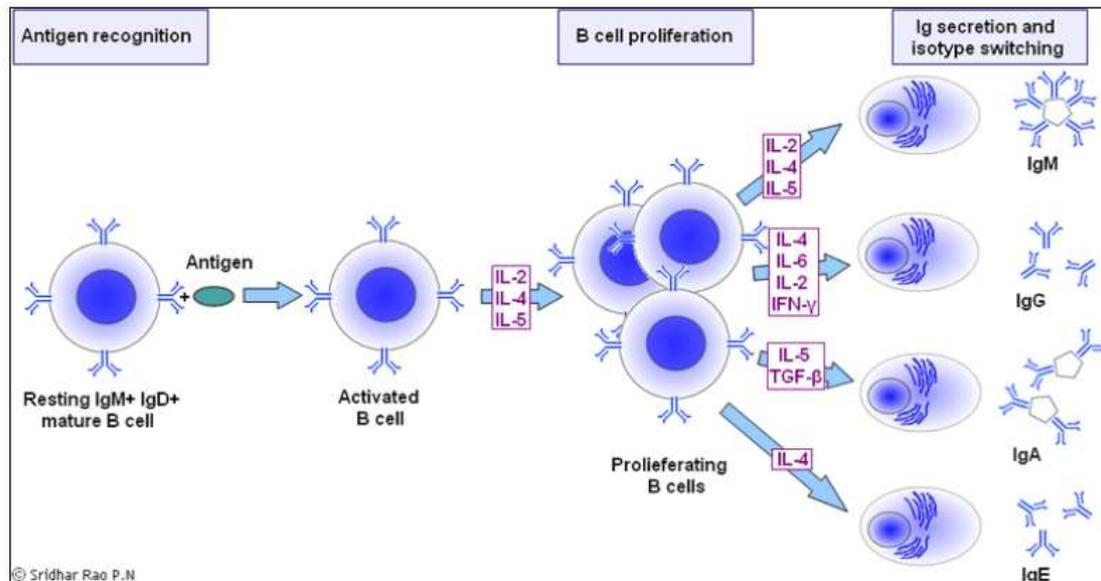


Figure 2 : Schéma représentant les différents isotypes d'immunoglobulines et les cytokines impliquées (d'après Sridhar Rao PN).

En transplantation, la réponse à médiation humorale est une composante majeure du rejet d'allogreffe (Colvin and Smith, 2005). Elle est observée précocement lors du rejet hyper aigu induit par la présence d'anticorps anti-donneur, les DSA, préformés avant la greffe. Plus tardivement, elle peut participer au rejet aigu et au rejet chronique (Terasaki and Cai, 2008) via la formation d'anticorps anti-donneur générés post-greffe, les DSA de novo, et principalement dirigés contre les molécules du CMH du donneur. En clinique, la présence de DSA est généralement associée à un mauvais pronostic de la survie de la greffe (Haririan et al., 2009; Piazza et al., 2001). Ces anticorps dirigés contre les cellules du greffon vont générer une toxicité et induire le rejet. Le contexte immunologique d'une greffe est très spécifique car les allo-antigènes sont présents en permanence. Ils entraînent une stimulation continue des LB et notamment des cellules mémoires qui peuvent donc également être responsables du maintien de la production de DSA.

II-La tolérance en transplantation

La tolérance se définit par l'acceptation du greffon avec le maintien des capacités à induire une réponse immune contre d'autres pathogènes, et ce en absence d'immunosuppresseurs. La possibilité d'induire une tolérance en transplantation fut démontrée pour la première fois par Billingham, Brent et Medawar en 1953 (Billingham et al., 1953). Ils mirent en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe de peau chez la souris en exposant le receveur aux antigènes du donneur au stade fœtal. Par la suite, de nombreux autres modèles animaux permirent de démontrer la possibilité d'induire une tolérance en transplantation. Les premiers outils disponibles afin d'établir cette tolérance, ou d'au moins limiter les réponses immunitaires, ont été différents types de traitements immunosuppresseurs.

A/Les mécanismes immunologiques de la tolérance

La tolérance en immunologie se définit par la non-réponse du système immunitaire à un antigène. Le système immunitaire est constamment en équilibre entre la tolérance aux antigènes du soi et la réponse aux éléments extérieurs dits du « non-soi » (pathogènes, antigènes étrangers). En transplantation, la tolérance à une allogreffe se définit par l'acceptation du greffon sans signe de rejet en l'absence de traitement immunosuppresseur, et ce tout en conservant des réponses immunes vis-à-vis des pathogènes et autres antigènes étrangers. L'induction de la tolérance en transplantation se base principalement sur la connaissance des mécanismes de tolérance immunologique. Deux types de tolérance existent : la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

1) Tolérance centrale

La tolérance centrale met en jeu des mécanismes ayant pour objectif l'élimination de cellules T et B autoréactives, c'est-à-dire capables de reconnaître les antigènes du soi.

Pendant le développement des lymphocytes T et B, ayant lieu respectivement dans le thymus et la moelle osseuse, les réarrangements des gènes du récepteur de ces lymphocytes (TCR pour les LT et BCR (B cell receptor) pour les LB) permettent de générer un nombre très important de récepteurs différents capables de reconnaître l'ensemble des structures antigéniques, y compris les antigènes du soi. En effet, ces récepteurs sont le résultat d'un phénomène aléatoire conduisant au réarrangement somatique des gènes codant pour les

chaînes qui les composent. Le réarrangement des gènes dépendant des enzymes RAG (recombination activating gene) a lieu entre les différents segments V, D, J, C (Variable, Diversité, Jonction, Constante) qui codent pour les régions variables et constantes de ces récepteurs. La reconnaissance de l'antigène par les récepteurs TCR et BCR se réalise via leur région variable. Alors que le BCR des LB est capable de reconnaître un Ag non modifié, le TCR ne peut interagir qu'avec un Ag apprêté et présenté sur un CMH porté par une APC. Ainsi, la première étape de sélection des lymphocytes T est basée sur cette première contrainte. Dans un premier temps, seuls les précurseurs des LT (thymocytes) capables de se lier avec suffisamment d'affinité à un complexe CMH/peptide, présenté par l'épithélium et les cellules dendritiques, reçoivent un signal de survie : c'est la sélection positive. Les thymocytes ayant survécu migrent ensuite dans la medulla où ils sont mis en présence de peptides du soi complexés avec les molécules du CMH. Les cellules dont le TCR agit fortement avec les antigènes du soi vont générer des signaux apoptotiques et mourir, on parle de sélection négative. Les lymphocytes vont ensuite pouvoir se différencier progressivement pour devenir matures et migrer en périphérie du thymus.

2) Tolérance périphérique

Certains lymphocytes auto-réactifs échappent à la sélection réalisée dans les organes lymphoïdes primaires. La tolérance centrale ne suffisant alors pas au maintien d'une « non-réponse » du système immunitaire contre les antigènes du soi, d'autres mécanismes de tolérance dite périphérique interviennent (Bouneaud et al., 2000). Leurs rôles sont non seulement d'empêcher la réponse auto-immune mais également de limiter les réponses immunitaires trop intenses contre des antigènes étrangers. La tolérance périphérique permet d'éviter l'induction d'une réponse disproportionnée et non justifiée afin d'empêcher l'apparition de MAI, d'allergie, d'asthme... De même, elle est nécessaire à la mise en place d'une tolérance foëto-maternelle et d'une tolérance orale. Différents mécanismes de tolérance périphérique ont ainsi été décrits (*Figure 3*).

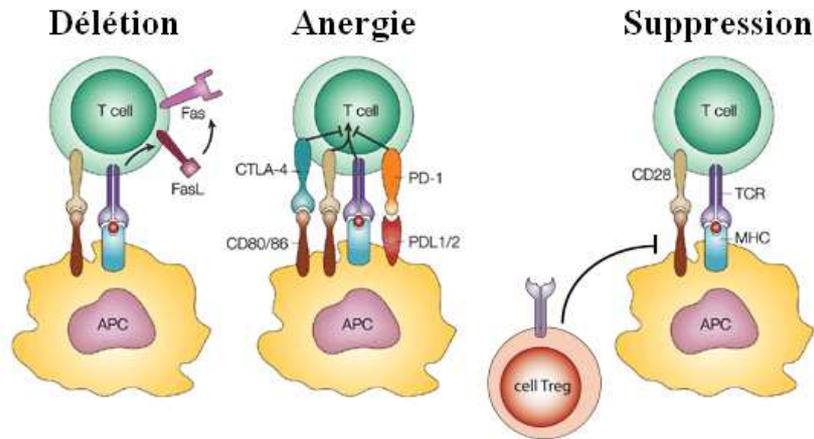


Figure 3 : Schéma représentant les différents mécanismes de la tolérance périphérique (d'après Walker et Abbas)(Walker and Abbas, 2002)

2.1. La délétion clonale/apoptose

Ce mécanisme utilisé lors de la sélection négative au niveau central peut aussi avoir lieu en périphérie. Il consiste à éliminer les cellules autoréactives en entraînant leur mort par apoptose. La délétion des lymphocytes a lieu lors de la rencontre avec son antigène dans un contexte particulier (Kabelitz et al., 1993). Pour les lymphocytes T, l'apoptose est notamment induite lorsqu'ils sont privés de facteurs de croissance comme l'IL-2. En effet, l'IL-2 permet l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-xl nécessaires à la survie des cellules T (Schimpl et al., 2002). Les LB autoréactifs activés ne rencontrent généralement pas de lymphocytes T de spécificité antigénique identique. Ils ne reçoivent donc pas les signaux de survie fournis par l'interaction avec ces cellules et rentrent alors en apoptose (Cyster et al., 1994). De plus, suite à des stimulations allogéniques répétées ou à une forte concentration antigénique, l'IL-2 peut entraîner l'expression de FasL (Li et al., 2000), qui va se lier au Fas constitutivement exprimé et provoquer la mort des lymphocytes T par «mort cellulaire induite par l'activation» (AICD) (Förster et al., 1995)(Brunner et al., 1995). Cette voie Fas/FasL permet également d'éliminer les LB autoréactifs qui, dans de rares cas, rencontrent les lymphocytes T de même spécificité auto-antigénique. L'interaction avec la cellule T, en absence de la costimulation CD86-CD28, entraîne alors la mort de la cellule B (Rathmell et al., 1996, 1998).

2.2. L'anergie

L'anergie est caractérisée par l'incapacité fonctionnelle des lymphocytes à être réactivés par leur antigène (Jenkins and Schwartz, 1987)(Schwartz, 1996). Cet état d'anergie peut être dû à une activation incomplète du lymphocyte lors du premier signal, soit, pour le lymphocyte T, lorsqu'il reconnaît l'antigène présenté sur un CMH par une APC, résultant de l'absence du deuxième signal d'activation (costimulation). Les cellules anergiques sont incapables de proliférer et de produire de l'IL-2 (Schwartz, 1990). En revanche, l'anergie peut être levée par l'apport d'IL-2 à ces cellules (Essery et al., 1988). L'anergie semble aussi dépendre des molécules de costimulation inhibitrices telles que le CTLA-4. En effet, son absence dans des cellules T transgéniques CTLA-4^{-/-} rend ces dernières réfractaires à l'induction d'anergie par une stimulation antigénique via des APC exprimant faiblement la molécule de costimulation B7 (Greenwald et al., 2001). L'anergie des cellules B autoréactives est due à une désensibilisation du BCR suite à une stimulation chronique par l'autoantigène (Yarkoni et al., 2010). En transplantation, l'induction de tolérance via l'anergie a pu être démontrée dans un modèle de primate non humain (Bashuda et al., 2005). Dans cette étude, des cellules T du receveur sont rendues anergiques via le contact *in vitro* avec des APC du donneur et en présence d'anticorps bloquant la liaison entre les molécules de costimulation CD28 et B7. Les primates splénectomisés reçoivent une greffe rénale CMH de classe I et II incompatible et les immunosuppresseurs Cyclosporine A et Cyclophosphamide leur sont administrés pendant 13 jours. Au treizième jour post-greffe, les cellules T anergiques leur sont injectées par voie intraveineuse et une tolérance à long-terme est observée chez tous les receveurs.

2.3. La suppression

À la différence des autres mécanismes de tolérance, celui-ci fait intervenir une population de cellules dites régulatrices qui, via des propriétés suppressives, va agir sur la population de cellules à réguler. La régulation ou la suppression est donc un phénomène actif dépendant de la production de cytokines ou d'un contact cellulaire, et permet d'inhiber l'activation ou la fonction des cellules effectrices. Le concept de suppression induit par des cellules T capables d'inhiber d'autres cellules est apparu dans les années 1970 (Gershon and Kondo, 1970, 1971)(Gershon et al., 1972). Aujourd'hui, les cellules dites régulatrices ont été et sont toujours largement étudiées du fait de leur implication en transplantation mais aussi dans d'autres pathologies telles que les MAI, les allergies ou les cancers. Depuis, de

nombreuses cellules régulatrices ont été décrites. Certaines sont présentes naturellement dans l'organisme comme les nTreg, et d'autres sont induites en périphérie lors de l'activation de la réponse immunitaire afin de limiter son intensité ou même de l'inhiber.

B/ Les stratégies d'induction de la tolérance en transplantation

1) Les immunosuppresseurs

L'objectif des IS est de diminuer la réponse immunitaire du receveur afin d'empêcher l'attaque du greffon par les cellules de son propre système immunitaire. Il existe différents IS qui se distinguent par leur mode d'action. La réponse allogénique des lymphocytes jouant un rôle clé dans le processus de rejet, les principaux IS ont pour cibles les lymphocytes T et B du système immunitaire. Ces traitements IS provoquent alors un état de non-réponse immunitaire envers le greffon en déplaçant ou en bloquant la prolifération cellulaire des lymphocytes (Halloran, 2004) (*Figure 4*). D'autres molécules dont l'objectif est la prévention du rejet aigu par le blocage des signaux cellulaires entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène sont utilisées au long cours comme traitement d'entretien.

1.1. Les corticoïdes

Les corticoïdes, analogues d'hormones naturelles aux propriétés anti-inflammatoires, agissent en inhibant la transcription de cytokines par les lymphocytes T et les macrophages. Ils sont classiquement utilisés comme traitement d'entretien en association avec les inhibiteurs de calcineurines.

1.2. Les immunosuppresseurs à petite molécule

Les inhibiteurs de calcineurines (la Cyclosporine A ou le Tacrolimus) empêchent l'activation des promoteurs des gènes codant pour des cytokines comme l'IL-2, nécessaire à la survie et la prolifération des lymphocytes T (Brandt et al., 2010).

Les inhibiteurs de mTOR (mammalian target of rapamycin) (Sirolimus, Rapamycine) agissent quant à eux en inhibant l'enzyme de la famille des sérines/thréonines kinases, mTOR, empêchant la prolifération des lymphocytes induite par les cytokines et prévenant ainsi du rejet aigu.

Les inhibiteurs de purines (Azathioprine, Mycophénolate Mofetil (MPA)) ou les inhibiteurs de bases pyrimidiques (Leflunomide) inhibent également la prolifération des lymphocytes T et B ainsi que celle des monocytes.

1.3. Les immunosuppresseurs de type protéine

Les lymphocytes étant les acteurs majeurs du rejet, ils représentent actuellement la cible principale des traitements immunosuppresseurs utilisés chez les patients transplantés. Les traitements déplétants comme l'ATG (anti-thymocyte globulins), l'OKT3 (anti-CD3) qui induit une déplétion partielle des LT, ou le Rituximab (anti-CD20) qui déplete les LB, sont généralement utilisés comme traitement d'induction, c'est-à-dire, juste après la greffe (parfois avant) afin d'induire une immunosuppression intense et rapide au moment où la réponse immunitaire du receveur est la plus forte.

Les anticorps polyclonaux (ATG = anti-thymocyte globulins) induisent une déplétion lymphocytaire en ciblant différentes populations de lymphocytes. En revanche, les anticorps monoclonaux agissent sur des populations plus spécifiques. Par exemple, l'OKT3 (Muromonab, anti-CD3), le Rituximab (anti-CD20) et le Campath-1H (Alemtuzumab, anti-CD52) déplètent respectivement les lymphocytes T, les lymphocytes B ou les deux à la fois. Ces anticorps sont classiquement utilisés comme traitement d'induction lors de greffes présentant un risque accru de rejet.

L'ATG est l'un des plus anciens traitements déplétants utilisés. Il est constitué d'Ig purifiées à partir du sérum d'animaux (lapin, cheval) immunisés avec des lymphocytes humains. L'ATG fait actuellement l'objet d'une étude clinique par Markmann et ses collègues. Cette étude consiste à tester l'efficacité de l'utilisation de l'ATG et du Rituximab pour inhiber le rejet d'allogreffes lorsqu'ils sont associés temporairement à des inhibiteurs de calcineurines.

L'utilisation de l'anticorps anti-CD3 (OKT3) chez la souris diabétique a révélé des résultats très prometteurs, où le traitement induit l'expansion de Treg Foxp3⁺ par un mécanisme TGFβ-dépendant (You et al., 2007). Toutefois, bien qu'efficace pour l'inhibition du rejet aigu des greffes de rein, de foie et de cœur, ce traitement peut entraîner de nombreux effets indésirables comme l'induction du syndrome inflammatoire, déclenché par le relargage de cytokines par les lymphocytes T ciblés par l'anticorps. L'OKT3 est donc utilisé exceptionnellement, par exemple lors de rejets résistants aux corticoïdes. Cependant, de nouveaux anticorps anti-CD3 modifiés pour éviter la réponse inflammatoire ont été générés,

comme le Teplizumab. Celui-ci a permis d'obtenir des résultats très encourageants lors d'essais cliniques de phase II/III chez des patients atteints de diabète de type 1 (Hagopian et al., 2013). Une étude de l'équipe de Bluestone a démontré que l'anti-CD3 muté agissait différemment sur les sous-populations de LT, notamment en déléant les LT activés $CD4^+$ $Foxp3^-$ et en privilégiant alors un enrichissement en Treg $Foxp3^+$, qui sont résistants à l'apoptose (Penaranda et al., 2011). Des études réalisées par l'équipe de You ont démontré que le moment de l'administration du traitement était un point important à prendre en compte pour l'efficacité de celui-ci. En effet, l'administration de l'OKT3 sept jours après une allogreffe d'ilots pancréatiques chez la souris diabétique a permis d'induire une tolérance à long terme chez plus de 80% des souris receveuses, alors que l'induction de cette tolérance était diminuée de moitié lorsque l'anti-CD3 était injecté directement après la greffe (You et al., 2012). Il ne permet cependant pas de guérir définitivement de cette maladie (Keymeulen et al., 2010)(Sherry et al., 2011)(Herold et al., 2013).

L'anti-CD20 (Rituximab) permet de dépléter l'ensemble des LB à l'exception des plasmocytes qui n'expriment pas le CD20 à leur surface. La fixation de l'anticorps sur le CD20 induit une cascade d'activation du complément, une reconnaissance par les macrophages et les NK, menant à la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) (Taylor and Lindorfer, 2007). Malgré l'utilisation en routine de ce traitement, des preuves irréfutables de son efficacité en transplantation n'ont pas encore été identifiées lors d'études contrôlées chez l'Homme; il ne présente alors pas d'indication spécifique pour son possible rôle dans la prévention du rejet chronique. De plus, un essai clinique réalisé sur treize patients, comparant l'efficacité de l'anti-CD20 et celle de l'anti-CD25, a été rapidement interrompue car les patients traités avec le rituximab ont développés un rejet cellulaire aigu (cinq patients sur les six traités) (Clatworthy et al., 2009). Ceci peut être expliqué par le fait que la déplétion des LB suite au traitement, y compris des LB régulateurs, peut avoir contribué à l'apparition accrue de ce rejet. Cependant, certains résultats suggèrent que la déplétion des LB au moment de la greffe privilégie l'induction d'une tolérance par l'expansion de nouveaux LB, « habitués » au greffon depuis le début de leur développement (Parsons et al., 2011). En effet, l'injection de cellules syngéniques de la moelle osseuse (MO) déplétées en LT le jour même chez des souris SCID (déficientes en LT et LB) ayant reçu une allogreffe de peau, suivi de l'injection quatorze jours plus tard de splénocytes déplétés en LT permet aux LB repeuplant la souris receveuse de se développer en présence de l'antigène. De plus, une étude chez le primate non humain a permis de montrer que l'utilisation du Rituximab, associé à l'ATG comme traitement d'induction et à la Rapamycine comme

traitement d'entretien, permet d'induire la survie à long terme d'ilots pancréatiques (Liu et al., 2007). Dans cette étude, la déplétion lymphocytaire est suivie d'une recolonisation du compartiment des LB par des cellules immatures/transitionnelles qui ont été associées, dans d'autres études, à la tolérance en transplantation.

L'anti-CD52 (Alemtuzumab ou Campath-1), qui cible à la fois les lymphocytes T et B, semble favoriser l'induction d'une tolérance chez l'Homme, comme le montre l'étude de Heidt et ses collègues. En effet, la déplétion par l'Alemtuzumab crée un environnement propice à la tolérance via l'induction de cellules B présentant un profil de cellules régulatrices (Heidt et al., 2012). De plus, le traitement à l'Alemtuzumab semble compatible avec l'utilisation de doses plus faibles de traitements immunosuppresseurs toxiques à long terme, comme les inhibiteurs de calcineurines (Calne et al., 1999)(Ellis et al., 2007). En effet, l'administration de l'Alemtuzumab le jour d'une greffe rénale chez des enfants, associée à un traitement au Tacrolimus à faible dose, empêche l'apparition de rejet aigu et d'effets secondaires indésirables, tout en menant à un greffon stable et fonctionnel dans le temps. Actuellement, des études cliniques sur l'induction de la tolérance sont en cours afin de tester l'efficacité de l'Alemtuzumab associée à d'autres stratégies comme l'injection de cellules régulatrices ou de cellules souches du donneur, ou encore le blocage de la costimulation (Page et al., 2012).

D'autres Ac non-déplétants mais bloquant l'activation des lymphocytes T sont utilisés. C'est le cas du Daclizumab (anti-CD25 humanisé) et du Basiliximab (anti-CD25 chimérique) qui fixent le récepteur à l'IL-2 présent principalement sur les lymphocytes T activés. Ils sont plus spécifiques et ne transduisent pas de signal d'activation contrairement à l'ATG et l'OKT3 qui peuvent induire la production de cytokines en se fixant aux lymphocytes. On retrouve également des molécules bloquant la liaison des molécules de costimulation entre les APC et les lymphocytes T (CTLA4-Ig, CD40-Ig), inhibant ainsi l'activation de ces lymphocytes.

Des études cliniques utilisant l'Ataccept pour le traitement de la sclérose en plaques ont été également réalisées. Cette protéine recombinante humaine comprend le site de liaison du récepteur de BLys (B-Lymphocyte Stimulator) et d'APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), deux cytokines clés pour la maturation, la fonction et la survie des LB. Ainsi, Ataccept agit essentiellement sur les LB matures en bloquant les plasmocytes à courte et longue durée de vie, tout en épargnant les LB mémoires et progéniteurs des LB. Cette molécule semblait alors promettre un bon pronostic quant à l'amélioration de la maladie en permettant ainsi d'éliminer les cellules sécrétrices d'anticorps délétères pour le patient.

Malheureusement, les essais furent interrompus suite à l'observation d'une aggravation de la maladie (Hartung and Kieseier, 2010). Cela laisse alors supposer que certaines de ces cellules sécrétrices d'anticorps sont capables d'induire une protection contre la maladie, et ce via des mécanismes indépendants des anticorps.

Bien que les progrès aient été considérables, l'immunosuppression utilisée pour prévenir le phénomène du rejet augmente le risque et la sévérité des complications post-greffe. Parmi ces différents types de traitement IS, certains comme les inhibiteurs de calcineurines induisent de graves effets secondaires tels qu'une néphrotoxicité, qui a des conséquences délétères à long terme (Bennett et al., 1996). Afin de minimiser les effets secondaires de chaque traitement, il est d'usage de combiner différents types d'IS et d'utiliser une trithérapie initiale qui associe des corticoïdes, un anti-prolifératif et un anti-calcineurine. Ce dernier peut parfois être remplacé par un anti-mTOR qui n'a pas d'effet néphrotoxique. Ensuite, lors du traitement d'entretien, l'objectif est de diminuer les doses, soit de corticoïdes, soit d'anti-calcineurines, afin de limiter les effets secondaires. Cependant, la toxicité des immunosuppresseurs utilisés en routine reste toujours un des problèmes majeurs en transplantation.

En plus de leur toxicité, les IS affaiblissent le système immunitaire général du receveur et l'empêchent alors de développer une réponse efficace contre d'autres pathogènes, ce qui entraîne chez le patient une augmentation des risques de cancer (Kasiske et al., 2004) et d'infections (Dharnidharka et al., 2004). En effet, les cancers représentent une des principales complications tardives post-transplantation impactant sur la qualité de vie des patients transplantés et sur leur survie. Toutes les données des registres nationaux et internationaux en témoignent. La base de données française Cristal de 47 000 patients greffés (tous organes confondus) identifie 7 % de cette population comme ayant eu au moins un cancer d'organe solide (peau exclue).

profils transcriptomiques et immunologiques de patients transplantés rénaux TOL et ceux de patients sous traitements immunosuppresseurs présentant une fonction stable du greffon (STB), présentant des signes de rejet (CR) ou de volontaires sains (HV). L'étude des patients TOL réalisée par l'équipe de notre laboratoire, dirigée par le Pr Souillou et le Dr Brouard, a tout d'abord mis en évidence une augmentation de la fréquence des LB et l'enrichissement de gènes liés aux LB dans le sang des patients TOL par rapport aux patients STB ou CR (Brouard et al., 2007; Louis et al., 2006). L'accumulation de LB dans le sang de ces patients TOL a été confirmée par une augmentation du nombre absolu de ces LB. Une analyse phénotypique a permis de mieux caractériser ces cellules comme étant de type mémoire, exprimant des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) et de migration (CD62L). Ces LB présentent également un profil inhibiteur, avec un ratio diminué de l'expression des récepteurs activateur et inhibiteur (FcγRIIa/ FcγRIIb) ainsi qu'une expression plus importante de la molécule BANK-1 (B-Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1), impliquée dans l'inhibition de l'activation des cellules B dépendante de la signalisation via la molécule CD40 (Aiba et al., 2006a). Les LB des patients TOL possèdent également un profil de LB régulateurs avec une accumulation de cellules CD1d⁺ CD5⁺ (Pallier et al., 2010). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les deux autres grandes études, qui montrent à la fois une signature de gènes associés aux LB et une accumulation de LB dans le sang des patients TOL (Newell et al., 2010)(Sagoo et al., 2010). Ces deux groupes montrent que ces cellules B sont de type transitionnel et naïf et sont capables de produire plus d'IL-10 suite à une stimulation polyclonale, en comparaison avec les LB des patients non TOL. Ils ont également constaté une accumulation du transcript de la molécule CD20 (exprimée par les LB) dans les urines des patients TOL (Newell et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle des LB dans l'induction ou le maintien de la tolérance chez ces patients opérationnellement tolérants. Une des hypothèses actuelles propose qu'à la suite d'une immunosuppression, la reconstitution du compartiment des LB en présence des alloantigènes pourrait créer un environnement favorable au développement ou au maintien de la tolérance vis-à-vis du greffon. En effet, l'étude de Parsons et de ses collègues réalisée chez la souris suggère que la déplétion du compartiment des LB au moment de la transplantation induirait la tolérance en déplaçant les clones B alloréactifs et en remodelant le répertoire des LB (Parsons et al., 2011). De plus, les résultats obtenus lors d'une étude chez l'Homme mettent en évidence qu'à la suite de certains traitements immunosuppresseurs, le compartiment des LB est recolonisé par des populations de LB particuliers, associés dans la littérature à des fonctions régulatrices. En effet, suite à un traitement d'induction à l'Alemtuzumab (anti-CD52), les auteurs observent

une augmentation temporaire de la proportion de cellules B de type transitionnel présentant un phénotype régulateur et une augmentation permanente de LB naïfs (Heidt et al., 2012). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus chez le primate non humain suite à une déplétion des LB via le Rituximab (anti-CD20). En effet, la reconstitution du compartiment B par des cellules immatures et transitionnelles a été associée à une survie à long terme des greffes d'îlots pancréatiques (Liu et al., 2007).

Pourtant, bien qu'il existe quelques rares cas de cette tolérance opérationnelle chez l'Homme, aucun protocole d'induction de tolérance en transplantation n'est actuellement disponible. C'est pourquoi les recherches actuelles en transplantation visent à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'induire une tolérance à long terme spécifique du greffon. En effet, certains protocoles utilisés chez l'animal ne sont pas applicables en clinique et d'autres ne fonctionnent pas. Ces échecs pourraient s'expliquer par la fréquence importante de cellules mémoires chez l'Homme comparé à l'animal de laboratoire, peu exposé aux antigènes étrangers (Nadazdin et al., 2011). Différentes études ont pu démontrer le rôle délétère de la présence de lymphocytes T et B mémoires pour la survie de la greffe (Bingaman and Farber, 2004). Les cellules mémoires induites avant la transplantation par une immunisation lors de transfusions sanguines, d'une première greffe, d'une grossesse ou encore par des antigènes de l'environnement, entraînent une augmentation du risque de rejet de greffe chez l'Homme (Heeger et al., 1999). Récemment, l'équipe de Reinke a mis en place un modèle de transplantation d'allogreffe cardiaque chez le rat qui permet d'étudier le rôle des cellules T mémoires dans le rejet et de tester l'efficacité de nouveaux protocoles d'induction de tolérance en présence de ces cellules mémoires (Siepert et al., 2012).

C'est pourquoi les tests cliniques actuels et futurs portent majoritairement sur l'utilisation de stratégies thérapeutiques qui utilisent de faibles doses d'immunosuppresseurs, afin d'induire un état partiel de tolérance tout en minimisant les effets secondaires des traitements (Calne et al., 1998).

2) Le chimérisme hématopoïétique

L'induction d'un chimérisme hématopoïétique correspond à la colonisation des organes lymphoïdes primaires du donneur par les cellules du receveur. Ces cellules participant au mécanisme de sélection de la tolérance centrale, les lymphocytes capables de reconnaître les antigènes du donneur sont éliminés de la même façon que les lymphocytes reconnaissant des auto-antigènes. Le chimérisme est induit par une greffe de moelle osseuse ou par injection au receveur de cellules souches hématopoïétiques purifiées du donneur. De

nombreuses études réalisées chez l'animal mais également chez l'Homme mettent en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe suite à l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique (Sachs et al., 2011). En effet, le groupe de Stanford a démontré l'efficacité de ce traitement dans l'induction d'une tolérance suite à une allogreffe rénale chez la plupart des patients traités. Cependant, il était nécessaire que le donneur et le receveur soient HLA-compatibles (Millan et al., 2002). Pour pallier ce problème, une étude clinique récente associant une irradiation totale, de fortes doses de cyclophosphamide pré et post-transplantation de moelle osseuse, ainsi que l'administration de cellules souches hématopoïétiques (CSH) du donneur (incompatible pour HLA avec le receveur) a été établie et a permis d'observer une tolérance à une greffe rénale sans signe de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour Graft Versus Host Disease) (Leventhal et al., 2012).

Cependant, l'utilisation de cette stratégie est encore limitée en raison de la toxicité des traitements d'induction (irradiation totale ou thymique...) (Bölling et al., 2011) et du risque d'apparition de GVHD, déclenchée par une forte réponse des cellules du donneur contre celles du receveur.

3) Le blocage de la costimulation

Certaines stratégies se basent sur la nécessité d'une costimulation pour l'activation complète des lymphocytes et sur l'implication de l'absence de cette costimulation dans la génération de cellules anergiques ou régulatrices. En effet, le blocage des voies de costimulation comme stratégie d'immunosuppression a fait ses preuves dans de nombreux modèles animaux. Au sein de notre laboratoire, l'utilisation de molécules telles que le CD40-Ig, le CTLA4-Ig, ou l'anti-CD28 a permis d'induire la tolérance dans des modèles d'allogreffe (*Figure 5*). En effet, l'injection le jour de la greffe d'un adénovirus codant pour la molécule CD40-Ig (qui contient la partie extracellulaire du CD40 associée au fragment Fc d'une Ig) permet de bloquer l'interaction CD40-CD40L et d'induire une survie à long terme de l'allogreffe chez le rat. Cette tolérance est dépendante de la présence de cellules CD8⁺ CD45RC^{low}, capables d'induire l'expression de la molécule protectrice IDO par les cellules endothéliales, via la sécrétion d'IFN- γ (Guillonnet et al., 2007a).

De même le CTLA4-Ig, une molécule qui bloque l'interaction B7/CD28/CTLA4 en se fixant sur les molécules B7, permet d'induire la tolérance dans des modèles d'allogreffes (Azuma et al., 1996)(Hill et al., 2007)(Lin et al., 1993). Une étude pré-clinique réalisée chez le primate a montré que le Belatacept, une version améliorée du CTLA4-Ig (LEA29Y) ayant une plus forte affinité, induisait une survie du greffon similaire à celle obtenue avec d'autres

traitements actuellement utilisés, mais permettait d'obtenir une fonction rénale améliorée (Larsen et al., 2005). En 2011, le Belatacept a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et son indication est approuvée pour une utilisation combinée à d'autres immunosupresseurs.

Enfin, l'équipe de notre laboratoire dirigée par le Dr B.Vanhove a mis en évidence le caractère prometteur du blocage de l'interaction activatrice B7/CD28 et le maintien de l'interaction inhibitrice B7/CTLA-4, en générant un anticorps anti-CD28 (JJ319) capable d'induire la tolérance à l'allogreffe de rein chez le rat (Haspot et al., 2005). Le blocage sélectif de CD28 favorise l'augmentation du nombre de Treg et l'expression de molécules régulatrices comme CTLA-4, IDO, HO-1 et le TGF β . Suite aux résultats encourageants chez le rongeur, cette équipe a généré un anticorps monovalent antagoniste anti-CD28 chez l'Homme (Sc28AT). Cet anticorps permet d'éviter le rejet aigu et chronique d'allogreffe rénale ou cardiaque chez le primate non humain (Poirier et al., 2010). Ils ont par la suite généré une version améliorée de cette molécule, le FR104, qui possède une durée de vie augmentée et une meilleure stabilité chimique. De façon dépendante du CTLA-4, cette nouvelle molécule est capable d'inhiber la xéno-GVHD induite chez des souris SCID (severe combined immunodeficiency) humanisées via l'injection de PBMC (peripheral blood mononuclear cell) humaines (Poirier et al., 2012). L'étude préclinique de cette molécule sur le primate non humain en monothérapie ou associée à d'autres immunosuppresseurs est actuellement en cours et fait l'objet d'un projet de recherche collaboratif européen de trois ans appelé TRIAD (Tolerance Restoration In Autoimmune Disease). Malgré les résultats prometteurs de ces études, il est peu probable que l'utilisation seule de molécules bloquant la costimulation puisse induire une tolérance à long terme, en particulier chez l'Homme. En effet, différentes études réalisées dans des modèles expérimentaux ont mis en évidence la résistance des cellules T mémoires face à la plupart des traitements basés sur l'inhibition de la costimulation (Valujskikh et al., 2002)(Zhai et al., 2002). Or, comme je l'ai évoqué précédemment, la présence de cellules mémoires chez les patients transplantés représente un obstacle à l'acceptation du greffon. Certaines études chez l'animal ont pu démontrer la possibilité de combiner des traitements bloquant la costimulation et des inhibiteurs de molécules d'adhérences, comme l'anti-LFA-1, afin d'inhiber la fonction des cellules mémoires (Kitchens et al., 2012) et le rejet d'allogreffe (Badell et al., 2010). Ainsi, il semble nécessaire que les études sur les molécules visant à bloquer la costimulation s'intéressent à leur action sur les populations de cellules mémoires et sur leur efficacité lorsqu'elles sont combinées à d'autres traitements.

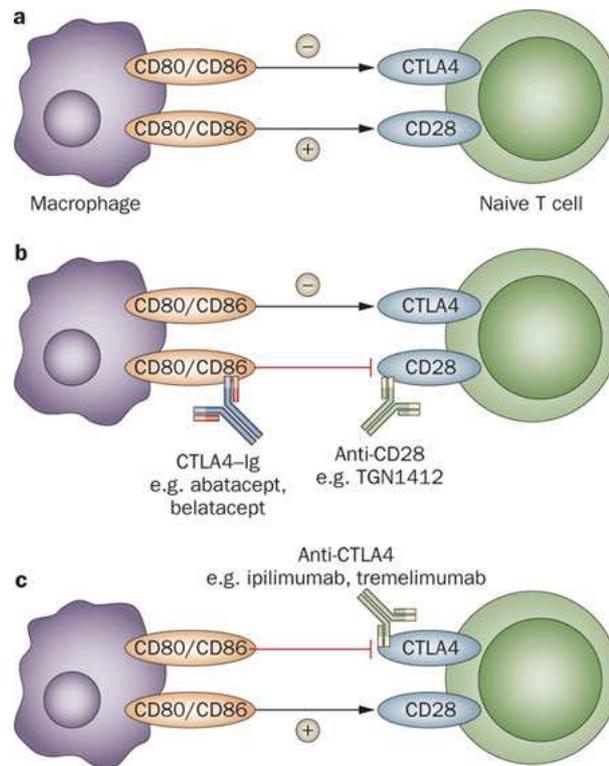


Figure 5 : Schéma représentant les molécules de costimulation et leurs inhibiteurs (d'après Bedke et Stenzl) (Bedke and Stenzl, 2010)

4) L'inhibition de la migration cellulaire

La migration des cellules de l'immunité est indispensable à la réponse induite contre le greffon. Dernièrement, l'équipe de Bouso a particulièrement bien mis en évidence cette dynamique des cellules qui migrent et interagissent afin d'induire cette réponse immune. En utilisant une nouvelle technique de microscopie biphotonique, ils ont démontré l'importance dans le rejet de l'infiltration rapide des DC et des monocytes du donneur dans le greffon, suivie de leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Ces cellules activent les lymphocytes T alloréactifs qui vont à leur tour migrer au niveau du greffon pour le détruire (Celli et al., 2011). La mobilité des cellules implique un remodelage intracellulaire du cytosquelette d'actine contrôlé notamment par des petites molécules GTPase. Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules de l'immunité et les cellules endothéliales sont également importantes pour la migration cellulaire. Elles permettent aux leucocytes de se fixer à la barrière endothéliale du greffon et de la traverser. Elles sont également nécessaires à la stabilité des interactions cellulaires et donc à l'activation des cellules effectrices.

Certaines stratégies ciblant la migration et l'adhésion cellulaire ont été utilisées dans des modèles animaux pour réguler la réponse immune en transplantation. L'utilisation d'une combinaison d'anticorps anti-LFA-1 et anti-VLA-4, ciblant deux molécules d'adhésion, permet d'induire une prolongation de survie des allogreffes d'îlots pancréatiques chez le rat (Yang et al., 1995). Ohki et ses collègues ont montré que l'inhibition de la voie Rho GTPase permettait de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques chez la souris, en limitant la migration leucocytaire au sein du greffon (Ohki et al., 2001). En accord avec ces résultats, une autre étude a mis en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe cardiaque de rat via l'inhibition de la GTPase RhoA, qui entraîne une modification du cytosquelette d'actine des cellules T et l'inhibition de leur infiltration au sein du greffon (Skelton et al., 2010). Un nouvel agent immunosuppresseur, le beta-SQAG9, permet d'induire la tolérance à l'allogreffe de peau chez le rat via l'inhibition de la migration des LT, en se liant à la molécule CD62L (Takenouchi et al., 2005). En effet, le CD62L est exprimé à la surface des LT naïfs et mémoires centraux et est nécessaire à une circulation et compartimentation efficaces des LT entre le sang et les ganglions lymphatiques. Ainsi, sa liaison avec le beta-SQAG9 empêche la migration des LT. De plus, une étude très récente a permis d'identifier FucT-VII (Fucosyl-Transferase VII) comme une nouvelle cible afin d'empêcher le rejet, applicable ensuite chez l'Homme. Cette molécule, codée par le gène *Fut7*, est essentielle à la biosynthèse des ligands des sélectines, qui contribuent à l'initiation de la migration des lymphocytes. Ainsi, dans un modèle murin de rejet d'allogreffe cardiaque, l'inactivation de ce gène conduit à une tolérance à long terme des greffons, induite par un blocage des LT CD4⁺ en périphérie, avec un défaut de prolifération, une production limitée de cytokines pro-inflammatoires et une surexpression de la molécule PD-1 (Sarraj et al., 2014). Ainsi, ces LT sont incapables de migrer vers le greffon pour induire un rejet et meurent donc par apoptose. Des essais cliniques chez l'Homme avec l'immunosuppresseur mycophenolate, qui induit l'expression de PD-1 par les LT, ont démontré une diminution de l'apparition de vasculopathie chronique des transplants cardiaques (He et al., 2011). Ainsi, ces résultats encourageants peuvent être dus à l'induction de l'expression de PD-1 et donc au blocage des LT en périphérie. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration cellulaire semble être une stratégie permettant d'induire la tolérance en transplantation chez l'Homme.

5) L'induction et le transfert de cellules régulatrices

De nombreuses études parues depuis plusieurs décennies ont permis de mettre en évidence l'existence des cellules de l'immunité innée ou adaptative douées d'une activité

immunosuppressive et capables dans des modèles animaux d'induire une tolérance spécifique du greffon en présence de courts traitements avec des immunosuppresseurs (*Figure 6*). L'étude de la présence de ces cellules chez l'Homme, à l'état naturel ou inductible, constitue un axe important de la recherche visant à instaurer une tolérance chez les patients en allégeant les traitements IS. Cette stratégie thérapeutique fait l'objet d'un consortium européen, appelé The ONE Study, comprenant huit institutions académiques partenaires de France, d'Allemagne, d'Italie, du Royaume-Uni et des Etats-Unis. En effet, l'objectif premier de cette étude est de prévenir du rejet des organes transplantés chez l'Homme, sans avoir recours à une immunosuppression pharmacologique à long terme. La ONE Study applique alors le concept de thérapie cellulaire et vise à :

- * produire différentes populations de cellules hématopoïétiques immunorégulatrices
- * étudier de façon comparative les caractéristiques tolérogènes de ces différents types cellulaires
- * transférer ces cellules dans un essai clinique et effectuer une comparaison de la sécurité sanitaire et de l'efficacité thérapeutique de chaque type cellulaire chez des patients transplantés rénaux.

Les cellules testées dans ce cadre sont des Treg, des Tr1, des DC tolérogènes et des macrophages régulateurs, dont les propriétés générales sont explicitées ci-après.

5.1. Les lymphocytes T régulateurs

Différentes populations de cellules T possédant une activité régulatrice ont été décrites ces vingt dernières années. Parmi elles, il existe des cellules T CD4⁺, des T CD8⁺, des LT CD4⁻CD8⁻ et des cellules T « natural killer » (NKT). Toutes ces cellules peuvent ainsi contribuer à induire une tolérance à différents stades de la réponse immune. Parmi ces cellules, il y a une distinction entre les cellules T régulatrices naturelles et les cellules T régulatrices induites. Les cellules T régulatrices naturelles, appelées nTreg, se développent dans le thymus et migrent en périphérie afin de contrôler les lymphocytes autoréactifs qui seraient responsables du développement de maladies auto-immunes (MAI). Les cellules T régulatrices dites induites, ou iTreg, sont obtenues à partir de cellules CD4⁺ cultivées en présence de différentes cytokines. Toutes ces cellules peuvent partager certains marqueurs, d'autres sont restreints à certaines populations de Treg.

a) Les Treg CD4⁺

Les cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ expriment constitutivement différents marqueurs tels que le GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein) (Shimizu et al., 2002), le CTLA-4 (Takahashi et al., 2000) qui inhibe l'activité des cellules présentatrices d'antigène et donc empêche le développement de LT effecteurs, le CD62L (Szanya et al., 2002) ou la molécule Nrp-1 (Neuropilin-1) (Bruder et al., 2004). Cependant, l'expression de ces molécules n'étant pas restreinte à ces cellules, elles ne peuvent donc pas être utilisées comme marqueurs spécifiques. Chez la souris et le rat, l'expression du facteur de transcription Foxp3 a été spécifiquement associée aux cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺. Foxp3 a été identifié comme régulateur du développement et de la fonction des Treg CD4⁺ CD25⁺. Le transfert du gène codant Foxp3 dans des cellules CD4⁺ CD25⁻ confère un phénotype et une fonction suppressive à ces cellules (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). De plus, l'utilisation de souris Foxp3^{GFP} a permis d'identifier Foxp3 comme le marqueur spécifique des ces Treg (Fontenot et al., 2005). Malgré l'expression de Foxp3 dans les Tregs humaines, celui-ci a également été décrit comme transitoirement augmenté dans les lymphocytes T activés, sans que ceux-ci n'acquière de propriétés suppressives (Allan et al., 2007), rendant difficile son utilisation comme marqueur spécifique. De plus, Foxp3 est un marqueur intranucléaire, accessible qu'en perméabilisant et donc en détruisant la cellule, ce qui empêche des études plus approfondies des mécanismes de régulation avec ces cellules *in vitro* et *in vivo*. Actuellement, aucun marqueur spécifique n'a encore été identifié chez l'Homme. Les Treg CD4⁺ sont capables d'inhiber différentes réponses lymphocytaires induites par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, mais aussi la réponse humorale via l'inhibition de la production d'anticorps par les LB. Les nTreg peuvent également inhiber des réponses immunologiques induites par les NK et sont capables de modifier la maturation et la fonction des DC (Thornton and Shevach, 2000). La présence de l'IL-2 est essentielle à leur prolifération et activation (Thornton et al., 2004), alors que leur fonction suppressive dépend du TGFβ et de l'IL-10 (Du et al., 2006). La fonction principale des nTreg FoxP3⁺ est de migrer jusqu'aux sites inflammatoires et de supprimer l'action de différents lymphocytes effecteurs, spécifiquement celle des sous-populations de T helper comme les Th1, Th2 et Th17 ou de cellules Th folliculaires (Tfh) (Chaudhry et al., 2009)(Linterman et al., 2011). Cependant, il semble que les nTreg soient capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17. En effet, l'IL-6 pourrait convertir les nTreg en cellules Th17 de façon dépendante du TGFβ (Xu et al., 2007). Cette plasticité cellulaire

montre que les nTreg pourraient, dans certaines conditions, se différencier en cellules effectrices et favoriser la réponse immune activatrice.

Différents mécanismes permettent l'induction des iTreg, issus de la conversion de LT CD4⁺ naïfs en Treg (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009), dont le plus décrit est dépendant de la présence de l'IL-2 et du TGFβ (Fantini et al., 2004). En transplantation, l'induction de ces iTreg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ a été observée dans des modèles de tolérance à l'allogreffe cardiaque dépendant du TGFβ (Cobbold et al., 2004)(Ochando et al., 2006). Récemment, les études du groupe de Shevach suggèrent qu'un membre de la famille des facteurs de transcription d'Ikaros, Helios, serait un marqueur des Treg thymiques et pourrait permettre de discriminer les iTreg des nTreg (Thornton et al., 2010). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces données, cette idée ayant été récemment remise en question par différentes études (Akimova et al., 2011)(Haribhai et al., 2011). En effet, l'équipe de Williams montre chez la souris que des cellules Foxp3⁻ (Haribhai et al., 2011) converties en Treg sont majoritairement Helios^{hi}, suggérant que l'expression d'Helios n'est pas restreinte aux nTreg. De même, le groupe de Levings a démontré l'existence d'une sous-population de nTreg n'exprimant pas le marqueur Helios (Himmel et al., 2013). Récemment, des études ont découvert un lien entre la méthylation d'une région spéciale présente sur le gène de FOXP3 appelée Treg-specific demethylated region (TSDR) et les propriétés effectrices ou régulatrices des LT. En effet, cette région spécifique est totalement déméthylée dans les Treg alors qu'elle est fortement méthylée dans les LT effecteurs.

Deux autres populations d'iTreg CD4⁺ ont été décrites: les Tr1 et les Th3. Les Tr1 (pour T regulatory type 1), décrites par le groupe de Roncarolo, sont capables d'inhiber la colite auto-immune (Groux et al., 1997). Elles sont générées à partir de cellules CD4⁺, en présence d'IL-10. Récemment, une autre cytokine, l'IL-27, a été décrite comme capable d'induire la génération de Tr1 (Apetoh et al., 2010). Les Tr1 exercent leur fonction suppressive via la production d'IL-10 et de TGFβ, indépendamment du Foxp3 (Roncarolo et al., 2001). En transplantation, l'induction *in vivo* de ces cellules avec une combinaison d'IL-10 et de rapamycine permet d'établir une tolérance à long terme d'allogreffe d'îlots pancréatiques (Battaglia et al., 2006). Un essai clinique basé sur le transfert de ces cellules Tr1 est actuellement en cours en Italie afin d'évaluer leur efficacité dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Roncarolo and Battaglia, 2007).

Les Th3 ont été décrites pour la première fois dans un modèle d'induction de tolérance orale à l'EAE (Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale) chez la souris (Chen et al., 1994). Elles sont générées en présence d'IL-4, d'IL-10 et de TGFβ. Leur fonction régulatrice

est dépendante du TGF β qu'elles produisent (Weiner, 2001). Elles ont la particularité d'induire la différenciation de lymphocytes T en cellules Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Carrier et al., 2007).

b) Les Treg CD8⁺

Une population de cellules T régulatrices CD8⁺ naturelles a été mise en évidence chez le rat par Saoudi et ses collègues en 2004 (Xystrakis et al., 2004). Cette population de lymphocytes T CD8⁺, caractérisée par une faible expression de la molécule CD45RC, exprimant Foxp3 et CTLA-4, peut produire de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-10 *in vitro*. Ces lymphocytes T CD8⁺ exercent leur fonction régulatrice en inhibant l'expansion de cellules T CD4⁺ de type Th1 via un contact cellulaire (Xystrakis et al., 2004).

Des populations de Treg induites CD8⁺ ont aussi été mises en évidence, dont les cellules CD8⁺ CD28⁻. Décrites chez l'Homme, elles sont générées *in vitro* par des stimulations répétées via des APC (Liu et al., 1998). Leur fonction suppressive est spécifique de l'antigène et dépend d'un contact cellulaire. Ces cellules ont été retrouvées chez des patients transplantés rénaux, hépatiques ou cardiaques, ne présentant pas de signe de rejet (Colovai et al., 2003)(Cortesini et al., 2002). Une sous-population de LT CD8⁺ semblable aux Tr1 (appelée CD8⁺ T_R), obtenue à partir de cellules T CD8⁺ naïves et inhibant les réponses T primaires via l'IL-10 qu'elle sécrète a également été observée chez des patients tolérants une allogreffe rénale (Cai et al., 2004). Une équipe de notre laboratoire a mis en évidence une population d'iTreg CD8⁺ possédant un phénotype similaire aux cellules naturelles CD8⁺CD45RC^{low} décrites par l'équipe de Saoudi. Cette population est capable d'inhiber le rejet aigu dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonnet et al., 2007a)(Picarda et al., 2014).

c) Les Treg double négatives

Des cellules TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD3⁺ NK1.1⁻ CD4⁻ CD8⁻, dites double négatives, ont également été décrites comme possédant des propriétés suppressives. Leur fonction est dépendante de l'IL-2 et de l'IL-4 et nécessite un contact cellulaire (Zhang et al., 2000). Découvertes chez la souris puis décrites chez l'Homme, elles n'expriment pas la molécule CD28 mais possèdent des molécules d'activation telles que le CD25 et le CD69 (Fischer et al., 2005; Zhang et al., 2000). Elles sécrètent de l'IFN γ et du TNF α (Chen et al., 2003). Elles permettent de prévenir le rejet de greffe (Hill et al., 2011), la GVHD (Young et al., 2003) et le développement de diabète (Ford et al., 2007). Une étude a mis en évidence la capacité de ces Treg murines à

acquérir, *in vivo*, le complexe CMH/peptide antigénique porté par des APC via la trogocytose, conférant à ces Treg la capacité à lyser les lymphocytes CD8⁺ spécifiques de l'antigène (Ford McIntyre et al., 2008). Récemment, une étude de notre laboratoire a permis de démontrer une accumulation de LT double négatifs IFN γ ⁺ dans la rate de rats tolérants suite à un transfert adoptif de DC tolérogènes autologues (Hill et al., 2011).

d) Les cellules NKT

Les cellules NKT sont des cellules exprimant à la fois le TCR $\alpha\beta$ et le marqueur de la lignée NK, le NKR1. Elles peuvent produire de l'IL-4, de l'IFN γ , du TGF β et de l'IL-10 suite à une activation via la reconnaissance d'un glycolipide étranger présenté par la molécule CD1d. Les NKT ont été associés à des fonctions de régulation notamment dans le cadre du diabète (Frey and Rao, 1999) mais aussi en transplantation (K. I. Seino et al. 2001)(Higuchi et al. 2002). Chez la souris, ils sont impliqués dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque et sont capables d'inhiber la GVHD en favorisant la prolifération des Treg du donneur de façon dépendante de l'IL-4 (Pillai et al., 2009).

5.2. Les cellules dendritiques tolérogènes

Les cellules dendritiques jouant un rôle important dans la tolérance périphérique peuvent également être impliquées dans des mécanismes de tolérance. En effet, la déplétion des DC chez la souris entraîne une diminution du nombre de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, corrélée à une augmentation de lymphocytes T producteurs d'IL-17 et d'IFN γ , et une augmentation du risque de MAI (Darrasse-Jèze et al., 2009).

Les propriétés régulatrices ou tolérogènes des DC ont classiquement été associées aux cellules immatures. En effet, ces cellules exprimant faiblement les molécules de co-stimulation et ne produisant que très peu ou pas d'IL-12p70 (Banchereau and Steinman, 1998), elles ne sont pas aptes à activer une réponse immunitaire effectrice. Par ailleurs, elles possèdent de fortes propriétés endocytiques et phagocytiques (Buckwalter and Albert, 2009). Elles captent les antigènes du "soi" et migrent dans les OLS pour présenter ces antigènes aux LT autoréactifs et induire leur délétion ou leur anergie (Steinman et al., 2003). D'autre part, l'injection de DCs autologues immatures combinée à une immunosuppression sous-optimale induit la production d'IFN γ par les LT CD4⁻ CD8⁻ dans la rate et une survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Hill et al., 2011). Chez la souris, des DC immatures dérivées de la MO et cultivées *in vitro* avec de faibles concentrations de GM-CSF (GM^{low})

sont capables de prolonger la survie d'allogreffes cardiaques (Lutz et al., 2000). Les DC semblent également capables d'inhiber la réponse humorale. En effet, des DC dérivées de la moelle osseuse (BMDC) immatures ainsi que des DC provenant de poumons de souris peuvent fortement inhiber la production d'IgE par des LB activés via le CD40 et l'IL-4 (Obayashi et al., 2007).

Cependant, le potentiel tolérogène des DC ne peut pas être exclusivement attribué aux cellules immatures. En effet, il a été démontré que la maturation et l'expression de molécules de stimulation pouvaient être nécessaires à l'induction de tolérance. L'équipe de Lutz a montré que des DC stimulées avec du TNF α expriment fortement le CMH de classe II et les molécules de co-stimulation, mais produisent peu de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules sont capables d'induire une protection contre l'EAE chez la souris (Menges et al., 2002). Le concept de cellules semi-matures a donc été proposé, correspondant à un état de maturation intermédiaire de DC capables d'induire la tolérance. D'autre part, les DC matures sont aussi capables d'exercer des fonctions de régulation. Elle peuvent induire une tolérance en stimulant la prolifération de cellules Treg naturelles (Yamazaki et al., 2003). Les DC CD11c⁺ CD103⁺, qui présentent un phénotype mature (CD80, CD86, CMHII), participent au maintien de la tolérance intestinale en induisant des Treg Foxp3⁺. L'induction de ces Treg dépend de la présence de TGF β et de la production par les DC d'acide rétinoïque. Ces deux facteurs permettent l'induction de l'expression de Foxp3 par les cellules T (Coombes et al., 2007)(Sun et al., 2007)(Xiao et al., 2008).

5.3. Les macrophages régulateurs

Les macrophages peuvent avoir à la fois un rôle protecteur et un rôle pathogène, dépendant de leur localisation et de leurs propriétés fonctionnelles. En transplantation, l'activation des macrophages a lieu initialement lors d'une agression du tissu liée au phénomène d'ischémie-reperfusion et peut ainsi contribuer à une détérioration du greffon. A l'inverse, des macrophages alternativement activés peuvent alors inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés classiquement et donc contribuer à la réparation tissulaire. Les macrophages régulateurs représentent quant à eux une population distincte additionnelle dont le rôle principal est d'affaiblir les réponses immunitaires pro-inflammatoires. Ces macrophages régulateurs produisent de grandes quantités d'IL-10, mais n'expriment pas l'arginase 1 et ne sont pas dépendants de la voie de signalisation de STAT6 (Fleming and Mosser, 2011). Les macrophages classiques peuvent être induits en

macrophages régulateurs lors d'interactions avec des Treg (Tiemessen et al., 2007) ou des cellules B-1 (Wong et al., 2010). Une étude clinique pilote a démontré que les macrophages régulateurs humains permettaient la diminution du traitement IS chez des patients transplantés rénaux (Hutchinson et al., 2011).

5.4. Les Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC)

Les Myeloid derived suppressor cells (MDSC), ou « cellules suppressives dérivées de la lignée myéloïde », population hétérogène de progéniteurs cellulaires, peuvent s'accumuler dans les tissus inflammés et ainsi se différencier en macrophages, DC et granulocytes. Ces cellules, une fois activées, peuvent supprimer *in vitro* la prolifération des LT effecteurs, des LB et des NK, ainsi que leur production de cytokines. Ces MDSC sont également capables d'induire une survie d'allogreffes d'ilots pancréatiques (Chou et al., 2012) et cardiaques (Garcia et al., 2010) chez la souris.

5.5. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC)

Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) correspondent à une sous-population de cellules multipotentes de la moelle osseuse possédant des propriétés immuno-modulatrices et réparatrices capables de migrer vers les sites inflammés (Ding et al., 2013)(Ding et al., 2009). Ces MSC peuvent ainsi promouvoir la génération de Treg *in vitro* et *in vivo* via le TGF β et des contacts cellule-cellule (English et al., 2009). De plus, ces cellules particulières sont capables d'inhiber le rejet de greffe cardiaque chez la souris en diminuant la sécrétion d'allo-anticorps (Ge et al., 2009).

En clinique, des effets bénéfiques sur l'amélioration de la maladie ou de la survie du greffon ont été observés dans des cas de traitement de GVHD gastro-intestinale ou hépatique ou lors de greffe rénale (Tan et al., 2012). Le développement de stratégies thérapeutiques utilisant ces MSC reste encore au tout début et différents essais cliniques utilisant ces cellules sont en cours.

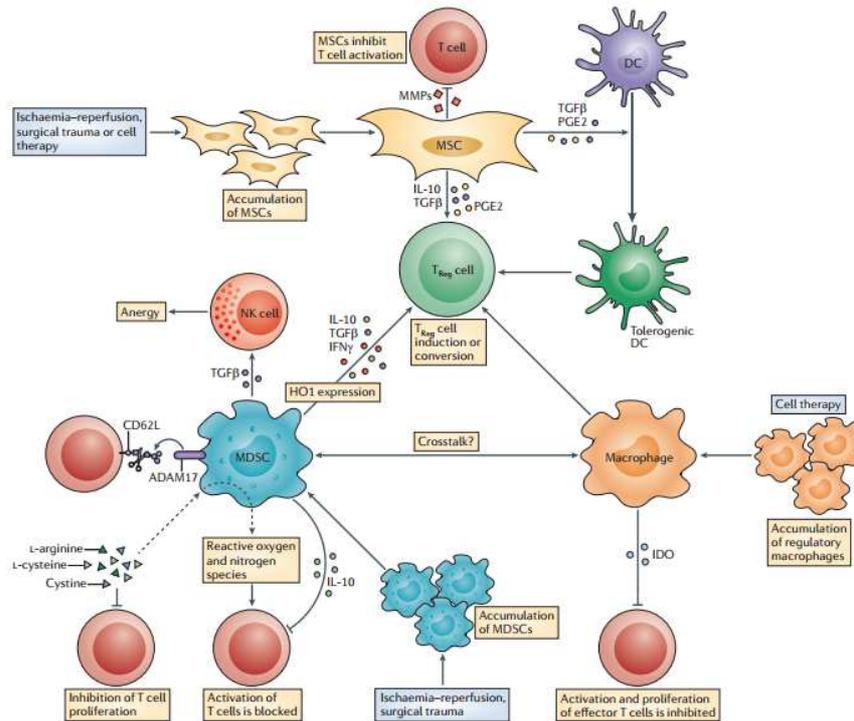


Figure 6 : Schéma représentant les différentes cellules régulatrices et leurs cibles (d'après Wood) (Wood et al., 2012)

5.6. Les cellules B régulatrices

Les LB sont principalement connus pour leur capacité à induire positivement la réponse immunitaire à travers leur propriété d'APC et leur capacité unique à produire et sécréter des anticorps. Ils jouent un rôle important dans l'élimination de pathogènes extracellulaires et sont largement décrits pour leur implication dans des pathologies telles que les MAI via la production d'auto-anticorps, dans les allergies par la sécrétion d'IgE ou encore en transplantation via la génération d'anticorps anti-donneurs. Cependant ces vingt dernières années, de nombreuses études ont rapporté un rôle régulateur des LB démontrant l'existence de LB régulateurs (Vitale et al., 2010). Les différents rôles des lymphocytes B effecteurs et régulateurs dans la réponse immunitaire seront abordés dans la dernière partie (III).

Bien que les lymphocytes B puissent directement supprimer des réponses immunitaires (se référer à la partie III-D « Mécanismes de régulation des LB »), de nombreuses études rapportent également que leur fonction immunosuppressive peut être médiée par des interactions avec d'autres populations cellulaires régulatrices. Les LB expriment constitutivement les molécules de CMH de classe I et II, ce qui en fait des APC

capables d'interactions spécifiques d'antigènes avec les LT CD8⁺ et CD4⁺ respectivement. De plus, certains LB peuvent avoir des interactions directes avec les NKT, via l'expression à leur surface de la molécule CD1d. Une étude a permis de démontrer que des LT CD4⁺ comme des CD8⁺ possédant des propriétés immunosuppressives étaient générés lors de co-cultures avec des LB purifiés issus de souris tolérisées par un antigène dans un modèle de greffe de cornée (Ashour and Niederkorn, 2006). Une étude récente a démontré que la production d'IL-10 par les Breg induisait directement l'accumulation de Treg et la suppression de l'inflammation dans un modèle d'arthrite (Carter et al., 2011). Dans un autre modèle, des LB isolés de la rate de souris infectées avec des vers de schistosomes sont capables d'induire une accumulation de Treg FoxP3⁺ dans les poumons et de supprimer l'asthme allergique suite à un transfert adoptif (Amu et al., 2010). Différentes études ont permis de démontrer que des Treg allogéniques CD4⁺ (Chen and Jensen, 2007) et CD8⁺ (Zheng et al., 2009) possédant des propriétés suppressives pouvaient être générés en présence de LB génétiquement non-modifiés dans des réactions lymphocytaires mixtes (MLR).

III- Le lymphocyte B, un acteur essentiel de l'immunité

A/Développement du lymphocyte B

1) Le développement dans la moelle osseuse

Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes donnent lieu à l'ancêtre commun lymphoïde, ayant le potentiel de générer des cellules T et B. Certaines de ces cellules sont alors engagées dans un processus de différenciation en cellules B. Toutes ces cellules précurseurs non-différenciées peuvent se distinguer par l'expression de différents marqueurs à leur surface. L'un de ces marqueurs, le CD34, est présent sur toutes les cellules hématopoïétiques humaines et peut être ciblé en thérapie clinique, via l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD34, afin de séparer les cellules souches hématopoïétiques des autres cellules présentes dans la moelle.

Les cellules les plus précoces de la lignée B sont appelées cellules pro-B (*Figures 7 et 8*). Ces cellules progénitrices conservent une capacité limitée d'auto-renouvellement, afin de produire plus de cellules pro-B, mais également des cellules qui vont poursuivre leur différenciation. L'évènement majeur ayant lieu lors du stade pro-B est le réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig, qui précède toujours le réarrangement des gènes des chaînes légères (*Figure 7*). La jonction des segments des gènes D_H et J_H a lieu lors du stade précoce pro-B, suivie de la jonction d'un segment V_H au segment réarrangé DJ_H . Le gène réarrangé est transcrit par l'intermédiaire du gène de la région C_μ , le gène C le plus proche de la région V réarrangée. L'ARN est alors épissé pour produire l'ARNm de la chaîne lourde μ , le premier type de chaîne des Ig à être produit lors du développement du lymphocyte B. Dès lors que le LB exprime une chaîne μ , on parle de cellule pré-B. Il existe deux états d'activation du pré-B dans le développement du LB : le stade pré-B « large » immature et le stade pré-B « small » plus mature. Les cellules pré-B « large » ont réarrangées avec succès le gène des chaînes lourdes des Ig et expriment une chaîne lourde μ , elles ont alors stoppées le réarrangement des gènes des chaînes lourdes mais n'ont pas encore commencé celui des gènes des chaînes légères. Celui-ci a lieu dans les cellules pré-B « small ». Les gènes κ des chaînes légères sont les premiers à être réarrangés, et si ces réarrangements ne permettent pas d'obtenir une chaîne κ viable, les gènes λ des chaînes légères sont alors réarrangés. Lorsque la jonction des segments V et J de la chaîne légère est réussie, une chaîne légère est alors formée et assemblée dans le réticulum endoplasmique avec la chaîne μ pour former une IgM

membranaire. L'IgM s'associe ensuite à l'Ig α et l'Ig β pour former un BCR fonctionnel, qui est ensuite transporté à la surface de la cellule. Le réarrangement des gènes des chaînes légères est alors stoppé et le « small » pré-B devient un LB immature.

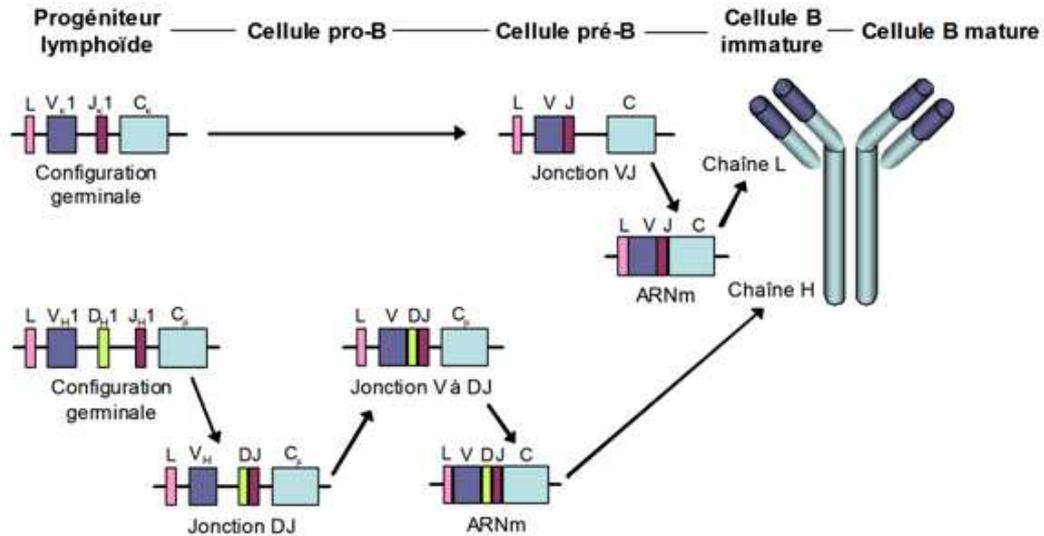


Figure 7 : Schéma représentant les réarrangements des gènes des chaînes des immunoglobulines (d'après Ollila et Vihinen) (Ollila and Vihinen, 2005)

Chaîne L : chaîne légère; Chaîne H : chaîne lourde; L : séquence leader; V : segment de variabilité ; J : segment de jonction; D : segment de diversité; C : segment de région constante.

2) L'activation dans la rate

Une fois leur développement dans la moelle osseuse terminé, les lymphocytes B sortent de la moelle et sont morphologiquement homogènes. Cependant, ils ne vont acquérir leur phénotype de surface, leur localisation ainsi que leurs propriétés fonctionnelles que suite à de nombreux phénomènes qui vont avoir lieu en périphérie ou dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate.

Les LB immatures sortant de la moelle acquièrent le marqueur de surface IgD ainsi que les marqueurs CD21 et CD22 (*Figure 8*), avec des changements importants au niveau de la densité d'expression d'autres marqueurs. Les LB immatures, également appelés « transitionnels » (T1/T2) selon leurs phénotypes, ont été caractérisés pour la première fois chez la souris (Chung et al., 2003). Les LB immatures vont alors répondre face à des antigènes T-indépendants de type 1 comme les lipopolysaccharides, ce qui provoque une réponse anticorps rapide en l'absence d'un help de lymphocytes T CMH de classe II restreints

(Coutinho and Möller, 1975). La majorité des LB matures, en dehors de ceux présents dans les « Gut-Associated Lymphoid Tissue » (GALT), résident dans les follicules de la rate et des ganglions lymphatiques, où ils vont rencontrer et répondre à des antigènes T-dépendants présentés par les cellules dendritiques folliculaires (FDC). Les LB vont ensuite proliférer et soit se différencier en plasmocytes à courte durée de vie, soit entrer dans les centres germinatifs (GC) et subir de nouveaux mécanismes de maturation.

Les GC ont été identifiés comme étant le siège principal de la génération des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes sécréteurs d'anticorps de haute affinité (Jacob et al., 1991). Les LB des GC situés dans la zone sombre, appelés centroblastes, vont initier plusieurs cycles de prolifération au cours desquels ils vont subir le phénomène d'hypermutation somatique (SHM). Ce mécanisme consiste à introduire des mutations dans les gènes codant la partie variable des Ig afin d'augmenter la diversité et l'affinité des Ig générées. Ces nouveaux clones de LB (centrocytes) migrent alors dans la zone claire du GC dans laquelle aura lieu la sélection des cellules possédant des Ig de forte affinité, formant le « compartiment mémoire » de l'immunité humorale (Kelsoe, 1996). L'hypothèse actuelle suggère que cette sélection repose sur une compétition entre les nouveaux clones générés pour interagir avec les lymphocytes T folliculaires, qui vont alors leur fournir un signal de survie. En effet, les clones produisant une Ig de forte affinité semblent posséder une meilleure capacité à capter les antigènes présentés par les DC folliculaires (Suzuki et al., 2009), à les apprêter et à les présenter aux cellules T folliculaires (Allen et al., 2007)(O'Neill et al., 2009)(Victoria et al., 2010). Les dynamiques d'entrée des LB dans les follicules et leur sélection par leur migration dans les GC représentent un mélange complexe d'interactions moléculaires, orchestrées par des gradients chimiotactiques et l'engagement du BCR, qui n'ont été élucidées que récemment (Allen et al., 2007). Ces LB sélectionnés quittent ensuite les GC sous la forme de cellules mémoires, plasmablastes ou plasmocytes (Oracki et al., 2010)(McHeyzer-Williams et al., 2012). Certaines cellules sécrétrices d'anticorps sortant des GC migrent dans la moelle osseuse au sein de « niches » pour devenir des plasmocytes à longue durée de vie.

3) Le lymphocyte B en périphérie/circulation

Des sous-populations de LB avec des fonctions individualisées, comme les B-1 et les LB de la zone marginale (MZ), ont également été identifiées. Tout d'abord décrits en 1983 par Herzenberg, les B-1 murins correspondent à une sous-population de LB unique CD5⁺ (Hayakawa et al., 1983) bien distincts des LB conventionnels (B-2) par leur phénotype, leur

localisation, leur capacité à s'auto-renouveler, ainsi que par la production d'anticorps naturels (Hardy and Hayakawa, 2001). Les cellules B-1 du péritoine sont encore séparées en deux sous-populations distinctes : les B-1a (CD5⁺) et les B-1b (CD5⁻). Leur origine, ou le fait que ces cellules dérivent du même progéniteur ou d'un progéniteur différent de celui des B-2 conventionnels, a été fortement controversé (Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007). Cependant, un progéniteur des cellules B-1, qui semble distinct d'un progéniteur de la lignée B, a été identifié dans la moelle osseuse fœtale murine, et à un degré plus faible dans la moelle adulte (Montecino-Rodriguez et al., 2006). Les cellules B-1a et les anticorps naturels qu'elles produisent leur confèrent un rôle inné dans la protection contre les infections bactériennes chez les hôtes naïfs. À l'inverse, les cellules B-1b fonctionnent indépendamment en tant que source primaire des réponses anticorps adaptatives à long terme, contre des polysaccharides et d'autres antigènes T-indépendants de type 2 (Haas et al., 2005). Les cellules B MZ correspondent à une sous-population unique de LB spléniques murins, avec des caractéristiques de LB naïfs et mémoires (Pillai et al., 2005), et constituent la première ligne de défense contre des agents pathogènes infectant le sang, comme les bactéries encapsulées.

Les sous-populations de LB B-1, MZ et LB des GC contribuent toutes au pool d'anticorps naturels circulants et à l'immunité adaptative grâce à leur différenciation terminale en plasmocytes, qui correspondent aux cellules effectrices de l'immunité humorale. L'activation des LB matures suite à leur rencontre avec l'antigène conduit initialement au développement dans les GC, mais également transitoirement à la génération de plasmocytes extrafolliculaires de courte durée de vie (*Figure 8*), qui sécrètent des anticorps de faible affinité, le plus généralement des IgM (Manz et al., 2005) et qui vont alors fournir une réponse rapide qui sera cependant moins efficace.

Les LB mémoires dérivés des GC, générés pendant la seconde semaine des réponses anticorps primaires, expriment à leur surface des BCR mutés d'affinité plus restreinte, suite à la SHM. Les LB mémoires persistent après la première rencontre avec l'antigène, s'expandent rapidement lors des réponses secondaires suite au nouveau challenge avec le même antigène, et peuvent alors se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie. Comme pour les stades précoces du développement des LB dans le foie du fœtus et dans la moelle osseuse de l'adulte, le développement des plasmocytes est très régulé par une panoplie de facteurs de transcription, dont les plus importants sont BCL6 et BLIMP-1 (ou PRDM1) (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Les titres persistants d'anticorps spécifiques d'antigènes proviennent d'abord des plasmocytes à longue durée de vie (Radbruch et al., 2006). Les réponses immunitaires primaires et secondaires conduisent à la génération de différents pools

de plasmocytes de longue durée de vie dans la rate, qui migrent ensuite dans la moelle osseuse où ils occupent l'essentiel des niches et peuvent persister ainsi tout au long de la vie sans qu'il y ait besoin d'un auto-renouvellement (Radbruch et al., 2006)(McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005). Le pool de plasmocytes présents dans la moelle ne requiert pas la contribution des LB mémoires pour leur maintien, mais lorsque ceux-ci sont déplétés, les plasmocytes sont renouvelés à partir du pool de LB mémoires (DiLillo et al., 2008). Ainsi, la persistance de la présence de l'antigène, de cytokines ou de signaux de TLR peut amener le pool de LB mémoires à se différencier de façon chronique en plasmocytes à longue durée de vie, pour une production continue d'anticorps.

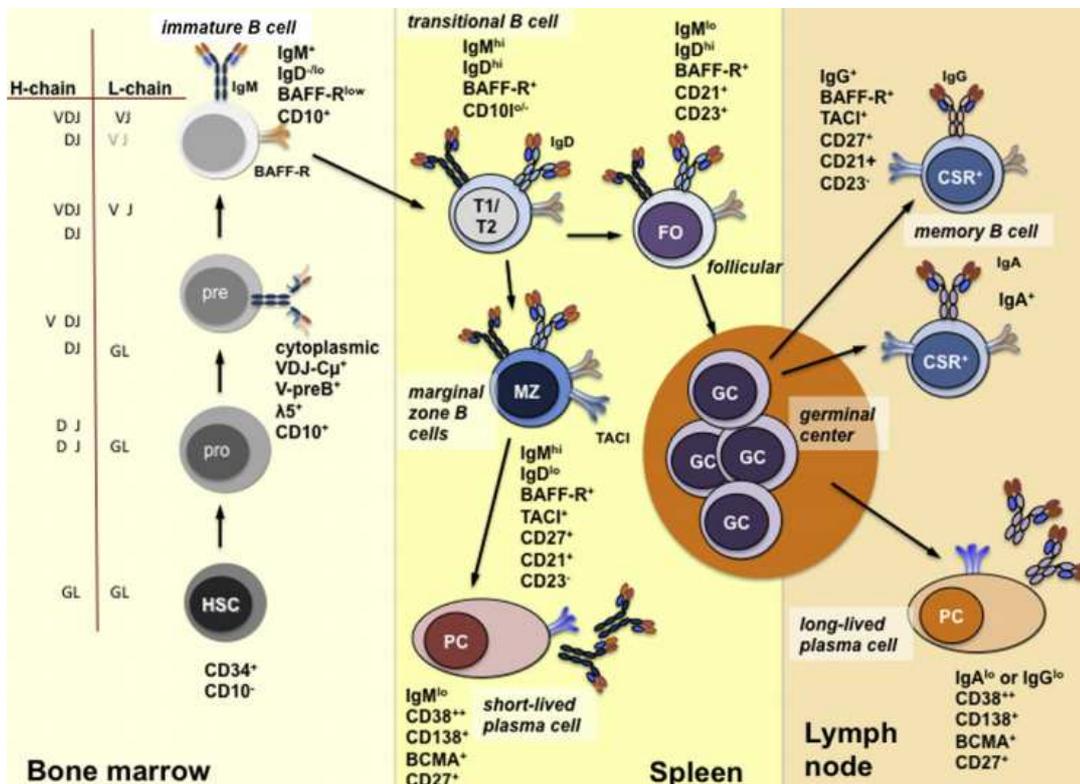


Figure 8 : Schéma représentant le développement des lymphocytes B, de la moelle jusqu'en périphérie, et les différents marqueurs qu'ils expriment (d'après Pieper et al)(Pieper et al., 2013)

4) Les facteurs de transcription régulant la maturation des LB

La sortie de LB des GC est régulée par de nombreux mécanismes impliquant des signaux physiologiques via le BCR, ainsi que des interactions avec les LT. Un des régulateurs essentiels est le B-cell lymphoma 6 (BCL6), un répresseur transcriptionnel puissant requis pour l'établissement et le maintien des GC, exprimé par les LB des GC et les lymphocytes

Tfh. La maturation des LB des GC en LB mémoires ou plasmocytes requiert la diminution de l'expression de BCL6, qui est obtenue par différents mécanismes ayant lieu dans la zone claire. L'activation du BCR par l'antigène conduit à la dégradation rapide de la protéine BCL6 (Niu et al., 1998). De plus, la stimulation médiée par les LT, via l'interaction CD40-CD40L, mène à l'induction d'IFN Regulatory Factor 4 (IRF4) dépendante du NF- κ B, un régulateur essentiel du développement des plasmocytes (Mittrücker et al., 1997). IRF4 induit la répression transcriptionnelle de BCL6 (Saito et al., 2007) et la transactivation de B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP1, codé par le gène *Prdm1*) (Sciammas et al., 2006), qui conduit à un programme régulateur associé à la différenciation en plasmocytes et à la sécrétion d'Ig (Turner et al., 1994).

Le programme transcriptionnel régulant les GC et la différenciation en plasmocytes est fortement régulé afin de permettre une réponse immunitaire rapide et appropriée. BCL6, IRF4 et BLIMP-1 interagissent ensemble au sein d'un complexe bien contrôlé, ayant lieu pendant le développement physiologique des GC. Dans les centroblastes, BCL6 se lie à son propre promoteur et inhibe donc sa propre transcription, mettant ainsi en œuvre une boucle autorégulatrice (*Figure 9A*) (Pasqualucci et al., 2003). De plus, BCL6 réprime la transcription de différents gènes impliqués dans les voies de transduction des signaux dépendants du BCR et du CD40 (Basso et al., 2010). Certains d'entre eux, comme le NF- κ B et les MAPK, répriment en retour l'expression de BCL6, impliquant ainsi l'existence de boucles de rétrocontrôle supplémentaires. BCL6 empêche aussi les LB des GC de se différencier en plasmocytes en réprimant la transcription du gène *Prdm1* (Tunyaplin et al., 2004). Simultanément, BCL6 réprime l'expression du facteur de survie BCL2, rendant les cellules plus sensibles à l'apoptose et assurant ainsi la survie et la différenciation des cellules ayant une forte affinité pour l'antigène (Saito et al., 2009). L'acétylation de BCL6 rompt cette activité répressive (Bereshchenko et al., 2002), permettant l'induction de l'expression de BLIMP-1 via IRF4 (*Figure 9B*). A son tour, BLIMP-1 contribue à la répression de la transcription de BCL6 en se fixant au promoteur de celui-ci (Shaffer et al., 2002). IRF4 contrôle non seulement la formation des GC mais également la différenciation en plasmocytes, en agissant d'une manière dose-dépendante. En effet, à faible concentration, il favorise la formation des GC et la recombinaison de classe des Ig (CSR), alors qu'à forte concentration il permet plutôt l'induction de la transcription de BLIMP-1 et donc la différenciation en plasmocytes (Sciammas et al., 2006). L'expression d'IRF4 est réprimée dans les GC, probablement par le facteur de transcription MITF (Lin et al., 2004) et est maintenue à un faible niveau dans les LB matures. Cependant, IRF4 est nécessaire pour la

génération de ces GC et pour la CSR (Ochiai et al., 2013), et est essentiel pour le développement des plasmocytes (Klein et al., 2006). En effet, dans les plasmocytes, IRF4 se lie à son promoteur, instaurant ainsi un mécanisme de rétrocontrôle positif et permettant aux plasmocytes de maintenir un niveau élevé d'expression d'IRF4 (*Figure 9C*) (Shaffer et al., 2008). BLIMP-1 n'est pas nécessaire pour les étapes précoces de différenciation en plasmocytes (Kallies et al., 2007). Il est cependant nécessaire et suffisant pour la différenciation totale des LB en cellules sécrétrices d'Ac (Shapiro-Shelef et al., 2003). La maturation du LB, de l'état de plasmablaste à celui de plasmocyte à longue durée de vie de la moelle, s'accompagne d'une forte expression de BLIMP-1, qui permet alors la répression de BCL6, favorisant alors la différenciation et le maintien de ces plasmocytes à longue durée de vie (Shapiro-Shelef et al., 2005).

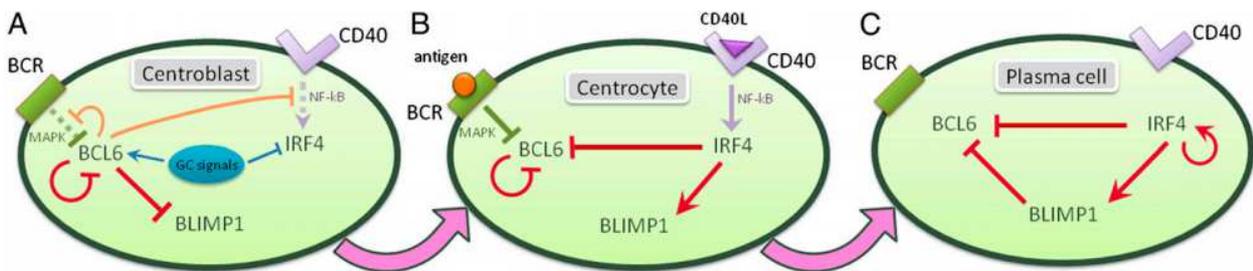


Figure 9 : Les gènes de régulation de la différenciation des lymphocytes B au sein des centres germinatifs (d'après Martínez et al)(Martínez et al., 2012)

B/La fonction des anticorps

1) Schéma d'un anticorps

L'une des fonctions les plus importantes des LB est la production d'anticorps. En effet, la réponse immunitaire humorale est induite par les LB qui exercent leur fonction via cette production. Ces anticorps sont des immunoglobulines composées d'une partie constante correspondant à l'isotype responsable de la fonction de l'anticorps et d'une partie variable qui permet la reconnaissance et la fixation spécifique des antigènes (*Figure 10*). La production de ces anticorps nécessite l'activation et la différenciation des LB naïfs suite à une rencontre avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, comme je l'ai déjà évoqué précédemment.

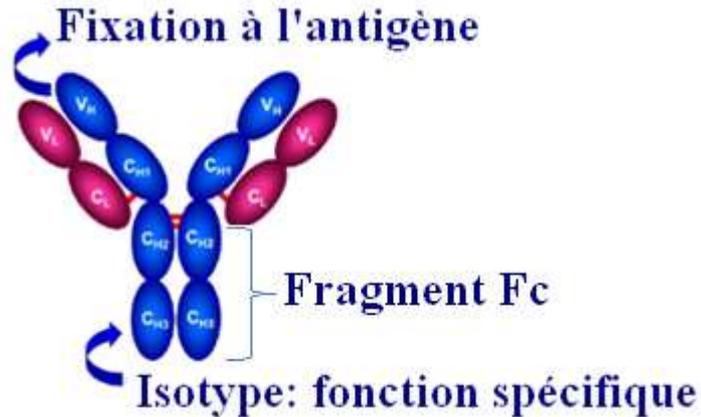


Figure 10 : Représentation schématique d'un anticorps.

V=partie variable; C=partie constante; H=chaîne lourde (heavy chain); L=chaîne légère (Light chain), Fc= Fragment cristallisable.

2) Mécanismes d'action des anticorps en transplantation et stratégies d'intervention

2.1) Les LB : des acteurs importants du rejet de greffe

En transplantation, l'action des anticorps produits par les plasmocytes dépend principalement de deux mécanismes qui sont l'activation de la cascade protéolytique du complément et le mécanisme d'ADCC. Ces mécanismes cytotoxiques sont déclenchés par la fixation des alloanticorps, notamment sur les molécules de CMH de classe I et II du donneur exprimées par les cellules endothéliales du greffon.

La cytotoxicité envers les cellules du greffon peut donc être induite via le mécanisme d'ADCC. Le fragment Fc des anticorps fixés sur les cellules cibles est reconnu par les cellules NK et les macrophages qui expriment les récepteurs aux fragments Fc. Cette reconnaissance active les NK et les macrophages, qui vont lyser les cellules cibles via la voie granzyme/perforine et induire la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que NO, ROS et TNF α .

L'activation de la voie classique (dépendante des anticorps) du complément est induite via la fixation du composant c1 sur le fragment Fc des anticorps couplés à leur antigène. La cascade enzymatique du complément aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (c5b,6,7,8,9) qui forme un canal dans la membrane cellulaire, ce qui endommage et active l'endothélium (Nakashima et al., 2002). Les cellules endothéliales

activées produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-8 et le MCP-1, qui attirent les cellules neutrophiles et les monocytes au niveau du greffon et favorisent la perméabilité vasculaire, ainsi que la sécrétion de facteurs pro-coagulants. Cette cascade d'évènements aboutit à des hémorragies, à la thrombose vasculaire et provoque l'ischémie et le rejet du greffon (Rocha et al., 2003). L'activation de la voie du complément génère également des composants tels que le c4a, c4b, c3a, c3b et c5a qui participent aux dommages tissulaires. Le c3a, le c4a et le c5a sont des anaphylatoxines qui favorisent la perméabilisation cellulaire, la chimiotaxie et participent ainsi au recrutement des leucocytes dans le greffon. Le c3b et le c4b produits se fixent aux cellules cibles et aux anticorps, favorisant la destruction du greffon par les cellules phagocytaires portant les récepteurs au complément. Le c4d issu de l'hydrolyse du c4b se dépose sur les cellules du greffon et constitue un marqueur de l'activation de la réponse humorale (Colvin and Smith, 2005). Comme la présence de DSA, la détection de dépôt de c4d sur les cellules du greffon constitue généralement un mauvais pronostic. En cas de rejet, il permet de fournir une indication sur les mécanismes induisant ce rejet et permet ainsi d'adapter les traitements immunosuppresseurs. De plus, l'équipe d'Halloran a mis en évidence que la modification de l'expression des gènes liés notamment à la dysfonction et l'activation des cellules endothéliales (ENDATs: ENDOthelial Associated Transcripts) dans le greffon semble être un meilleur signe de la présence d'un rejet à médiation humorale que la simple détection de DSA et du dépôt de C4d (Sis et al., 2009). En effet, le seul fait de la fixation des DSA sur les molécules du CMH du donneur peut activer les cellules endothéliales de façon pro-inflammatoire et induire un signal intracellulaire, favorisant la prolifération de ces cellules et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques (Li et al., 2009)(Yamakuchi et al., 2007). De plus, l'effet délétère des DSA est influencé par leur concentration, leur affinité, leur isotype et les groupements glycanes qu'ils portent au niveau du fragment Fc (Chang and Platt, 2009)(Zhang and Reed, 2009).

Il existe différentes stratégies afin de diminuer le niveau de DSA chez les patients transplantés. Comme je l'ai cité précédemment, une des approches est d'induire la déplétion des LB en utilisant des anticorps comme l'anti-CD20 (Rituximab). Cependant, cette stratégie ne permet pas d'éliminer directement les DSA circulants car l'anti-CD20 ne permet pas d'éliminer les plasmocytes, qui n'expriment plus le CD20. Néanmoins, il déplete les cellules mémoires permettant ainsi d'empêcher la différenciation de ces cellules en plasmocytes sécréteurs de DSA. D'autres stratégies comme la plasmaphérèse ou l'injection en intraveineuse d'immunoglobulines polyclonales (IVIGs) permettent, quant à elles, d'éliminer

plus rapidement les DSA circulants. L'IVIgG consiste à injecter de fortes doses d'IgG humaines purifiées à partir de nombreux donneurs sains. Il est suggéré que l'effet immunosuppresseur de ces Ig passe par leur fixation sur les DSA ce qui entrave leur fonction mais également par des mécanismes régulateurs induits par la fixation de leur fragment Fc sur les récepteurs aux Fc présents sur de nombreuses cellules comme les LB, les DC et les macrophages (Anthony et al., 2008a). D'autres stratégies faisant toujours l'objet d'études cliniques semblent prometteuses. Parmi elles le Bortezomib, inhibiteur du protéasome qui bloque la production d'anticorps et induit l'apoptose des plasmocytes (Perry et al., 2009)(Walsh et al., 2012), en association avec le dexaméthasone, est utilisé couramment chez des patients atteints de myélomes multiples. De même, le Belimumab, bloquant la voie du facteur BAFF impliqué dans la survie, la prolifération et la maturation des LB (Vugmeyster et al., 2006), a montré des résultats encourageants lors d'études cliniques de phase III et son utilisation est maintenant approuvée pour le traitement du SLE (Furie et al., 2011). La fonction des DSA passant par l'activation du complément, un anticorps monoclonal humanisé ciblant le composé C5 du complément (Eculizumab) est également en étude et apporte des résultats encourageants. Il permet d'inhiber la formation du complexe d'attaque membranaire, empêchant ainsi l'activation totale du complément (Stegall et al., 2011).

2.2) Le second rôle protecteur des LB et de leurs anticorps

Les LB peuvent également avoir un effet protecteur, révélant alors un second rôle à l'opposé de celui décrit habituellement (*Figure 11*).

En effet, dans certains modèles de xéno greffe ou d'allo greffe, il est possible d'observer la présence de DSA sans détérioration tissulaire et fonctionnelle du greffon (Koch et al., 2004). Ce phénomène appelé accommodation est généralement observé suite à une inhibition de la réponse lymphocytaire B, suivi d'un retour progressif des anticorps, et est souvent associé à l'expression de molécules cytoprotectrices. En effet, la surexpression de molécules telles que HO-1,IDO, NO, Bcl-2 et Bcl-XL qui protègent les cellules endothéliales du greffon en régulant la réponse immune, l'inflammation et l'apoptose, a été observée dans des greffons tolérés, malgré la présence de DSA (Bach et al., 1997)(Heslan et al., 2006a)(Hill et al., 2007)(Jin et al., 2005)(Soares et al., 1998). Il est suggéré que ces anticorps d'isotype particulier ne seraient pas délétères mais plutôt protecteurs vis-à-vis du greffon (Koch et al., 2004; Zhang and Reed, 2009) et pourraient être à l'origine de l'expression des molécules protectrices (Delikouras et al., 2003)(Jindra et al., 2006). Ces connaissances sont importantes en transplantation car elles ont une implication thérapeutique. En effet, l'utilisation de

certaines molécules, comme l'anti-CD20 visant à dépléter les LB afin de diminuer la production des DSA, ne ciblent pas l'ensemble des LB. Il est donc nécessaire d'identifier la population responsable de la production d'anticorps délétères pour le greffon afin d'utiliser un traitement adapté.

Les LB sont considérés comme effecteurs importants du rejet d'allogreffe, de par leur production d'anticorps (Martin and Chan, 2006), leur capacité de cellules présentatrices pouvant ainsi activer et stimuler directement des LT CD4⁺ (Crawford et al., 2006), mais également par leur capacité à migrer vers le greffon et médier localement le rejet. En effet, différents groupes ont démontré la présence de centres germinatifs ectopiques au sein des tissus greffés, appelés tissus lymphoïdes tertiaires (TLT), dans des greffons présentant un rejet chronique (Baddoura et al., 2005)(Thaunat et al., 2005). Ces TLT, ayant la même architecture que les organes lymphoïdes secondaires, contiennent des LB ainsi que des LT helper et des DC. Ils se développent *in situ* dans les greffons dans un microenvironnement très inflammatoire qui favorise ainsi une réponse immune locale importante et non régulée. De plus, le répertoire d'anticorps anti-HLA produits localement au sein de ces TLT apparaît être plus vaste et de spécificité différente de celui des anticorps produits systémiquement et observés dans le sérum (Thaunat et al., 2010a). Cependant, la présence de ces LB au sein du greffon a été démontrée comme pouvant être non pas délétère mais au contraire protectrice, soulevant ainsi le concept que les LB puissent être associés à une tolérisation du greffon plutôt qu'à un rejet de celui-ci. En effet, Brown et ses collègues ont observé des TLT au sein de greffons tolérés dans un modèle d'allogreffe rénale chez la souris, exprimant le marqueur PNAd (pour Peripheral lymph Node Addressin) qui permet d'identifier la présence d'High Endothelial Veinules (HEV), des sections de l'endothélium vasculaire spécialisées retrouvées essentiellement dans les organes lymphoïdes (Brown et al., 2011).

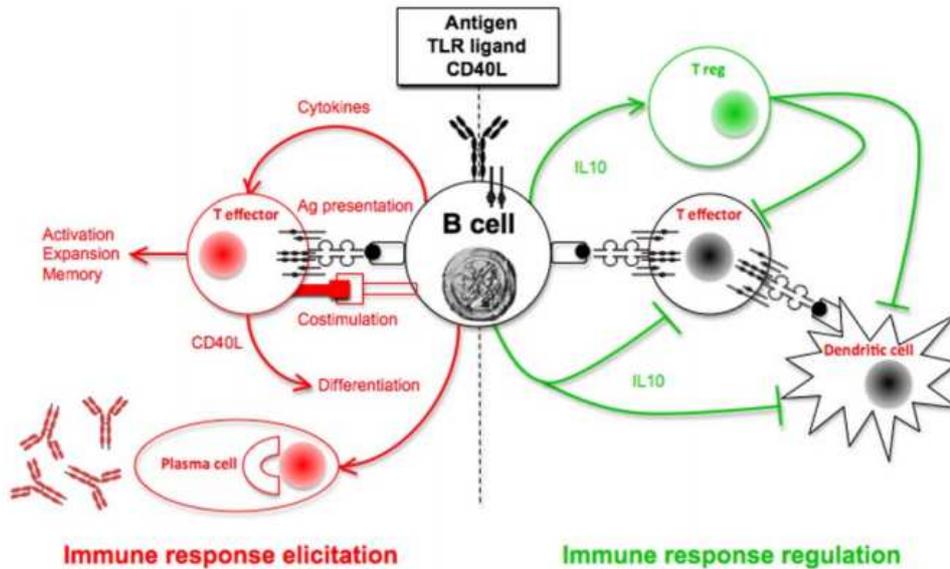


Figure 11 : Le rôle ambivalent des lymphocytes B (d'après Thaunat et al)(Thaunat et al., 2010b)

C/Emergence de lymphocytes B régulateurs

Au vue des différentes fonctions immunosuppressives des LB régulateurs, et plus particulièrement en auto-immunité, la réponse immune médiée par les LB peut aussi jouer un rôle important dans l'acceptation du greffon en transplantation. En effet, les LB sont généralement décrits comme des cellules effectrices importantes lors des réponses immunes du à leur différenciation en cellules plasmocytaires sécrétrices d'anticorps, mais également grâce à leur rôle d'APC facilitant l'activation des LT CD4⁺. Cependant, le rôle des B dans le système immunitaire s'étend au delà de ces fonctions. Au cours des dernières décennies, un nouveau rôle régulateur des LB a été mis en évidence dans de nombreux modèles murins. Depuis, de nombreuses études réalisées chez l'Homme et le rongeur démontrent des caractères communs entre les Breg de ces différents modèles. Cependant, un phénotype unique de cellules B régulatrices commun aux différentes espèces n'est à l'heure actuelle pas encore identifié.

Dès la fin des années 1960, il a été suggéré pour la première fois l'existence d'une population de cellules productrices d'anticorps capables d'exercer un effet régulateur. En 1968, Alan Morris et Göran Möller ont mis en évidence la résistance à l'immunisation par le SRBC (Sheep red blood cells) des animaux injectés avec des splénocytes producteurs d'anticorps (Morris and Möller, 1968). Par la suite, Katz, Parker et Turk ont décrit l'effet suppresseur des LB en démontrant que la déplétion des LB, dans une préparation de

splénocytes, inhibait le rôle régulateur de cette préparation sur l'hypersensibilité de contact chez le cobaye (Katz et al., 1974), suggérant déjà que ces LB représentent plus que de simples cellules productrices d'anticorps. Dans les années 1990, l'équipe de Janeway a confirmé l'existence d'une fonction régulatrice portée par les cellules B, en utilisant un modèle d'EAE (Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale) chez des souris déficientes en LB (souris μ MT) (Wolf et al., 1996). Cette étude montre que l'induction d'EAE dans ce modèle ne nécessite pas la présence de LB, mais que ceux-ci sont nécessaires à la diminution de la sévérité et à la guérison de la maladie. Les fonctions régulatrices de ces cellules ont par la suite été attribuées à des LB producteurs d'IL-10, appelés ensuite cellules B10. En 2002, des expériences de transfert réalisées par Fillatreau et ses collègues montrent que les LB naïfs, à la différence des LB IL-10^{-/-}, sont capables de réduire l'EAE chez des souris μ MT (Fillatreau et al., 2002a). Plusieurs études réalisées dans des modèles animaux ont également mis en évidence l'importance de la fonction régulatrice des B10 dans les MAI, comme les coliques chroniques, les maladies inflammatoires intestinales (IBD) (Mizoguchi et al., 1997, 2002a) ou l'hypersensibilité de contact (CHS) (Watanabe et al., 2007a). Les B10 régulent le diabète chez des souris NOD, dans lesquelles les LB sont également décrits comme impliqués dans l'induction de la maladie (Xiu et al., 2008a). Dans un modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), la déplétion des LB réduit la sévérité de la maladie (Yanaba et al., 2007a) alors que l'injection de cellules B arthritogéniques activées avec un anticorps anti-CD40 diminue l'incidence et la sévérité de la maladie via la production d'IL-10 (Mauri et al., 2003a).

1) Phénotype des LB régulateurs

1.1. Les Breg chez le rongeur

De nombreuses études réalisées chez le rongeur ont permis de démontrer l'implication des lymphocytes B dans l'induction d'une tolérance/régulation. L'une des premières, réalisée chez la souris par l'équipe de Parker, a permis de mettre en évidence l'induction d'une tolérance à l'allogreffe d'îlots pancréatiques Balb/c chez des souris C57Bl6, suite au transfert de LB du donneur et à l'administration d'un anticorps bloquant anti-CD40L huit jours avant la greffe (Wortis et al., 1995). L'année suivante, Wolf et al démontrent l'implication des LB dans la régulation du développement de la maladie et dans la guérison spontanée dans des modèles murins d'EAE (Wolf et al., 1996). La régulation de la réponse immunitaire médiée par les cellules B a ensuite été démontrée dans des modèles d'inflammation intestinale

chronique (Mizoguchi et al., 2002b), d'asthme et de CIA. Avec un nombre important de publications se penchant sur l'analyse du phénotype et de la fonction de ces cellules régulatrices, différentes sous-populations de Breg sont identifiées, en fonction de leur état de maturation mais également du modèle dans lequel elles sont mises en évidence (*Figures 12 et 14*).

Le phénotype le plus récurrent pour l'identification des Breg murins est probablement la sécrétion d'IL-10. Ces lymphocytes B régulateurs sont alors appelés B10 (se reporter à la partie III-D « Mécanismes de régulation des LB »). En dehors de cette particularité, de nombreuses études présentent des Breg murins avec différents phénotypes. Les cellules B1a, présentes au niveau de la cavité péritonéale, furent l'une des premières sous-populations de cellules sécrétrices d'IL-10 identifiées (O'Garra et al., 1992). Des cellules B de la zone marginale de la rate ayant un phénotype CD19⁺ CD21⁺ CD23⁻ CD24⁺ CD1d⁺ IgM⁺, sécrétant de l'IL-10 suite à une stimulation par le CpG (agoniste du TLR9), sont également capables de réguler les réponses immunes impliquées dans un modèle de lupus (Lenert et al., 2005). Mauri et ses collègues décrivent un phénotype de précurseurs de ces cellules, appelés T2-MZP, dans un modèle murin de CIA. Ces LB produisent de l'IL-10, ont un phénotype CD19⁺ CD21^{high} CD23⁺ CD24^{high} CD93⁺, et leur transfert adoptif chez des souris immunisées empêche le développement de la maladie, de façon dépendante de l'IL-10, puisque des LB déficients pour l'IL-10 en sont incapables (Mauri et al., 2003b)(Evans et al., 2007).

Le rôle régulateur de ces B10 (CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺) a été identifié au sein de différents modèles d'auto-immunité comme l'EAE, les IBD, le CIA et le lupus (Kalampokis et al., 2013). Les B10, qui partagent des marqueurs phénotypiques avec les cellules B1a, les T2-MZP et les cellules B de la zone marginale, correspondent à environ 1-2% des cellules B de la rate de souris naïves. L'équipe de Tedder démontre l'existence de rares B10, enrichis dans la sous-population de LB CD1d^{high} CD5⁺ dans la rate de souris naïves, sécrétant de grandes quantités d'IL-10 en réponse à de forts stimuli (Yanaba et al., 2008a). De plus, une autre étude a démontré que cette sous-population de LB CD5⁺ CD1d⁺ IL-10⁺ pouvait, *in vitro*, être sensiblement augmentée suite à une stimulation avec BAFF (B cell Activating Factor) et contribuer à diminuer le développement d'arthrite induite par le collagène suite à un transfert adoptif (Yang et al., 2010). En effet, BAFF a été démontré comme nécessaire pour la transition des LB du stade immature T1 au stade transitionnel T2 et essentiel pour le développement des LB de la zone marginale (Schneider et al., 2001). De façon intéressante, la protéine TIM-1 est exprimée par la majorité des cellules Breg murines, et le transfert de ces cellules TIM-1⁺ IL-10⁺, obtenues à partir de n'importe quelle sous-population de LB de la

rate, peut directement induire une tolérance à l'allogreffe d'îlots (Ding et al., 2011). En revanche, certaines études décrivent des LB régulateurs exerçant leur rôle suppressif via des mécanismes indépendants de l'IL-10 (Montandon et al., 2013).

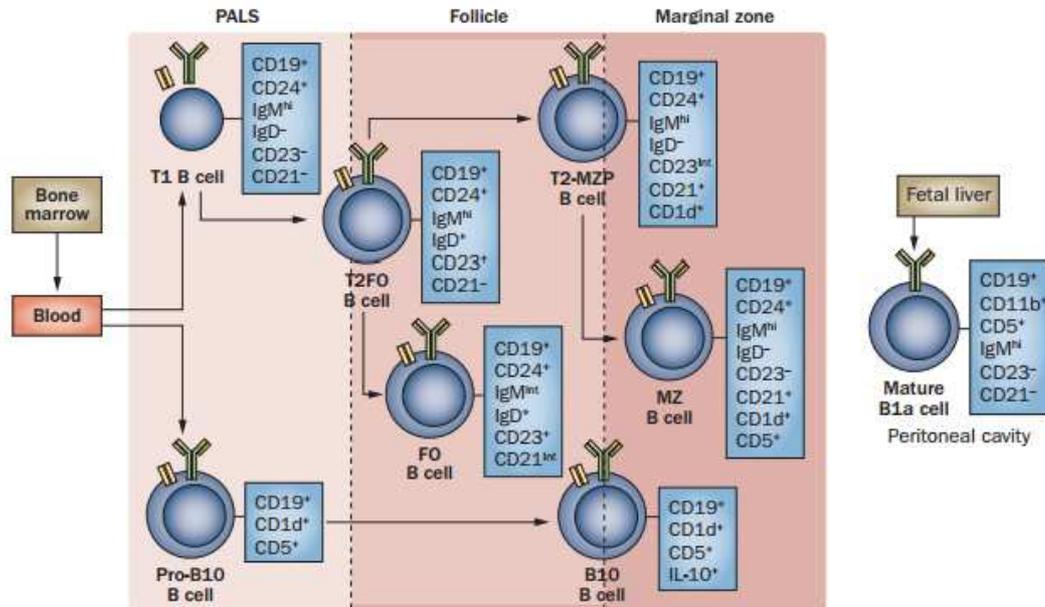


Figure 12 : Schéma représentant les différentes sous-populations de lymphocytes B régulateurs chez la souris (d'après Stolp, Turka et Wood)(Stolp et al., 2014)

Peu d'études se sont intéressées à des modèles chez le rongeur autres que murins. En effet, Yan et ses collègues ont montré pour la première fois un rôle des LB dans l'induction d'une tolérance à l'allogreffe dans un modèle de greffe rénale CMH-incompatible chez le rat. Ils ont démontré que l'injection intraveineuse de LB de la rate du donneur le jour de la greffe permettait d'instaurer une tolérance supérieure à 300 jours chez les rats greffés (Yan et al., 2002). De plus, cette tolérance était spécifique des LB puisque le transfert de LT du donneur n'induisait pas de tolérance.

1.2. Les Breg chez l'Homme

L'existence de LB régulateurs chez l'Homme a été suggérée par différentes équipes. Comme pour la souris, le phénotype de ces cellules est très variable selon les études (Figures 13 et 14). Duddy et ses collègues ont observé une diminution des LB producteurs d'IL-10 chez des patients atteints de sclérose en plaques (MS) (Duddy et al., 2007). L'équipe de Mauri

a mis en évidence chez des patients atteints de SLE une diminution de LB immatures enrichis dans la sous-population $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high}$, sécrétant de grandes quantités d'IL-10 et exerçant des fonctions suppressives sur la sécrétion de $TNF\alpha$ et d' $IFN\gamma$ par des LT autologues (Blair et al., 2010a). Des sous-populations de B_{reg} équivalente aux B10 murins sont également identifiées chez l'Homme. En effet, bien que la plupart des publications décrivent un phénotype de B_{reg} transitionnelles/naïves, certaines équipes les identifient chez l'Homme parmi le pool de LB mémoires, ou ayant des marqueurs de LB mémoires tels que le CD27 et le CD148 (Iwata et al., 2011)(Khoder et al., 2014). De plus, des LB $CD19^+ CD24^{high} CD38^{high} CD5^{high} IgD^+$ ayant des propriétés suppressives et induisant une expansion de T_{reg} *in vitro* ont également été identifiés (Lemoine et al., 2011). L'action des B_{reg} ne semble pas se limiter aux MAI.

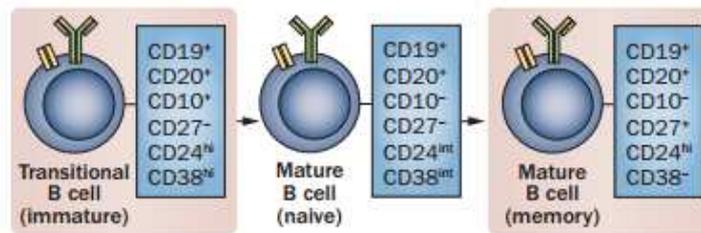


Figure 13 : Schéma représentant les différentes sous-populations de lymphocytes B régulateurs dans le sang périphérique chez l'Homme (d'après Stolp, Turka et Wood)(Stolp et al., 2014)

Une caractéristique unique décrite pour les LB produisant de l'IL-10, en comparaison avec d'autres sous-populations de LB, est une forte expression de la molécule de surface CD1d (Mizoguchi et al., 2002b)(Yanaba et al., 2008a), qui est nécessaire pour la présentation de glycolipides et phospholipides antigéniques aux cellules NKT. Un rôle important des LB $CD1d^{high}$ dans l'induction d'une tolérance immune à travers l'activation des cellules NKT a été démontré dans différents modèles murins (Sonoda and Stein-Streilein, 2002) (Wei et al, PNAS USA 2005). Cependant, les cellules NKT peuvent également avoir des fonctions stimulatrices, et il est maintenant clair que la fonction immuno-stimulatrice ou régulatrice de ces cellules dépend de leur activation préalable (Hayakawa et al., 2001).

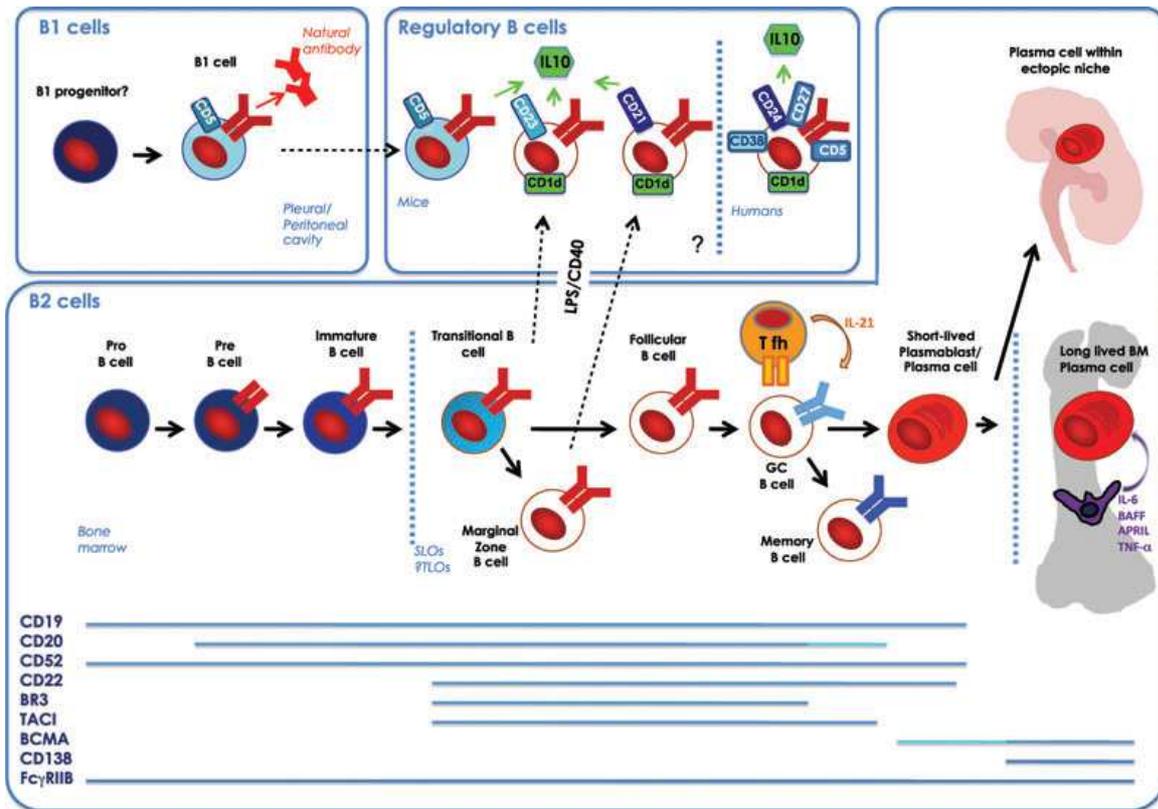


Figure 14 : Schéma représentant le développement des lymphocytes B effecteurs et régulateurs (d'après Clatworthy)(Clatworthy, 2011)

2) Induction de LB régulateurs

L'apparition de ces phénotypes de cellules régulatrices nécessite un signal activateur pour le LB pour induire cette fonction. De nombreuses molécules semblent impliquées dans ce phénomène, comme le BCR, la molécule CD40 ou les TLR.

2.1. Le CD40

La molécule CD40 exprimée à la surface du LB et son interaction avec son ligand CD40L (CD154), exprimé par les LT, a précédemment été identifiée comme induisant la maturation des LB en cellules sécrétrices d'anticorps (Banchereau et al, Annu Rev Immunol 1994). A l'inverse, une stimulation prolongée via le CD40 conduit à un effet inhibiteur sur la sécrétion de ces anticorps (Miyashita et al., 1997). De nombreuses études ont identifié l'interaction CD40-CD40L comme une voie de signalisation essentielle pour l'induction et l'activation des LB régulateurs.

En effet, contrairement au transfert de LB de souris naïves, le transfert de LB isolés de souris déficientes pour le CD40, ou le transfert de LB pré-incubés avec un anticorps bloquant

anti-CD40 ne sont pas capables de supprimer les réponses T autoréactives ni l'inflammation du colon observés dans un modèle de colite chez des souris déficientes pour le TCR α et l'IgM (Mizoguchi et al., 2000). De plus, les souris déficientes pour le CD40, avec une déficience restreinte aux LB, souffrent d'une forme plus sévère d'EAE et présentent une diminution importante de la production d'IL-10 et une augmentation des réponses Th1 et Th17. Ces études suggèrent alors un lien entre la stimulation du CD40 et une capacité immuno-régulatrice des LB. Par la suite, il a été démontré que la stimulation de splénocytes avec un anticorps agoniste anti-CD40 induisait l'apparition d'une sous-population de cellules B régulatrices réduisant fortement l'arthrite en apportant de l'IL-10 (Mauri et al., 2003b) (Evans et al., 2007). Dans un modèle de transplantation chez la souris, la tolérance à l'allogreffe est induite par l'administration d'un anticorps anti-CD45RB et est obtenue seulement lorsque des cellules B sont présentes (Deng et al., 2007). Des souris déficientes en LB (μ MT) reconstituées avec des LB déficients en CD45RB ne présentent pas de tolérance à l'allogreffe. L'induction de tolérance requiert l'expression des molécules B7, CD40 et ICAM-1 par les LB, suggérant que la tolérance médiée par les LB est dépendante d'une interaction directe LT/LB. En revanche, la production d'IL-10 par les LB ne semble pas avoir de rôle dans l'induction de tolérance puisque la neutralisation de l'IL-10 ou la reconstitution des souris μ MT avec des LB déficients en IL-10 n'affectent pas cette tolérance. Ces données démontrent que l'activation des LB via le CD40 est un facteur important pour fournir à ces LB des capacités suppressives, même si auparavant l'interaction CD40-CD40L était considérée nécessaire pour la maturation des LB (Kehry, 1996). Chez l'Homme, une déficience de la voie de signalisation du CD40 chez les patients atteints de lupus rend les Breg inefficaces, suggérant que le CD40 peut aussi être impliqué dans leur mécanisme d'action (Blair et al., 2010b). Ceci confirme d'autres observations, suggérant qu'une forte stimulation, comme celle obtenue avec les anticorps anti-CD40, peut induire l'arrêt de la maturation des LB, restaurer l'apoptose et conduire à la production d'IL-10 (Mauri et al., 2003b)(Callard et al., 1995).

2.2. Le BCR

Bien que la molécule CD40 soit importante pour le développement des Breg, le récepteur à l'antigène des LB semble également être nécessaire. En effet, il a été démontré que des souris déficientes en CD19, un corécepteur optimisant les signaux du BCR, développaient une EAE plus importante que celle observée chez des souris contrôles (Sato et al., 1996)(Sato et al., 1995). Dans un autre modèle murin d'hypersensibilité de contact, une

déficiences du CD19 provoquent une aggravation de la maladie associée à une diminution de la production d'IL10 et une augmentation de la sécrétion d'IFN γ (Watanabe et al., 2007b). Ceci est également confirmé par des études chez des souris sur-exprimant CD19, pour lesquelles il est observé une production plus importante d'IL-10 et un meilleur contrôle du développement de la maladie (Yanaba et al., 2008a), suggérant que la signalisation du BCR est importante dans le développement de cellules B régulatrices.

2.3. Les Toll Like Receptors

Les Toll-Like Receptors (TLR) sont des PRR reconnaissant des motifs microbiens conservés qui informent les cellules de l'hôte de la présence de signaux de danger. Bien que les TLR soient critiques pour la défense de l'hôte, l'activation des cellules via ceux-ci peut contribuer au développement de réponses inflammatoires et auto-immunes (Marshak-Rothstein, 2006). Cependant, la signalisation via certains de ces TLR peut médier un effet protecteur dans l'auto-immunité. En effet, alors que des souris MRL/lpr (susceptibles au développement de lupus) déficientes en TLR7 ne développent pas spontanément de lupus, celles déficientes en TLR9 présentent une maladie exacerbée (Christensen et al., 2006). L'activation via les TLR participe aussi à la mise en jeu des Breg. En effet, la stimulation de LB de la zone marginale par du CpG-ODN (ligand du TLR9) provoque la sécrétion d'IL-10, capable d'inhiber la sécrétion d'IL-12 et donc le contrôle de la réponse immune Th1 (Lenert et al., 2005). De même, la stimulation des TLR2 et TLR4 mais pas du TLR9 permet aux LB de produire de l'IL-10 et de protéger les souris de l'apparition d'EAE.

3) Des LB régulateurs dans différents modèles

3.1. Les Breg en cancérologie

En cancérologie, des Treg ont été identifiés dans différents types de cancers et leur activité immunosuppressive facilite souvent la progression des tumeurs, le plus généralement en inhibant l'activité cytotoxique des réponses T CD8⁺. Bien qu'un nombre élevé de Treg ne corrèle pas toujours avec un mauvais pronostic, il est clair que ces cellules peuvent exercer des fonctions inhibitrices sur d'autres cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. L'existence de lymphocytes B possédant des caractéristiques communes avec les Breg a donc été étudiée, et des preuves de ces fonctions ont été apportées par différentes publications. En effet, dans un modèle d'adénocarcinome mammaire murin, une sous-population de LB CD19⁺

B220⁺ CD25⁺ (appelée tBreg) a été identifiée comme favorisant la progression tumorale et la formation de métastases (Olkhanud et al., 2011). Cette sous-population se trouve augmentée dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires suite à l'injection de cellules tumorales près des glandes mammaires d'une souris. Ces LB exercent leur pouvoir régulateur en inhibant la prolifération des LT et, via la sécrétion de TGFβ, induisent la différenciation de LT CD4⁺ conventionnels en Treg. De même, des LB sécrétant de l'IL-10, apparentés ainsi à des B10, ont été retrouvés dans un modèle murin de carcinogénèse de la peau, chez qui la production de cette cytokine empêchait la sécrétion d'IFNγ par les LT CD8⁺. De plus, lors d'études réalisées suite à des thérapies ciblées avec un anticorps anti-CD20, il est apparu que les LB sécrétant de l'IL-10 pouvaient être responsables du développement d'une résistance du lymphome à ce traitement (Horikawa et al., 2011). En effet, le transfert de cellules B cancéreuses CD1d^{high} CD5⁺ IL-10⁺ chez des souris un jour avant le traitement avec l'anti-CD20 induit une augmentation importante de la masse tumorale, alors que le transfert de cellules B déficientes en IL-10 n'a aucun effet. Plus récemment, une étude chez l'Homme a démontré que la cytokine IL-21 combinée à une activation du BCR induisait des Breg exprimant Granzyme B qui résidaient alors dans le microenvironnement de différents types de tumeurs telles que des carcinomes mammaires, ovariens, colorectaux, ... (Lindner et al., 2013). Ces LB bien qu'ils expriment Granzyme B, n'expriment pas de perforine, sont enrichis dans la sous-population CD19⁺ CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ CD147⁺ CD38⁺ CD69⁺ CD5^{neg} et expriment également l'IL-10 en quantité plus faible. Ces LB inhibent alors la prolifération des LT CD4⁺ via le Granzyme B qu'ils sécrètent en dégradant un substrat du Granzyme B récemment identifié, la chaîne zeta ζ du TCR, sans pour autant induire d'apoptose des LT. Ces LB Granzyme B⁺ peuvent ainsi contribuer à la modulation des réponses immunitaires adaptatives via des mécanismes semblables aux Treg, permettant ainsi l'échappement tumoral.

3.2. Les Breg en autoimmunité

Il existe toute une série de points de contrôle qui régulent normalement la sélection des cellules B, présents à la fois au niveau de la moelle et dans les tissus lymphoïdes périphériques. Puis dans ces tissus, un deuxième processus d'élimination des cellules réactives avec des auto-antigènes périphériques est mis en place, conduisant à l'apoptose, le « receptor editing » ou à l'anergie (Goodnow et al., 1990). Le résultat de ces processus est la production d'une population diverse de cellules B capables de produire des anticorps

effecteurs de forte affinité pour leur antigène, et parmi lesquelles les LB auto-réactifs ont été éliminés. Cependant, la perturbation de ce fragile équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs qui régulent l'activation et la durée de vie normales de ces lymphocytes B peut prédisposer à une production d'auto-anticorps pathogènes et à l'apparition d'auto-immunité. Les auto-anticorps représentent des acteurs importants des réponses immunitaires adaptatives, qui sont dirigés de façon inappropriée contre les tissus du soi (Lipsky, 2001). L'identification des auto-anticorps et de facteurs rhumatoïdes pendant les années 1950 à 1970 a déclenché un changement de paradigme selon lequel les maladies du tissu conjonctif, comme l'arthrite rhumatoïde, correspondraient en fait à des maladies auto-immunes. L'identification d'auto-anticorps chez des patients atteints de glomérulonéphrite en 1949 a fourni la première preuve expérimentale et clinique que la maladie était due à une réaction continue antigène-anticorps spécifique d'organe (Lange and Gold, 1949). Bien qu'une corrélation étroite entre la production d'auto-anticorps et les maladies auto-immunes systémiques soit reconnue de façon universelle, le rôle précis des auto-anticorps et de leur auto-antigène cible dans la pathogénèse de la maladie reste encore à déterminer dans de nombreux syndromes chez l'Homme. De plus, les LB peuvent contribuer à la pathogénèse de l'auto-immunité par la présentation aux LT d'auto-antigènes, ou via la production de cytokines pro-inflammatoires (Shlomchik, 2008). Un exemple frappant de la dérégulation de gènes contrôlant l'apoptose, conduisant à l'apparition d'une auto-immunité, apparaît chez la souris transgénique pour BCL-2. La surexpression de BCL-2 permet la survie inappropriée de clones de LB auto-réactifs qui sont normalement éliminés par les phénomènes de sélection négative et d'apoptose. Les souris transgéniques pour BCL-2 développent des anticorps anti-nucléaires, des dépôts de complexes immuns et des glomérulonéphrites. Les souris MRL, homozygotes pour les mutations des gènes de Fas ou FasL (respectivement identifiées comme des phénotypes *lpr* et *gld*), développent spontanément une MAI semblable au SLE humain (Cohen and Eisenberg, 1991). De faibles altérations dans les voies de signalisation influençant les réponses des BCR aux auto-antigènes sont suffisantes pour induire une prédisposition des souris et possiblement de l'Homme à la production d'auto-anticorps et à l'auto-immunité. En effet, des souris ayant un phénotype lymphoprolifératif partagent des similitudes avec le syndrome Canale-Smith, un désordre de l'enfance caractérisé par une lymphadénopathie et une auto-immunité dues à de nouvelles mutations de Fas (Drappa et al., 1996). Il est devenu évident que les LB contribuaient en grande partie à de multiples MAI humaines. Des thérapies plus ciblées et donc moins toxiques se sont alors concentrées sur la restauration de la fonction normale des

LB et sur l'élimination des auto-anticorps pathogènes, afin de réduire l'utilisation des immunosuppresseurs.

a) Modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA)

Le modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), équivalent murin de l'arthrite rhumatoïde, est caractérisé par une infiltration de LT CD4⁺ dans la membrane synoviale et par la production par les LB d'auto-anticorps spécifiques du collagène (Yanaba et al., 2008b). La déplétion des LB chez ces souris, avant l'immunisation par le collagène, via l'administration de l'anticorps monoclonal anti-CD20 a permis d'améliorer significativement la sévérité de la maladie (Yanaba et al., 2007b) avec un faible effet toxique et est devenu ainsi un traitement thérapeutique standard pour l'arthrite rhumatoïde et de plus en plus pour d'autres MAI. Cependant, la déplétion de ces cellules après l'immunisation n'a provoqué aucun changement d'état de la maladie, suggérant un rôle régulateur des LB plus important pendant l'initiation de la maladie. Une étude du groupe de Mauri a permis de mettre en évidence des LB régulateurs IL-10⁺ dans ce modèle (Mauri et al., 2003b). En effet, l'activation *in vitro* de LB arthritogéniques de la rate avec du collagène et un anticorps monoclonal anti-CD40 induit une production d'IL-10. Une fois injectés chez des souris DBA/1 plus sensibles au développement de la maladie, ces LB IL-10⁺ réduisent significativement l'incidence et la sévérité de la CIA suite à l'immunisation avec le collagène. Cet effet via l'IL-10 est ensuite confirmé par le fait que l'injection de LB arthritogéniques pré-incubés avec des anticorps anti-IL-10/IL-10R ne permet pas de protéger les souris receveuses de l'apparition de la maladie. De plus parmi ces cellules, il a été démontré que seuls les LB de la zone marginale T2-MZP étaient capables de significativement retarder voire d'empêcher le développement de l'arthrite chez des souris receveuses.

b) Modèle de lupus

Le lupus érythémateux systémique (ou SLE), équivalent murin du lupus, est une MAI systémique caractérisée par une forte production d'auto-anticorps, un dépôt de complexes immuns important et une détérioration de multiples organes. Deux modèles murins développant spontanément un lupus sont utilisés afin d'étudier les mécanismes mis en jeu dans le développement de la maladie et ont contribué tous les deux à l'identification de sous-populations de LB régulateurs.

Dans le modèle de souris hybrides NZB/NZW, caractérisé par une expansion de LB B-1a et MZ et de forts taux d'IgM et d'IgG dans le sérum, il a été démontré que l'injection de l'anticorps anti-CD20 chez des souris âgées de 12 à 28 semaines permettait de retarder significativement l'apparition de la maladie. En revanche, lorsque le traitement était réalisé chez des souris de 4 semaines, celui-ci induisait le développement de la maladie, probablement du à la déplétion des LB produisant de l'IL-10 (Haas et al., 2010), qui se développent généralement chez la souris jeune (Matsushita et al., 2010). L'utilisation de souris NZB/NZW déficientes en LB (KO pour le CD19) a démontré une production d'auto-anticorps remarquablement diminuée mais en revanche une apparition de la maladie beaucoup plus précoce comparé à des souris NZB/NZW naïves. De plus, le transfert de B10 de la rate de ces souris naïves à des souris déficientes en LB prolonge significativement la survie de ces souris, accompagné d'une expansion de Treg, ce qui suggère ici encore un rôle protecteur de ces B10 (Watanabe et al., 2007b)(Watanabe et al., 2010). Ainsi, différentes sous-populations de LB peuvent jouer un rôle tantôt pathogénique, tantôt protecteur dans l'apparition de la maladie.

Dans le second modèle murin de lupus, MRL/lpr, l'équipe de Blair a démontré que le transfert de Breg T2 induits *in vitro* par un anticorps anti-CD40 améliorait de façon significative la sévérité de la maladie et la survie de ces souris, et ce de manière dépendante de l'IL-10 (Blair et al., 2009).

Chez l'Homme, de nombreuses études ont permis d'observer des résultats similaires à ceux obtenus chez la souris. L'équipe de Mauri a identifié une sous-population de LB immature transitionnels CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} dans le sang d'individus sains, capables de produire de l'IL-10 suite à une stimulation *in vitro* avec un anticorps anti-CD40. Cependant, chez des individus atteints de lupus, cette sous-population de LB en était incapable (Blair et al., 2010b). De façon intéressante, les patients ayant reçu un traitement avec l'anti-CD20 (Rituximab) ont montré un ratio élevé de LB CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} par rapport aux cellules B mémoires, ce qui supporte l'hypothèse que la déplétion des LB induit une expansion de LB tolérogènes (Anolik et al., 2007). Tedder et ses collègues ont identifié une sous-population de LB B10 CD24^{high} CD27⁺ beaucoup plus fréquente dans le sang de patients atteints de différentes MAI, dont le lupus, comparé à des individus sains (Iwata et al., 2011).

Bien que les récentes études ne permettent pas de concilier les différents phénotypes des Breg, il est clair que des Breg existent dans le sang chez l'Homme, et ceux-ci possèdent des fonctions régulatrices la plupart du temps dépendantes de la sécrétion d'IL-10.

c) Modèle de sclérose

La sclérose en plaques, ou SEP, est une MAI qui résulte en la démyélinisation des fibres nerveuses du système nerveux central, médiée par des LT CD4⁺ spécifiques d'auto-antigènes tels que la MOG. Dans le modèle équivalent murin, l'EAE, des études ont suggéré selon le moment de l'induction de l'EAE un rôle soit pathogène soit protecteur des LB dans l'apparition de la maladie. En effet, il a été reporté que des souris déficientes en LB développaient une forme plus sévère et non-rémittente de la maladie (Fillatreau et al., 2002b). Cependant, la déplétion de LB CD20⁺ après le développement de l'EAE supprime fortement les symptômes de la maladie (Bouaziz et al., 2008). Bien que cette déplétion améliore la progression de la maladie, la déplétion des LB avant l'induction de l'EAE exacerbe les signes cliniques, ce qui suggère que les LB régulant les réactions inflammatoires sont possiblement délétés (Matsushita et al., 2008). De plus, les propriétés régulatrices des LB dans l'EAE ont été démontré comme étant dépendantes de la production d'IL-10, puisque le transfert adoptif de LB chez des souris μ MT déficientes en LB diminuait la sévérité de la maladie, contrairement à des LB déficients pour l'IL-10 (Fillatreau et al., 2002b).

Chez des patients atteints de sclérose, la déplétion des LB avec le Rituximab semble être plus efficace après l'apparition des symptômes et peut ainsi améliorer la progression de la maladie (Hauser et al., 2008).

d) Modèle de diabète de type 1

Le diabète de type 1 est caractérisé par la destruction des cellules β du pancréas produisant l'insuline, médiée tout d'abord par les LT CD4⁺ et CD8⁺. Chez la souris NOD, modèle spontané du diabète humain, les LB semblent jouer un rôle pathogène dans l'initiation de la maladie. En effet, les LB sont parmi les premières cellules à infiltrer les îlots pancréatiques chez la souris NOD, où elles s'organisent avec des LT sous la forme de structures lymphoïdes au sein des GC, ce qui permet la sélection des LB autoréactifs (Kendall et al., 2007). Puisque les souris NOD déficientes en LB ne développent pas de diabète, cibler les LB semble alors être une approche intéressante pour contrer le développement de cette MAI. Comme pour l'EAE, la fenêtre de temps pour dépléter des LB ou transférer des Breg est très importante car des changements dans la balance immunologique peuvent conduire soit à une exacerbation soit à une amélioration de la progression de la maladie. Une déplétion des LB avec le Rituximab chez la souris NOD jeune diminue l'insulite et empêche le

développement du diabète chez plus de 60% des souris, alors que si elle est réalisée chez la souris plus âgée, elle retarde seulement l'apparition de la maladie (Xiu et al., 2008b). De plus, des études de Smith et Tedder ont suggéré que des Breg, comme les B10, pouvaient représenter une partie importante du pool de LB reconstitué après la déplétion des LB (Smith and Tedder, 2009). Des transferts répétés de LB activés chez des souris NOD de 5 ou 6 semaines retardent l'apparition et diminuent la sévérité du diabète. En revanche, si les injections sont initiées chez des souris âgées de 9 semaines, celles-ci retardent juste le déclenchement de la maladie (Hussain and Delovitch, 2007). De plus, cette protection est dépendante de l'IL-10 puisque des injections de LB activés déficients pour l'IL-10 ne sont pas capables de protéger de l'apparition du diabète ni de réduire la sévérité de la maladie. Chez l'Homme, une étude de phase II randomisée a démontré que le traitement avec le Rituximab chez des patients diabétiques permettait de préserver de façon significative la sécrétion d'insuline endogène contrairement au placebo (Pescovitz et al., 2009). Cependant, l'effet était transitoire et le bénéfice thérapeutique disparut dès que les nouveaux LB émergèrent.

Une étude récente de l'équipe de Zavala a permis de mettre en évidence le rôle régulateur de cellules progénitrices pro-B dans le développement du diabète chez la souris NOD (Montandon et al., 2013). En effet, le transfert adoptif de cellules B de la MO $c\text{-kit}^{\text{low}}$ $\text{Sca-1}^{\text{low}}$ B220^+ IgM^- , induites par une stimulation *in vitro* avec du CpG, chez une souris de 6 semaines induit une protection contre le développement du diabète. Ces cellules B protectrices correspondent à des cellules pro-B avec un phénotype CD19^{low} CD5^- . Ces cellules expriment également le marqueur CD1d, à un niveau intermédiaire entre l'expression des LB folliculaires (CD1d^{low}) et celle des LB de la zone marginale ($\text{CD1d}^{\text{high}}$). Suite au transfert, ces cellules migrent à près de 50% dans le pancréas dès le cinquième jour, où elles acquièrent un phénotype IgM^{low} $c\text{-kit}^+$, puis le pourcentage diminue progressivement jusqu'à disparaître trente jours après l'injection. En effet, ces LB protecteurs sortent du pancréas et migrent vers la rate entre le dixième et le vingtième jour post-transfert pour se retrouver présents à plus de 65%, et sont encore détectés plus de trois mois après le transfert. Au sein de la rate, les LB injectés deviennent alors $c\text{-kit}^-$ B220^+ CD43^- IgM^+ IgD^+ CD1d^+ $\text{CD5}^{-/\text{low}}$ et correspondent à des cellules B matures, en grande majorité des LB folliculaires et des MZ. Ces cellules pro-B protectrices vis-à-vis du diabète exercent leur effet en supprimant fortement l'expansion des LT effecteurs et en induisant leur apoptose via une surexpression de FasL médiée par l'IFN γ . De façon intéressante, ces cellules sont également induites *in vivo* 18h après une injection de CpG, et possèdent les mêmes propriétés suppressives que celles obtenues *in vitro*.

3.3. Les Breg dans la tolérance à long terme

De nombreuses études chez le rongeur et l'Homme ont permis de démontrer l'implication de cellules B régulatrices dans l'induction d'une tolérance suite à une greffe. Niimi et ses collègues ont démontré le rôle de tels LB en induisant une tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris en transférant des cellules B « au repos » (c'est-à-dire incompetentes ou incapables de jouer leur rôle d'APC) et en administrant un anticorps anti-CD40L quatorze jours post-greffe. Une autre étude de Deng a montré qu'un court traitement avec un anticorps anti-CD45RB suite à une allogreffe cardiaque évitait le rejet, et que cette tolérance était médiée par les LB puisqu'une tolérance n'était pas induite chez une souris déficiente en LB, mais était restaurée par le transfert de LB (Deng et al., 2007). Plus récemment, une étude chez la souris diabétique, suite à une allogreffe d'ilots pancréatiques et combinant les traitements avec des anticorps anti-CD45RB et anti-TIM-1, a permis de démontrer que le transfert de LB permettait de prolonger la survie des greffons, alors que ce n'était pas le cas lorsque les LB injectés étaient déficients en IL-10 (Lee et al., 2014)(Lee et al., 2012). De plus, la déplétion en Treg par un anticorps anti-CD25 dans ce modèle avant la greffe conduit à un rejet du greffon, ce qui suggère que l'induction de la tolérance est également dépendante de l'interaction entre les Breg TIM-1⁺ et les Treg. Une étude réalisée par notre équipe, dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat suite à un traitement court avec l'immunosuppresseur LF15-0195 (voir partie Résultats), a permis de démontrer au sein des greffons tolérants des LB organisés en « clusters » sécrétant de l'IgM mais pas d'IgG et donc bloqués au niveau du switch de leur immunoglobulines (Le Texier et al., 2011). Il a également été démontré une accumulation de LB dans le sang des rats tolérants, présentant un phénotype inhibé avec une diminution du ratio des transcrits IgG/IgM et une forte augmentation des transcrits BANK-1 et FcγRIIb comparé à des rats en rejet chronique. De plus, ces LB sont capables d'induire une tolérance à long terme lors d'un transfert adoptif de LB de la rate d'animaux tolérants.

Comme décrit précédemment (Partie II-B « Stratégies d'induction de la tolérance »), de nombreuses études démontrent une signature de Breg chez des patients opérationnellement tolérants à une greffe rénale suite à l'arrêt de leur traitement immunosuppresseur (Newell et al., 2010)(Sagoo et al., 2010)(Pallier et al., 2010). Newell et Sagoo montrent l'expansion de LB naïfs/transitionnels dans le sang de ces patients, alors que l'équipe de Brouard suggère que ces patients ont une augmentation de LB avec un phénotype CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺ inhibé avec un ratio FcγRIIa/b diminué et une accumulation de BANK-1. Plus récemment, cette

même équipe montre un défaut de différenciation *in vitro* des LB de ces patients opérationnellement tolérants avec donc un manque de cellules plasmocytaires CD38⁺ CD138⁺, mais également une sensibilité accrue à l'apoptose de ces LB dans les étapes tardives de différenciation (Chesneau et al., 2014). De plus, ces LB sécrètent plus d'IL-10 suite à une stimulation *in vitro*.

De façon intéressante, lors de la grossesse, qui correspond à un autre état de tolérance aux alloantigènes, une population de Breg CD19⁺ CD24^{high} CD27⁺ est induite afin de maintenir la tolérance au fœtus (Rolle et al., 2013). Ces LB présents chez la mère produisent de fortes quantités d'IL-10 et suppriment la production de TNF α par les LT effecteurs lors d'une co-culture.

D'autre part, les apiculteurs qui bénéficient d'une tolérance à long terme aux allergènes de venin d'abeille, possèdent une sous-population de Breg CD25^{high} CD71^{high} qui produit des anticorps d'isotype particulier : l'IgG4 (van de Veen et al., 2013). En effet, les vaccins à base de venin d'abeille induisent la production d'anticorps IgG4 spécifiques de l'allergène capables d'inhiber les interactions IgE/allergène et de favoriser l'expansion de Treg (Meiler et al., 2008).

D/Mécanismes de régulation des lymphocytes B

Comme décrit précédemment, une balance entre l'inflammation et l'immuno-régulation est nécessaire afin de contrôler les réponses immunitaires mises en place suite à une agression de l'organisme et ainsi éviter le développement de MAI, la prolifération excessive ou la survie de cellules normalement éliminées.

Les mécanismes d'immunosuppression sont multiples et médiés par une grande variété de cellules (comme décrit dans la Partie II-B « Stratégies d'induction de la tolérance »). Bien que les fonctions des LB en tant que CPA et cellules sécrétrices d'anticorps et de cytokines aient été largement étudiées, leurs fonctions immunosuppressives ont reçu peu d'attention par rapport aux autres cellules régulatrices jusqu'à ces dernières années. Cependant, la plupart des mécanismes immunosupresseurs auparavant attribués aux LT régulateurs et aux cellules cytotoxiques ont également été démontrées pour les LB (*Figure 15*).

1) Les anticorps naturels

L'Homme et la souris naissent avec un niveau basal d'anticorps IgM circulants générés par les LB néonataux. Puisque ces anticorps sont également présents chez des souris

élevées en absence de tout pathogène, ils sont appelés anticorps naturels, ou non-immuns. Ces anticorps naturels possèdent un répertoire limité et sont générés par les B-1 (Herzenberg, 2000). A l'inverse des cellules B-2, les B-1 correspondent à un pool de cellules capables de s'auto-renouveler, plus une petite partie dérivant de précurseurs de la moelle osseuse après l'enfance. De par leur répertoire limité et leur capacité à répondre à des signaux T-indépendants, ils semblent représenter une population primitive de lymphocytes « innés » (« innate like »). Les IgM produites par ces cellules B-1 sont uniques dans le fait qu'elles présentent des interactions de faible affinité avec leur antigène et qu'elles induisent plus de cross-réactivité que les anticorps dérivants des cellules B-2. Il est alors supposé que les anticorps naturels joueraient un rôle dans l'élimination de cellules apoptotiques, une fonction clé du système immunitaire (Shaw et al., 2000).

A l'état d'équilibre, les cellules phagocytaires comme les macrophages et cellules dendritiques suppriment efficacement les cellules apoptotiques avec une faible induction de l'inflammation, lors d'un processus appelé efferocytose. Si ce processus est inhibé ou au contraire submergé par un nombre trop important de cellules en apoptose, les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées avant que leur membrane plasmatique ne perde son intégrité, induisant ainsi le relargage d'auto-antigènes et de signaux pro-inflammatoires dans l'espace interstitiel. Ceci peut alors conduire à une destruction tissulaire et à l'induction ou l'exacerbation d'une auto-immunité. Les anticorps naturels semblent avoir une fonction immunosuppressive importante *in vitro* et *in vivo*. Lors de leur liaison à la surface des cellules apoptotiques, les anticorps naturels permettent le recrutement de composants du complément comme le c1q, ce qui conduit à l'augmentation de la phagocytose et de l'opsonisation des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires. En plus d'augmenter le taux de phagocytose, les cellules apoptotiques liées aux anticorps naturels régulent négativement les fonctions des APC, notamment en inhibant leur maturation, en empêchant leur réponse à différents ligands de TLR, mais également en diminuant l'expression de molécules impliquées dans la présentation antigénique. La production d'anticorps naturels est totalement dépendante de la présence de ces B-1 et a lieu en absence de LT. Les niveaux d'anticorps naturels circulants sont augmentés chez des souris ayant reçu de grandes quantités de cellules apoptotiques ou ayant été immunisées avec des extraits de pneumocoques, suggérant que la présence de l'antigène détermine le niveau de sécrétion de ces anticorps. Enfin, les réponses T observées chez des souris immunisées avec des anticorps naturels liés à leur antigène correspondent majoritairement à des réponses de type Th2, suggérant que l'expansion

sélective des cellules Th2 peut être un autre mécanisme régulateur des anticorps naturels (Binder et al., 2004).

2) La sécrétion d'interleukines 10 et 35

Le mécanisme d'immunosuppression des LB le plus largement étudié et le mieux compris est la régulation par la sécrétion d'interleukine 10 (IL-10), qui est l'une des cytokines anti-inflammatoires les plus importantes pour réguler l'inflammation (Couper et al., 2008).

L'IL-10 affecte directement les LT CD4⁺ différenciés, comme il a été démontré dans certaines études où les Th1 et Th2 ont une prolifération et une sécrétion de cytokines réduites en présence d'IL-10 (Del Prete et al., 1993)(Groux et al., 1996). Bien que les LB aient été montrés comme exprimant l'IL-10 sous différentes conditions, l'importance des LB IL-10⁺ en immunosuppression n'a été démontrée que lors de la dernière décennie. En 2002, Mizoguchi et al. ont identifié une sous-population de LB produisant de l'IL-10 dans les GALT et surexprimant la molécule CD1d dans un modèle d'inflammation chronique intestinale. La même année, Fillatreau et al. montrent un rôle des LB spléniques produisant l'IL-10 dans l'auto-immunité. En effet, les auteurs décrivent une corrélation entre la rémission de sclérose multiple dans un modèle murin et la présence de LB de la rate produisant de l'IL-10 en réponse à une stimulation via le BCR et le CD40. De façon intéressante, ils ont trouvés que les LB IL-10⁺ spécialisés peuvent réduire la sévérité de la maladie suite à un transfert adoptif, alors que les LB provenant de souris déficientes pour l'IL-10 en sont incapables. Dans les années suivantes, d'autres études ont permis de démontrer que les LB sécrétant l'IL-10 régulent l'auto-immunité dans différents modèles murins notamment dans des modèles d'inflammation chronique intestinale (Mizoguchi et al., 2002b), d'arthrite induite par le collagène (Mauri et al., 2003b), de diabète de type 1 (Hussain and Delovitch, 2007) et de lupus érythémateux disséminé (Haas et al., 2010)(Watanabe et al., 2010). Une grande attention a été accordée aux facteurs permettant de générer ou d'expandre ces LB produisant l'IL-10. Les stimuli connus comme augmentant le nombre de ces cellules *in vitro* incluent les signaux via les TLR (Yanaba et al., 2009), le BCR (Yanaba et al., 2008a), le CD40 (Hayakawa et al., 1999) ou des combinaisons de ces facteurs. Récemment, il a été démontré que la cytokine de la famille du TNF, BAFF, augmentait la fréquence de LB IL-10⁺ *in vitro* et *in vivo* et que des LB traités avec BAFF supprimaient l'inflammation suite à un transfert adoptif (Yang et al., 2010).

Plus récemment, la protéine TIM-1 (T-cell Ig domain and mucin domain protein 1) a été reportée comme permettant d'identifier 70% des LB produisant de l'IL-10, faisant de ce

marqueur de surface le plus spécifique identifié à ce jour (Ding et al., 2011). Le traitement de souris avec un anticorps anti-TIM-1 induit une augmentation du pool de LB TIM-1⁺ produisant l'IL-10 et améliore la tolérance à une allogreffe, suggérant que TIM-1 est important fonctionnellement pour les LB IL-10⁺ et est plus qu'un simple marqueur d'identification de ces cellules. Ces résultats suggèrent que cibler TIM-1 peut constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour augmenter le nombre de LB produisant l'IL-10 chez les patients receveurs en transplantation ou chez des patients souffrant de maladies auto-immunes. Cependant, le même anticorps anti-TIM-1 qui permet la tolérance chez les souris naïves accélère le rejet chez des souris déficientes en LB, suggérant que TIM-1 a des effets différents dans les cellules autres que les LB. Il existe également d'autres controverses quant au lien entre les LB IL-10⁺ et les différentes sous-populations de LB connues. Alors que les LB produisant l'IL-10 sont enrichis dans les sous-populations de LB T2-MZP et de CD5⁺ CD1d^{high}, toutes les cellules de ces sous-populations n'expriment pas l'IL-10, soulignant le fait qu'il n'y a pas de concordance absolue entre ces cellules. Bien qu'il soit suggéré que les LB IL-10⁺ représente une lignée distincte de LB (appelée cellules B10) (DiLillo et al., 2010), d'autres études sont nécessaires pour démontrer que les LB produisant l'IL-10 sont distincts des LB T2-MZP. Finalement, alors que la sous-population de LB CD5⁺ CD1d^{high} est enrichie dans la population de B10, seulement 25% des LB produisant l'IL-10 sont retrouvés dans cette population (Ding et al., 2011). Puisqu'aucun marqueur de surface ne permet d'identifier tous les LB IL-10⁺, il est également possible que la production d'IL-10 apparaisse dans différentes sous-populations de LB, dépendant de l'état d'activation ou de différenciation. Cependant, l'absence sur les B10 du marqueur CD10, reconnu comme marqueur exprimé par la plupart des LB transitionnels, suggère que ces cellules ne correspondent pas à des cellules B ayant récemment migré de la moelle osseuse (Kalampokis et al., 2013).

Il est clair d'après ces études que l'IL-10 joue un rôle majeur dans la suppression immune médiée par les LB. Cependant, il reste à démontrer si les LB IL-10⁺ agissent exclusivement sur leurs cellules cibles ou si la perte de l'IL-10 dans les LB mène à des défauts dans d'autres fonctions immunosuppressives. Des études complémentaires sont alors requises pour comprendre le rôle de ces LB produisant l'IL-10 dans les phénomènes d'immunosuppression et d'auto-immunité.

Les actions de l'IL-10 semblent être étroitement liées à celles d'une autre cytokine un peu moins décrite jusqu'alors : l'IL-35. L'IL-35 est une cytokine associée à une suppression immune, exprimée par les Treg et nécessaire pour leur fonction suppressive (Collison et al., 2007). Chez la souris, l'IL-35 est également sécrétée par les LB suite à une stimulation via le

CD40 et le TLR4 *in vitro* et participe à leur effet suppresseur. En effet, des souris déficientes en p35 ou EBi3, les sous-unités de l'IL-35, spécifiquement dans les LB démontrent une exacerbation de l'EAE comparé à des souris contrôles. Wang et al ont démontré chez la souris que la production d'IL-10 par les LB était augmentée suite à l'ajout d'IL-35 dans les cultures, suggérant que cette cytokine est capable d'induire la conversion de cellules B en Breg sécréteurs d'IL-10 (Wang et al., 2014). De plus, la culture de LB en présence d'IL-35 induit l'augmentation d'une sous-population de LB qui exprime l'IL-35, appelée IL-35⁺ Breg, dont la moitié exprime également l'IL-10. De même, dans des expériences *in vivo*, bien que l'IL-35 inhibe la prolifération des LB conventionnels, il induit sélectivement l'expansion de Breg CD19⁺ CD5⁺ B220^{low}. *In vivo* également, le traitement de souris avec de l'IL-35 les protègent du développement de l'uvéite auto-immune expérimentale, caractérisé par une diminution de la fréquence des Th17 et Th1 dans les ganglions drainants et par une augmentation de la fréquence de Breg B220⁺ IL-10⁺ et l'apparition de Breg IL-35⁺ dans la rate. Ceci suggère alors que l'IL-35 induit en même temps des B10 et des Breg IL-35⁺ *in vivo*. Ces B10 induits par l'IL-35 sont capables de limiter l'uvéite déjà établie chez des souris suite à un transfert adoptif, et plus de 60% des B10 retrouvés dans la rate expriment également l'IL-35. De plus, l'augmentation de la fréquence des B10 et des Breg IL-35⁺ est accompagnée d'une augmentation de Treg CD4⁺ FoxP3⁺, suggérant que les Breg et Treg induits par l'IL-35 coopèrent afin de limiter le développement de la maladie. Ces études permettent ainsi de démontrer l'importance des LB IL-35⁺ dans la régulation de l'immunité, et souligne l'intérêt d'une meilleure connaissance de ces mécanismes, qui pourrait alors représenter de nouvelles cibles thérapeutiques pour les maladies auto-immunes et les maladies infectieuses.

Des études réalisées chez des souris génétiquement modifiées, exprimant l'eGFP lié au gène de l'IL-10, ont permis de démontrer que les LB régulateurs producteurs d'IL-10 exprimaient à leur surface de forts niveaux du marqueur de cellules plasmocytaires CD138, indiquant alors que les Breg IL-10⁺ correspondaient à des plasmocytes (Neves et al., 2010). De même, une étude de 2014 a démontré, suite à une infection avec *Salmonella*, l'émergence de Breg produisant de l'IL-10 et de l'IL-35 enrichis dans le pool de cellules B plasmocytaires IgM⁺ CD138⁺ BLIMP1⁺ (Shen et al., 2014). De plus, après une analyse par PCR, les transcrits d'*Ebi3* et de *p35* étaient co-exprimés par les LB les plus matures CD138^{high} CD22⁺ et CD138^{high} CD22⁻, exprimant également de hauts niveaux des transcrits *Blimp-1* et *Irf4*, et correspondant aux cellules sécrétrices d'anticorps les plus efficaces. En revanche, les cellules B les moins matures CD138^{int} CD22⁺ ne co-exprimaient pas *Ebi3* et *p35*, et les protéines EBi3 et p35 n'étaient retrouvées exprimées que par les plasmocytes CD138⁺ et non

par les cellules B CD19⁺ CD138⁻ chez des souris suite à une infection par *Salmonella* ou pendant l'EAE. Ces données, bien référencées en 2014 par Fillatreau et al (Ries et al., 2014)(Dang et al., 2014), suggèrent que les plasmocytes ont un rôle autre que celui de produire des anticorps, comme par exemple celui de sécréter des cytokines, permettant ainsi de moduler de nombreuses activités. En effet, des cellules B1 ont été démontrées comme étant capables de se différencier en plasmocytes CD19⁺ CD138⁺ IgM⁺ produisant du GM-CSF dans un modèle murin de choc septique (Rauch et al., 2012). De même, des plasmocytes exprimant iNOS et TNF α ont été retrouvés dans la lamina propria de l'intestin chez la souris (Fritz et al., 2012).

3) L'expression et la sécrétion de Granzyme B

Le Granzyme B est un composant enzymatique des granules cytotoxiques produits par les LT cytotoxiques et les cellules NK, qui médie le clivage des caspases et l'initiation de l'apoptose dans des cellules infectées par des virus (Trapani and Sutton, 2003).

L'expression de Granzyme B associée aux LB a été tout d'abord décrite chez des cellules de patients leucémiques chroniques, qui subissent l'apoptose suite à une stimulation avec le ligand du TLR9 (CpG) et la cytokine IL-21 (Jahrsdörfer et al., 2006). Le même groupe a également démontré l'expression de Granzyme B induite dépendante de l'IL-21 par des LB humains transformés ou non avec le virus Epstein-Barr, mais également par des LB isolés de patients développant un lupus (SLE), un psoriasis ou de l'arthrite rhumatoïde (Jahrsdörfer et al., 2006)(Hagn et al., 2009)(Hagn et al., 2010). Chez les patients SLE, la population de LB qui produit le Granzyme B est enrichie dans le pool de LB CD5⁺, et le traitement de LB de sang de cordon ombilical avec de l'IL-21 conduit à une expression *de novo* par les LB CD5⁺ (Hagn et al., 2010).

Alors que ces études montrent clairement que les LB peuvent exprimer du Granzyme B fonctionnel, la signification de ce phénomène est encore inconnue. De plus, si l'existence de LB exprimant le Granzyme B a été confirmée chez l'Homme, il n'en est rien chez la souris. En effet, chez différentes souches de souris, les LB ne sont pas capables d'exprimer le Granzyme B même en présence de forts stimuli (IL-21, anti-BCR, LPS, CpG-ODN, ...) ou après infection virale, contrairement aux LT cytotoxiques pour lesquels le niveau d'expression est significativement augmenté (Hagn et al., 2012a).

4) L'expression de FasL et TRAIL : les LB « killers »

L'un des mécanismes majeurs pour le maintien de la tolérance périphérique et le contrôle de la durée et de l'amplitude des réponses immunitaires est l'expression de ligands induisant la mort cellulaire par les cellules lymphoïdes et non-lymphoïdes. Parmi ces ligands particuliers, FasL (CD178) et TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand ou CD253) sont les mieux caractérisés chez la souris et l'Homme (Nagata and Suda, 1995) (Srivastava, 2001).

L'expression de FasL par les LB a été décrite pour la première fois chez l'Homme par des LB du sang périphérique activés par du LPS ou du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et par de l'ionomycine (Hahne et al., 1996). Depuis lors, différentes équipes ont démontré l'expression de FasL par des LB humains et murins, transformés ou non (Lundy, 2009). L'expression de FasL par des LB humains malins, notamment dans des cas de myélomes multiples, de lymphomes diffus à grandes cellules B ou de leucémies lymphoïdes chroniques, a été associée à l'induction de l'apoptose des LT et d'autres cellules, et à l'augmentation de la pathogénèse de la tumeur (Villunger et al., 1997)(Silvestris et al., 2001)(Kojima et al., 2006). Des LB exprimant FasL ont également été retrouvés dans différents types d'infections virales, incluant le virus Epstein-Barr (EBV) (Tanner and Alfieri, 1999), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Samuelsson et al., 1997) et le virus de la leucémie murine (MuLV) (Rich et al., 2006), où il a été proposé que l'expression de ligand de mort menait à l'apoptose des LT et potentiellement à la persistance des infections dans l'organisme. Des études ont démontré que des LB exprimant le FasL pouvaient jouer un rôle dans les maladies auto-immunes et l'induction de tolérance. En effet, des LB activés exprimant FasL et TGF β sont capables de supprimer l'induction de diabète auto-immun chez des souris NOD (Tian et al., 2001). Des LB FasL⁺ avec une activité cytotoxique contre les LT ont également été retrouvés à un niveau élevé dans un modèle murin de lupus, chez des souris MRL/lpr déficientes pour le gène Fas (Bonardelle et al., 2005). Une corrélation inverse entre le nombre de LB spléniques CD5⁺ FasL⁺ et la sévérité de l'arthrite induite par le collagène a également été démontrée (Lundy and Fox, 2009). Le pouvoir de ces LB « killer » FasL⁺ dans la médiation de la tolérance immune a été mieux caractérisé dans un modèle murin de greffe de peau mâle sur femelle, dans lequel l'injection de LB purifiés à partir de la rate de souris mâles contrôles suffisait à tolérer la greffe, à l'inverse de l'injection de LB provenant de souris déficientes en FasL (Minagawa et al., 2004). Ainsi, les LB « killer » FasL⁺ ont été identifiés dans de nombreuses maladies, au même titre que chez des individus sains, et ont

démontré un potentiel thérapeutique. A l'inverse de FasL, pour lequel son expression et son rôle dans l'immunosuppression et la tolérance sont bien connus, le rôle de TRAIL est moins bien caractérisé.

L'expression de TRAIL par les LB a d'abord été décrite dans des lignées de lymphomes B humaines et murines (Mariani and Krammer, 1998). TRAIL a également été détecté dans des cas de leucémies lymphoïdes chroniques et de myélomes multiples, aussi bien que dans des LB humains et murins non-transformés (Secchiero et al., 2005)(Silvestris et al., 2003)(Mariani and Krammer, 1998). Le rôle spécifique des LB exprimant TRAIL, en comparaison avec ceux exprimant FasL, dans la suppression immune, s'il en existe un particulier, n'a pas encore été déterminé.

5) L'expression de PD-L1 et PD-L2

Le récepteur de mort programmée 1, ou PD-1, a été identifié comme un régulateur critique de l'activation immunitaire et du maintien de la tolérance périphérique (Keir et al., 2008). Bien que le nom de « mort programmée » implique que cette molécule soit directement impliquée dans la mort cellulaire, ses fonctions immunosuppressives ne semblent pas dépendre de l'induction d'apoptose (Vibhakar et al., 1997). Deux ligands pour PD-1, PD-L1 et PD-L2, ont été identifiés et ont des profils d'expression cellulaire distincts, ainsi que des rôles uniques dans l'immunosuppression (Yamazaki et al., 2002)(Akbari et al., 2010).

PD-L1 est exprimé constitutivement par les LT, LB, les cellules dendritiques et les monocytes, et son expression est induite par la liaison de récepteurs de surface et/ou par la stimulation avec l'IFN γ (Yamazaki et al., 2002). A l'opposé, l'expression de PD-L2 a premièrement été décrite comme étant restreinte aux cellules dendritiques activées et aux monocytes (Latchman et al., 2001)(Tseng et al., 2001). PD-L1 joue un rôle dominant dans la régulation des réponses immunes médiées par les Th1, alors que PD-L2 apparait comme étant plus important pour la régulation des réponses Th2-associées, comme l'asthme (Singh et al., 2011). En 2007, Zhong et al démontrent l'expression de PD-L2 sur 50 à 70% d'une sous-population de LB CD5⁺ du péritoine, les L2pB1, chez la souris (Zhong et al., 2007). Bien que ces cellules aient été identifiées comme des APC efficaces favorisant l'activation des lymphocytes Th17 sécréteurs d'IL-17, les mécanismes impliqués ne semblent pas dépendre de l'expression de PD-L2. La capacité immunosuppressive des LB exprimant PD-L2 n'a, à ce jour, pas encore été directement démontrée et requiert des études supplémentaires.

6) Les IgG sialylées

Au cours d'une réponse immunitaire efficace, des anticorps IgG de forte affinité sont produits afin de reconnaître les épitopes sur l'agent pathogène ou ses produits toxiques dérivés. La région Fc de l'IgG se lie à la famille des récepteurs Fc exprimés sur les cellules de l'immunité innée et adaptative, altérant ainsi leur activité phagocytaire et la réponse aux autres stimuli (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). A la fois des récepteurs activateurs et inhibiteurs existent au sein de cette famille de récepteurs Fc, et leur niveau relatif d'expression détermine le seuil d'activation pour une cellule donnée. La production d'IgG est vitale pour l'élimination des pathogènes, puisque les individus atteints d'hypogammaglobulinémie sont extrêmement sensibles aux infections. Ces patients sont souvent traités avec des injections intraveineuses d'IgG polyclonales provenant d'un pool de sang de milliers de donneurs différents, ce que l'on appelle communément la thérapie IVIG. Malgré le rôle précis de ces IVIG dans la clairance des pathogènes, il est connu depuis plusieurs décennies que de fortes doses d'IVIG ont un effet anti-inflammatoire. Puisque la fonction anti-inflammatoire des IVIG est évidente seulement à des doses beaucoup plus élevées que celles nécessaires lors de la thérapie, il a été émise l'hypothèse que seule une fraction mineure de ces IgG possédait une activité anti-inflammatoire. Le fragment Fc d'une IgG contient un double-domaine de fixation de sucres en partie N-terminale, nécessaire pour la fixation à son récepteur Fc γ . Alors que la plupart des IgG possèdent un groupement N-acetylglucosamine et Mannose sur ce site, plus de trente glycoformes alternatives naturelles ont été identifiées (Parekh et al., 1985). Etant donné que le changement de ces fragments glycanes peut affecter la liaison de l'IgG à son récepteur ainsi que sa cytotoxicité, il a été supposé que les IgG ayant un pouvoir immunosuppresseur pouvaient correspondre à une glycoforme unique, les distinguant ainsi des IgG pro-inflammatoires. En effet, la fraction d'IVIG enrichie en glycoforme d'IgG possédant un groupement acide sialique en position terminale affichait une activité anti-inflammatoire à des doses réduites par rapport aux IVIG totales dans un modèle murin (Kaneko et al., 2006). De façon inverse, lorsque les résidus d'acide sialique sont enlevés des préparations d'IVIG, les propriétés immunosuppressives sont drastiquement abrogées. Le mécanisme à travers lequel ces IgG sialylées suppriment l'inflammation implique une nouvelle voie immunosuppressive innée, dans laquelle les cytokines liées aux lymphocytes Th2 tiennent une place importante. L'ajout d'acide sialique sur le fragment glycanes des IgG altère sa capacité de liaison à son récepteur, en diminuant fortement son affinité pour les récepteurs Fc classiques, tout en augmentant sa capacité à se

lier à un récepteur lectine de type C, le SIGN-R1 (Specific Intracellular adhesion molecule 3 Grabbing Nonintegrin homolog-Related 1) (Anthony et al., 2008b). Les macrophages et cellules dendritiques de souris exprimant l'orthologue humain de SIGN-R1 (hDC-SIGN) semblent répondre aux IgG sialylées en sécrétant l'IL-33, ce qui augmente alors le nombre de basophiles sécréteurs d'IL-4 circulants (Anthony et al., 2011). L'IL-4 produit par ces cellules activées agit ensuite sur les macrophages effecteurs en périphérie, les conduisant à augmenter l'expression du seul récepteur Fc inhibiteur Fc γ RIIB, augmentant ainsi le seuil d'activation de ces cellules et diminuant donc leur capacité pro-inflammatoire (Bruhns et al., 2003). En accord avec ce modèle, le traitement par IVIG montre peu de bénéfice chez des souris déficientes en SIGN-R1, Fc γ RIIB ou IL-4, alors que les souris traitées avec de l'IL-33 exogène présentent des niveaux élevés de basophiles sécréteurs d'IL-4 et une susceptibilité à l'arthrite médiée par les anticorps réduite (Anthony et al., 2008b). De plus, le traitement par IVIG est inefficace chez des souris déplétées en basophiles, suggérant alors un rôle central de ces cellules dans l'immunosuppression médiée par les IVIG (Anthony et al., 2011).

A l'heure actuelle, peu de choses sont connues à propos des facteurs pouvant agir sur les LB pour favoriser la glycosylation des anticorps sécrétés. Il semblerait qu'une réponse inflammatoire active réduise la quantité relative d'IgG sialylées, bien qu'aucun mécanisme responsable pour cette réduction n'ait été à ce jour identifié (Kaneko et al., 2006). Une étude récente a cherché à caractériser le profil glycan des IgG sécrétées par des LB primaires humains, en réponse à différentes cytokines pro-inflammatoires et à d'autres stimuli (Wang et al., 2011). De façon surprenante, de nombreux stimuli testés comme l'IL-4, l'IL-6 ou l'IL-17, n'avaient aucun effet sur la sialylation des IgG sécrétées. Encore plus intrigant, les stimuli pro-inflammatoires qui avaient un effet, comme le CpG-ODN, l'IL-21 ou l'IFN γ , induisaient plutôt une augmentation de la sialylation et galactosylation des IgG au lieu d'une diminution. Cependant, il s'agit d'une seule étude *in vitro*, dans laquelle les LB en question étaient stimulés avec d'autres facteurs en plus de ceux testés dans les conditions expérimentales, d'où la nécessité d'études supplémentaires afin de mieux comprendre ce qui influe sur les LB à changer l'état sialylé ou non des IgG sécrétées *in vivo*. Alors que les LB sécrétant des IgG sialylées n'ont pas été identifiés, les LB de la zone marginale (MZ) semblent jouer un rôle dans la régulation de l'expression de SIGN-R1 sur les macrophages de la zone marginale (You et al., 2011). Chez des souris déficientes en LB MZ, les macrophages de la zone marginale n'expriment pas SIGN-R1. De plus, lorsque les LB MZ sont induits à sortir de la zone marginale, les macrophages exprimant SIGN-R1 disparaissent de façon transitoire.

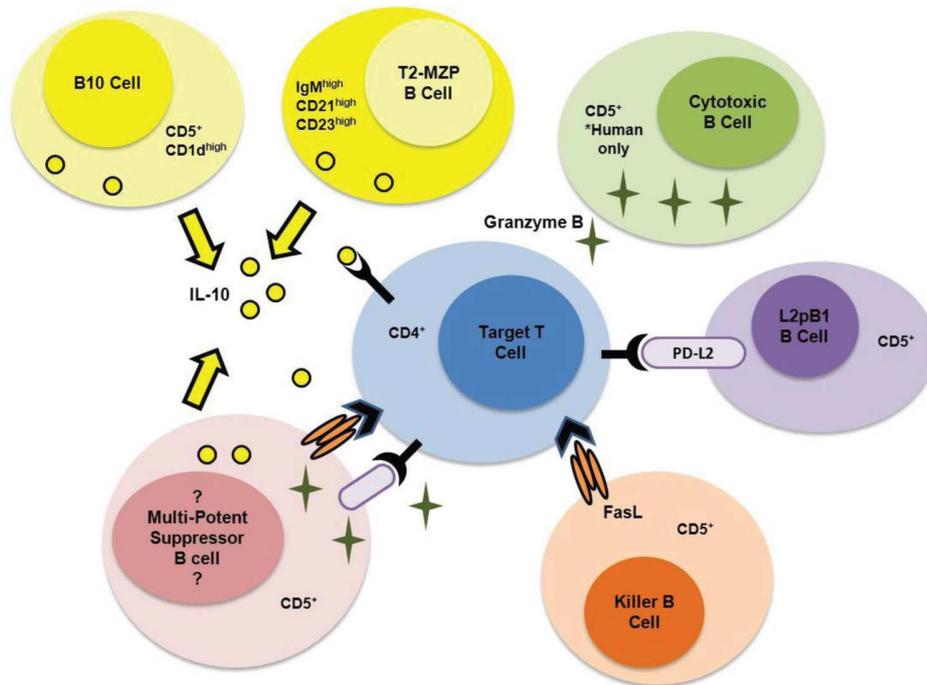


Figure 15 : Schéma représentant les différents mécanismes de régulation des lymphocytes B (d'après Klinker et Lundy)(Klinker and Lundy, 2012)

RESULTATS

I-Modèles d'allogreffes cardiaques chez le rat

L'allogreffe cardiaque est réalisée entre des rats de fond génétique Lewis, d'haplotypes RT1 (système du CMH chez le rat) incompatibles pour les molécules de CMH de classe I et II. Le greffon est prélevé chez un rat Lewis.1W (RT1u) et transplanté chez un rat Lewis.1A (RT1a). Le donneur et le receveur sont âgés de 8 à 12 semaines. Le cœur est greffé en position hétérotopique dans la cavité abdominale selon la méthode décrite par Ono et Lindsey (Ono and Lindsey, 1969). Le suivi de la survie du greffon se fait par palpation à travers la paroi abdominale. Le rejet est défini par l'arrêt des battements. En absence de tout traitement, l'allogreffe est rejetée $6 \pm 0,6$ jours après la greffe (Soulillou et al., 1984) (*Figure 16*).

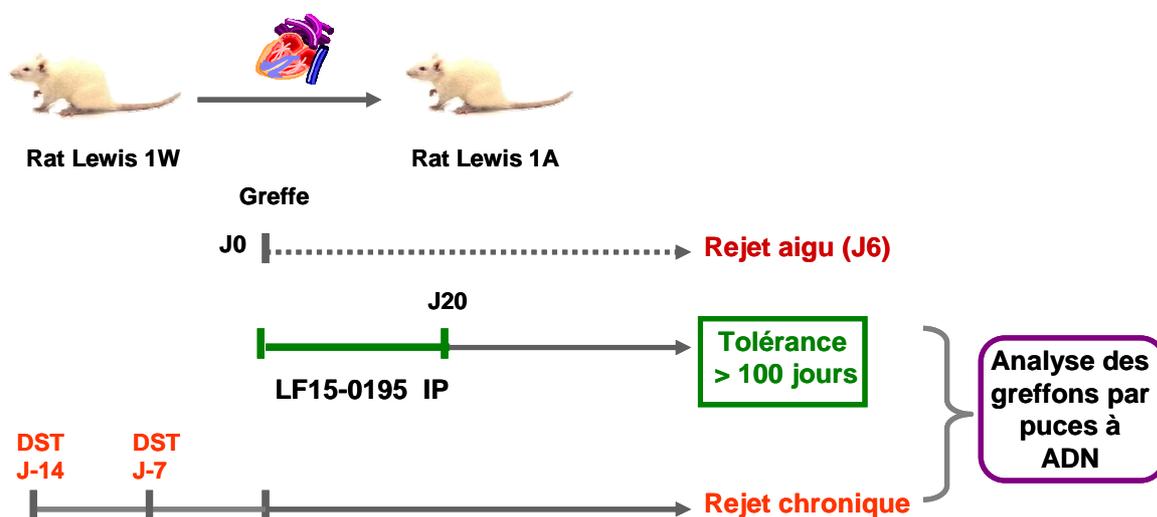


Figure 16 : Schéma représentant les différents modèles de tolérance et de rejet chronique à l'allogreffe cardiaque chez le rat dans mon projet

En l'absence de tout traitement, le greffon 1W est rejeté au bout de six jours en moyenne. Le modèle de tolérance est obtenu en administrant pendant 20 jours l'immunosuppresseur LF15-0195. Le modèle de rejet chronique est quant à lui obtenu en transfusant du sang du donneur 14 et 7 jours avant la greffe.

A/Modèle de rejet chronique : DST

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence et de caractériser des mécanismes immunologiques spécifiques de la tolérance en transplantation. C'est pourquoi nous réalisons l'analyse de notre modèle de tolérance en le comparant à un modèle de rejet chronique

d'allogreffe cardiaque chez le rat, qui implique les mêmes souches de rats et la même combinaison de donneurs et de receveurs (DST= transfusion de sang du donneur).

Dans ce modèle de DST, le rejet chronique est induit par l'injection en intraveineuse d'1ml de sang du donneur (rat Lewis.1W) au receveur (rat Lewis.1A), 14 et 7 jours avant l'allogreffe (*Figure 16*). Malgré l'existence de mécanismes régulateurs responsables de l'inhibition du rejet aigu chez les animaux traités par DST, ils ne sont pas suffisants pour empêcher l'apparition du rejet chronique (Ballet et al., 2009)(Heslan et al., 2006).

Les rats du modèle DST présentent une forte alloréponse des cellules T CD4⁺ producteurs d'IFN γ à long terme (J>100). Ces animaux sont également caractérisés par une production rapide d'anticorps anti-CMH de classe I et II du donneur dans le sérum, ainsi qu'au sein du greffon. De plus, ceux-ci présentent un dépôt de c4d sur la paroi des capillaires et des artères dès 7 jours après la greffe qui persiste au cours du temps. Ce dépôt correspond à une activation de la voie du complément et de la réponse humorale chez ces animaux (Ballet et al., 2009).

Les greffons des animaux du modèle DST présentent des signes histologiques caractéristiques du rejet chronique. Les greffons sont rapidement infiltrés après la transplantation par des leucocytes (Ballet et al., 2009), principalement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que des macrophages (Heslan et al., 2006a). Ils présentent également des dommages vasculaires qui apparaissent au cours du temps. Le greffon se fibrose progressivement, les artères s'obstruent suite à l'épaississement de l'intima liée à l'infiltration leucocytaire des endothéliums et à la prolifération myofibroblastique inflammatoire (Ballet et al., 2009)(Heslan et al., 2006) (*Figure 17*).

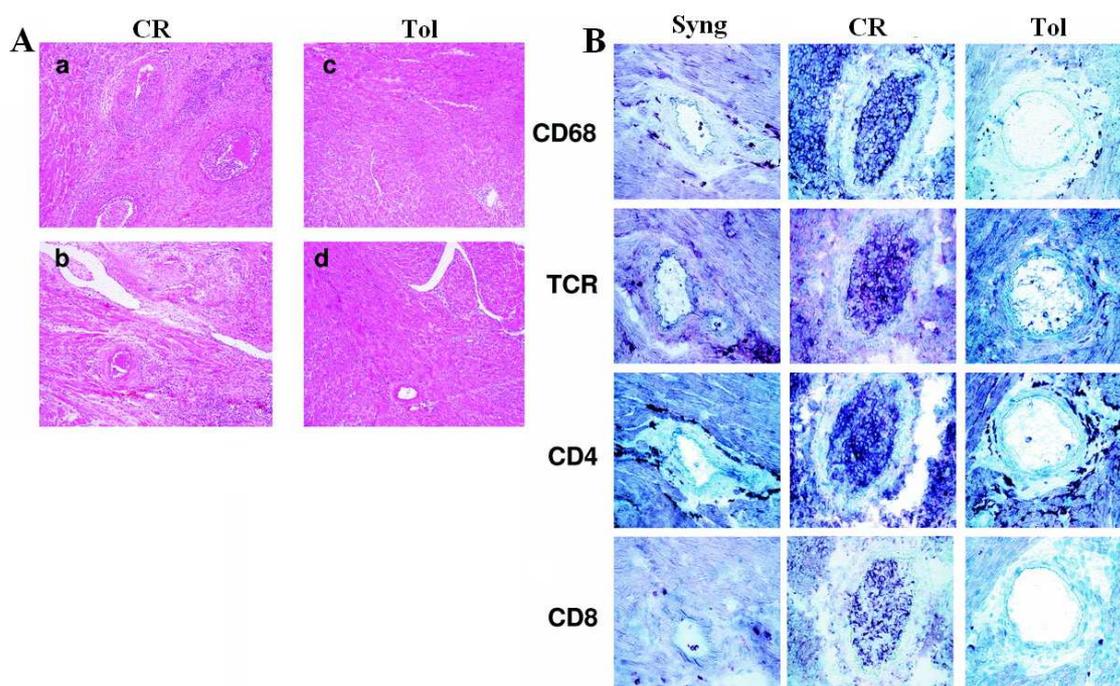


Figure 17 : Images représentant les lésions et l'infiltration cellulaire dans des greffes cardiaques (J100) syngéniques (Syng), en rejet chronique (CR) ou tolérées (Tol) à partir de Heslan et al. (Heslan et al., 2006a)

(A) Marquages de coupes de greffons à l'hématoxyline-éosine-safran. Observations: fibrose, lésions tissulaires dans les greffons CR, absence de lésions et de fibrose dans les greffons Tol. (B) Immunomarquages de coupes de greffons à la peroxydase. Observations: absence d'infiltration cellulaire au sein des greffons Syng, forte infiltration et obstruction des artères dans les greffons CR et faible infiltration sans obstruction des artères dans les greffons Tol.

B/Modèle de tolérance : LF15-0195

1) Le LF15-0195

Le LF15-0195 (Laboratoires Fournier, Daix, France) est une molécule analogue de la déoxyspergualine (DSG) (Lebreton et al., 1999) qui est un dérivé de la spergualine, une molécule isolée à partir de *Bacillus Laterosporus* (Takeuchi et al., 1981). L'étude de la DSG, initialement synthétisée comme agent anti-tumoral, a permis de mettre en évidence ses propriétés immunosuppressives. Par la suite, la DSG a donc été testée dans divers modèles de transplantation chez l'animal. Son efficacité a été démontrée dans la prolongation de la survie d'allogreffes de cœurs, de reins, d'îlots pancréatiques (Dickneite et al., 1986) et de peaux (Nemoto et al., 1987).

La DSG ne présentant pas de propriétés physico-chimiques satisfaisantes, des analogues ont été synthétisés parmi lesquels le LF15-0195, qui présente une meilleure résistance à l'hydrolyse et au métabolisme oxydatif *in vivo* (Lebreton et al., 1999). Les propriétés immunosuppressives du LF15-0195 ont initialement été testées et confirmées dans un modèle de GVHD chez la souris (Lebreton et al., 1999) puis dans d'autres modèles chez le rongeur. Son efficacité a été mise en évidence en transplantation (Chiffolleau et al., 2002a)(Min et al., 2003)(Wang et al., 2003)(Zhou et al., 2003), mais également dans des modèles de maladies auto-immunes, comme l'arthrite (Ducoroy et al., 2001) ou l'EAE (Duplan et al., 2006). Suite aux résultats encourageants obtenus chez le rongeur, le LF15-0195 a été testé dans un modèle préclinique et a permis une prolongation de survie d'allogreffes rénales chez le primate non humain (Yang et al., 2003a).

Le principal rôle pour le LF15-0195 est essentiellement celui lié au NFkB. En effet, l'étude de Yang et ses collègues a permis de mettre en évidence l'inhibition de la voie NFkB par le LF15-0195 (Yang et al., 2003b). Le NFkB est un facteur de transcription nécessaire à l'activation des lymphocytes et des DC. Lorsque les cellules sont au repos, le NFkB est séquestré dans le cytoplasme par une protéine kinase inhibitrice, Ikb, qui en se liant au NFkB, masque son domaine de translocation nucléaire. Suite à un signal d'activation, d'autres protéines kinases, les IKK, sont phosphorylées et vont à leur tour phosphoryler la molécule Ikb. Celle-ci est alors ubiquitinylée et dégradée. Le NFkB est libéré et migre dans le noyau pour réguler de nombreux gènes en se fixant au domaine KB de leur région régulatrice (Denk et al., 2000). Le LF15-0195 inhibe la phosphorylation d'Ikb empêchant la translocation de NFkB dans le noyau. Yang et ses collègues ont montré que le LF15-0195 peut induire *in vitro* des DC tolérogènes résistantes à la maturation en inhibant la voie NFkB (Yang et al., 2003b). Min et ses collègues ont également décrit l'induction de DC tolérogènes via l'inhibition de la voie NFkB dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris induit par le LF15-0195 (Min et al., 2003).

D'autres études ont permis de démontrer que le LF15-0195 est capable de se lier à l'Hsc70 (Komesli et al., 1999), une molécule appartenant à la famille des protéines de choc thermique. Ces molécules possèdent plusieurs fonctions, comme celle de molécule chaperonne. Elles interagissent avec des peptides ou des protéines, modifient leur conformation et peuvent également faciliter leur translocation entre différents compartiments cellulaires (Gething and Sambrook, 1992). De plus, ces molécules ont également été associées au mécanisme de présentation antigénique par les molécules de CMH exprimées par les APC (Srivastava et al., 1994).

Il semble que l'effet immunosuppresseur du LF15-0195 puisse être dû à son rôle en partie dans l'induction de la mort cellulaire des cellules T. Le LF15-0195 semble en effet favoriser l'élimination de ces cellules en les sensibilisant à la mort cellulaire induite par activation. Ducoroy et ses collègues ont mis en évidence un rôle pro-apoptotique du LF15-0195, qui favoriserait l'activation des caspases 8 et 10 dans les cellules T, suite à l'engagement de la molécule Fas. Cet effet fut confirmé par les auteurs dans un modèle murin dans lequel le LF15-0195 inhibe la GVHD en induisant l'apoptose des cellules T du donneur via un mécanisme dépendant de la voie Fas/FasL (Ducoroy et al., 2003).

2) Etudes précédentes du modèle de tolérance

L'étude de l'effet direct du LF15-0195 (5 jours après la transplantation) sur les animaux greffés a permis de démontrer que ce traitement induisait une forte inhibition de la réponse des anticorps anti-donneurs, de la réponse Th1 ainsi qu'une inhibition de l'infiltrat leucocytaire dans les greffons comparés aux animaux non traités (Chiffolleau et al., 2002a).

Suite à l'arrêt du traitement, l'analyse du sérum des animaux tolérants cent jours après la transplantation, montre un retour de la production des anticorps en périphérie, mais avec un phénotype Th2 plutôt que Th1 (Heslan et al., 2006a). Par ailleurs, la rate et le greffon des animaux tolérants sont fortement infiltrés par des cellules T régulatrices $CD4^+ CD25^+$ qui représentent 20 à 25% des cellules $CD4^+$ et dont la moitié d'entre elles exprime le facteur de transcription $Foxp3^+$ (Thebault et al., 2007a). Notre équipe a également montré que ces cellules régulatrices sont spécifiques des antigènes du donneur et sont capables de transférer la tolérance à un second receveur syngénique (Chiffolleau et al., 2002b).

Afin de caractériser les mécanismes responsables de la tolérance, notre équipe a réalisé des analyses comparatives par puce à ADN du transcriptome des allogreffes tolérées à long terme (Tol) avec celui des allogreffes développant un rejet chronique (CR) ou de greffes syngéniques (Syng) (Ballet et al., 2009)(Heslan et al., 2006). Sur les 27000 gènes testés, peu sont différemment exprimés entre les greffons Tol et les greffons CR. De façon intéressante, les gènes surexprimés dans les greffons Tol codent pour des molécules cytoprotectrices comme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), HO-1, IDO ou encore la chaîne IL27p28. Des gènes codant pour des molécules liées aux cellules T régulatrices comme LAG-3, CCR4, ou encore pour des cytokines comme l' $IFN\gamma$ et des chimiokines sont également surexprimés. Ces résultats sont cohérents avec l'infiltrat leucocytaire et l'accumulation de Treg observés dans les greffons Tol. Des molécules de cytotoxicité (Granzyme A, B, perforine) ont également été mises en évidence dans les greffons Tol. L'expression de ces molécules

pourrait refléter la présence de cellules effectrices mais également représenter la fonction suppressive des Treg utilisant la voie Granzyme/Perforine pour réguler les cellules effectrices et protéger les cellules endothéliales du greffon (Heslan et al., 2006a). A l'inverse, des molécules ont été retrouvées sous-exprimées dans les greffons des rats Tol par rapport à ceux des rats en RC, comme par exemple LIMLE (**LPS-Induced MolecuLE**). Une étude réalisée par l'équipe sur cette molécule (*Annexe 1*) a permis de démontrer qu'elle était exprimée surtout par les cellules dendritiques et les macrophages, et que son expression était induite par des stimuli pro-inflammatoires et diminuée par des cytokines immuno-régulatrices comme l'IL-10. Des analyses complémentaires nous ont permis de voir que LIMLE était exprimé surtout au niveau des testicules, des poumons et de la trachée, des tissus riches en cellules ciliées. De plus, l'utilisation de différents systèmes chez le rat et la souris *in vitro* et *in vivo* a permis de démontrer l'implication de LIMLE dans l'induction de la capacité des DC à stimuler les LT. De façon intéressante, nous avons observé par microscopie confocale une localisation de cette molécule dans le cytoplasme des cellules, avec des points de co-localisation avec des filaments d'actine au niveau de protrusions membranaires, suggérant fortement son implication dans la réorganisation du cytosquelette afin de promouvoir la motilité et mobilité cellulaire ou la formation de synapses immunologiques (Le Texier et al., 2014).

Par la suite, notre équipe a démontré que certaines molécules protectrices des cellules endothéliales commeIDO étaient exprimées dans les greffons par ces cellules et que les cellules T régulatrices étaient responsables de cette expression via la production d'IFN γ (Thebault et al., 2007b). De façon intéressante, des gènes de différenciation des lymphocytes B ont également été retrouvés surexprimés dans les greffons des rats tolérants et en rejet chronique, comme le CD20 et le CD22 (Heslan et al., 2006b). Cependant, une forte inhibition de la synthèse des immunoglobulines est observée dans les greffons tolérés par rapport à ceux rejetés (*Figure 18*).

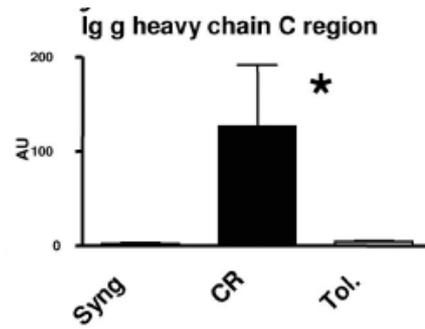


Figure 18 : Expression de l'ARNm de la chaîne constante de l'IgG dans des greffons de rats tolérants (Tol) en rejet chronique (CR) ou syngéniques (Syng) (Heslan et al, 2006).

L'ensemble de ces résultats confirme que la tolérance dans ce modèle est un phénomène actif qui permet la mise en place d'un environnement protecteur dans le greffon. Durant cette thèse, nous avons alors poursuivi l'étude de cette réponse B, afin d'identifier plus précisément cette sous-population de LB régulateurs et de caractériser leurs mécanismes de suppression.

II-Etude de la réponse lymphocytaire B dans le modèle de tolérance

L'objectif des travaux réalisés au sein de notre équipe est de caractériser les mécanismes mis en jeu lors de la tolérance en transplantation. Notre équipe a préalablement démontré l'induction d'une tolérance à long terme d'allogreffes cardiaques chez le rat via l'injection d'un court traitement immunosuppresseur (le LF15-0195). Comme expliqué précédemment, une analyse comparative par puce à ADN sur les greffons tolérés (Tol) ou développant un rejet chronique (CR) a permis de mettre en évidence l'expression de gènes associés aux cellules régulatrices et aux molécules de cytoprotection, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes associés à la synthèse d'Ig en absence de modification des gènes liés à l'infiltrat des LB (CD20, CD22) dans les greffons des animaux tolérants (Heslan et al., 2006a).

Une autre étude plus récente de l'équipe s'est alors intéressée à la réponse lymphocytaire B chez ces animaux tolérants et a permis de mettre en évidence une inhibition de cette réponse associée à la présence des LB régulateurs chez les animaux tolérants (Le Texier et al., 2011). En effet, dans les greffons tolérés, il a été observé une infiltration de LB « en cluster », produisant de l'IgM mais pas d'IgG, ainsi qu'une absence de dépôt du composant c4 du complément et une déviation de la réponse alloanticorps vers l'isotype IgG1 (Th2) en comparaison avec les greffons rejetés. Il a également été démontré *in vitro* que les alloanticorps des rats Tol n'entraînaient pas d'activation inflammatoire des cellules endothéliales du donneur. En effet, ceux-ci induisent plutôt ou maintiennent l'expression de molécules de protection comme HO-1, Notch-4 et CLEC-1, alors que les alloanticorps des animaux en CR diminuent leur expression. Les anticorps produits chez les rats tolérants semblent être plutôt protecteurs que délétères pour les cellules endothéliales. De plus, l'étude a permis de démontrer une accumulation de LB dans le sang des rats Tol associée à un phénotype régulé, caractérisé par une forte expression de molécules inhibitrices telles que FcγRIIb, BANK-1 et une plus faible expression de molécules activatrices telles que FcγRIIa et CD27. De façon intéressante, une accumulation de LB régulés avec un phénotype similaire a également été observée dans le sang de patients opérationnellement tolérants à une greffe rénale (Newell et al., 2010)(Sagoo et al., 2010)(Pallier et al., 2010), ce qui souligne l'importance de l'étude de notre modèle. Enfin, des expériences de transfert *in vivo* ont permis

de mettre en évidence que des LB de la rate d'animaux Tol étaient capables de transférer la tolérance à un second receveur syngénique, démontrant la présence de Breg chez les rats tolérants.

**“Regulatory B cells with a partial defect in
CD40 signaling and over-expressing Granzyme
B transfer allograft tolerance.”**

Durand Justine, Mérieau Emmanuel, Usal Claire, Chesneau Mélanie,
Rémy Séverine, Heslan Michèle, Richardeau Théophile, Le Texier
Laetitia, Anegon Ignacio, Cuturi Maria-Cristina, Brouard Sophie et
Chiffoleau Elise.

En révision dans « American Journal of Transplantation »

Résumé de l'article

Nous avons dans un premier temps démontré que les LB accumulés dans le sang des animaux Tol présentaient un phénotype partiellement activé, caractérisé par une diminution de l'expression du BCR et une perte de l'expression d'IgD en surface. De plus, ces LB surexpriment des molécules d'activation comme le CD23 et le CD38, bien qu'à un niveau similaire à celui des animaux en RC comparé à des animaux greffés syngéniquement, suggérant la présence de plasmablastes ou LB mémoires. De façon intéressante, les LB des Tol surexpriment les molécules IL-10 et Granzyme B, connues pour leur pouvoir suppressif, pouvant ainsi leur conférer des propriétés régulatrices.

De plus, des expériences *in vivo* nous ont permis de mettre en évidence que seuls les LB de la rate d'animaux Tol étaient capables de transférer une tolérance donneur-spécifique à un second receveur comparé à des animaux en RC. De plus, cette tolérance semble être dépendante de l'IL-10 et du TGF β . Parmi les LB de la rate, les cellules B régulatrices sont enrichies dans la sous-population IgD^{neg} IgM^{low/neg}. *In vitro*, ces LB inhibent fortement la sécrétion de TNF α par les LT, et suite à une stimulation avec un anti-CD40, les LB des rats Tol ne sont pas capables de moduler l'expression de BCL6 ni de PRDM1, contrairement aux LB de rats en RC. Ceci semble suggérer que les LB des Tol utiliseraient une voie alternative d'activation. En revanche, ils sont capables de fortement induire l'expression d'IRF4, de CD23, de BANK-1 et de Granzyme B, pouvant alors représenter leur mécanisme de suppression.

Enfin, suite au transfert, nous avons observé que les LB injectés migraient préférentiellement dans le greffon, où ils gardaient leur phénotype inhibé IgD^{neg} IgM^{low/neg} IgG^{neg}, et induisaient localement l'expansion de LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺.

Ces travaux soulignent l'importance des modèles animaux, nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénomènes de tolérance. Ainsi, l'étude du potentiel thérapeutique et des mécanismes d'actions de ces Breg semble importante afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'induire une tolérance chez l'Homme, en absence totale de traitement immunosuppresseur.

Title: Regulatory B cells with a partial defect in CD40 signaling and over-expressing Granzyme B transfer allograft tolerance.

Durand J., Merieau E., Usal C., Chesneau M., Remy S., Heslan M., Richardeau T., Le Texier L., Anegon I., Cuturi MC., Brouard S. and Chiffoleau E.

Department and Institution : **INSERM, U1064, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation Urologie Néphrologie, ITUN, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.**

Corresponding author contact information:

Name : CHIFFOLEAU E

E-mail : Elise.Chiffoleau@univ-nantes.fr

Running Title : **Regulatory B cells transfer tolerance.**

Word count : **3953**

Key Words:

Regulatory B cells, Tolerance, Transplantation

Abbreviations:

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

MLR: Mixte Leukocyte Reaction

Abstract

Emerging knowledge regarding B cells in autoimmunity or organ transplantation has demonstrated that these cells can no longer be taken as mere generators of deleterious antibodies but can also act as beneficial players. We previously demonstrated in a rat model of allograft tolerance, after immuno-suppressive treatment cessation, an accumulation of B cells blocked at the switch recombination process and over-expressing inhibitory molecules, a phenotype also observed in the blood of patients that spontaneously develop graft tolerance.

In this study, we demonstrated that regulatory B cells from tolerant recipients were mostly IgD⁻CD27⁺CD5⁺ and exhibited a plasmablast phenotype. *In vivo*, they transfer donor-specific tolerance indirectly via IL-10 and TGFβ1-dependant mechanisms and *in vitro* suppress CD4⁺ T cell-TNFα secretion. Interestingly, following anti-CD40 stimulation, regulatory B cells were blocked in their plasma cell differentiation pathway and up-regulated the inhibitory molecules *CD23*, *Bank1* and *Granzyme B*. Following transfer, these regulatory B cells migrate to the graft, keep their regulatory profile and promote accumulation of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to locally induce suppression.

Therefore, this rodent model, given that it recapitulates several findings from patients, is of particular use as a surrogate to study the role and the therapeutic potential of B cells in transplantation tolerance.

Introduction

During the past decades, the focus of B-cell research in clinical transplant immunology has been mostly directed to avoid the production of donor-specific antibodies. However, B cells can present antigen to T cells, express high level of class II MHC and regulate effector immune response. Emerging data from both experimental models and clinical trials point that B cells can also exert immunoregulatory activity and play an important role in auto-immune diseases or in transplantation (1). Moreover, B cells exhibit therapeutical potential by cell transfer. In mice, the depletion of B cells before the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis results in accumulation of pathogenic T cells in the central nervous system, that can only be suppressed by adoptive transfer of regulatory B cells (2). In transplantation models, regulatory B cells, generated following treatment of mice with anti-TIM-1 antibody have been described to be able to prolong MHC mismatched islet allograft survival following adoptive transfer (3, 4). There is no strict consensus regarding the phenotype of regulatory B cells and no exclusive surface marker. However, numerous studies have suggested that regulatory B cells are contained within the CD24^{high} CD38^{high} transitional B-cell subsets and express intracellular IL-10 (5-8). In Human, functional as well as numerical defects of regulatory CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} B cells producing high level of IL-10 have been described in patients with multiple sclerosis or systemic lupus erythematosus suggesting their involvement in the maintenance of the fine equilibrium required for tolerance (1). Consistent with a regulatory function for B cells also in human transplantation, a clinical trial has shown an increased risk for acute cellular rejection following depletion of B cells prior to transplantation, that could be due to a loss of regulatory B cells (9). We previously demonstrated a model of cardiac allograft tolerance in rat induced by a short-term treatment with the immuno-suppressor LF15-0195, a deoxyspergualin analog (10, 11). Interestingly, in this model, we observed after treatment cessation an accumulation of B cells in the blood and in the graft, blocked at the IgG switch recombination process and over-expressing inhibitory molecules (12). Moreover, we showed that spleen B cells were able to transfer allograft tolerance to new recipients demonstrating the presence of regulatory B cells.

Interestingly, an accumulation of inhibited B cells have been observed in the PBMC of patients that spontaneously develop operational tolerance to kidney transplant after immunosuppressive treatment cessation, and these B cells have a defect in terminal plasma cell differentiation (13-16). Therefore, it is tempting to speculate that B cells from tolerant patients that display similar phenotypes may also be actively regulatory. This model in rodent is of particular use as a surrogate to study the role and the therapeutic potential of B cells in human transplant tolerance, given that it recapitulates several findings from patients. This study aims to characterize in the rodent model the phenotype, migration and function of the regulatory B cells and their potential for cell therapy to induce transplantation tolerance.

Material and methods

Animals and transplantation

Inbred 8-week-old male LEW.1L (RT1l), LEW.1W (RT1u) and fully MHC mismatched LEW.1A (RT1a) rats were purchased by the 'Centre d'Elevage Janvier' (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to institutional guidelines. The studies were reviewed and approved by the appropriate institutional review committee. Syngenic LEW.1A to LEW.1A or allogenic LEW.1W to LEW.1A heart allografts were performed as previously described (17). Allografts in untreated recipients were acutely rejected in 7 days. Allograft tolerance was induced as previously described by a short-term treatment (20 days, 3 mg/kg/day) with the immuno-suppressor LF15-0195 (Fournier Laboratories), a deoxyspergualine analog (10). Chronic allograft rejection was induced by two donor blood transfusions before transplantation as previously described (18, 19). Graft function was assessed by scoring pulsations through the abdominal wall and acute or chronic rejection was confirmed by respectively heart beating cessation or the presence of vascular lesions (by histology). Blood, spleen or graft were recovered in recipients at day 100 after transplantation. For *in vivo* transfer experiments, 10×10^6 of purified CD4⁺ T cells or subpopulations of B cells from syngenic, tolerant, chronically rejected recipients or B-cell transferred recipients were intravenously injected the day of transplantation into LEW.1A irradiated allogenic recipients [4.5 Gy, whole-body sub-lethal irradiation (Structure Fédérative de Recherche - Santé François Bonamy, Nantes, France) one day before transplantation]. LEW.1A GFP transgenic rats were generated by the Transgenic Rats and Immunophenomics Platform Nantes (Dr Ignacio Anegón), as previously described (20). Neutralizing antibody anti-TGFβ1 ((2G7; provided by Dr. K. Melief, Amsterdam, The Netherlands) (4mg/kg every three days)) or rabbit polyclonal anti-rat IL10 ((Invitrogen) 60 µg/kg every two days after transplantation) was injected to irradiated recipients following spleen B cell transfer.

Antibodies

Goat anti-rat IgM and IgG-FITC were purchased from Jackson Immunoresearch laboratories (West Grove, PA) ; purified anti-rat IgD (MARD-3) from IMEX (Belgium), anti-rat λ chain Ig (OX12) and anti-biotinylated-CD5 (OX19) from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK) ; purified anti-rat CD138 from Agrobio (France), anti human/mouse GRANZYME B-FITC from Biolegend (San Diego, CA) and purified anti-rat CD24, CD27-PE, CD4-PECy7 (OX35), CD45RA-FITC (OX33), TCR-Alexa647 and Streptavidin-Alexa405 from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ).

Flow cytometry and cell sorting

Fluorescent labelling of cells was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Spleen CD4⁺ T cells, total or subpopulations of B cells from naive, syngenic, chronically rejected or tolerant recipients or from transferred recipients were purified using a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences) by TCR and CD4 staining, or by TCR, CD45RA staining, plus CD24, CD5, CD27 or IgM/IgD staining. GFP⁺ B cells from GFP transgenic tolerant recipients were sorted according to CD45RA and GFP staining. Purity was >98%.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total or IgD⁻ B cells from blood or spleen were sorted using FACSAria. Total RNA from grafts or sorted cells were prepared using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA were synthesized using the M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) and were subjected to real-time quantitative PCR using the Power SYBR Green Master mix (Applied Biosystems). The expression of each mRNA was normalized to the expression of Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (*Hprt*) with the $\Delta\Delta C_t$ method and the results expressed in arbitrary unit. The oligonucleotides used in this study are described in Table 1.

***In vitro* Mixte Leukocyte Reaction (MLR) and B cell suppressive assay.**

For MLR, CD4⁺ T cells were isolated from naive LEW.1A rat or from recipients transferred with B cells from syngenic, chronically rejected or tolerant recipients by cell sorting. CD4⁺ T cells were then labelled with 5 µM Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes/Invitrogen) for 2 min and co-cultured in 96-well U plate with LEW.1W antigen-presenting cells (isolated from spleen by Nicodenz (AbCys SA, Paris) gradient) (Ratio 1 APC:64 T cells). For suppressive assay, cell sorting purified IgD⁻ B cells from tolerant or chronically rejected recipients were stimulated with an anti-CD40 antibody at 5 µg/mL (HM40-3, BD Biosciences) for 18 hours and added in the MLR for 5 days (at ratio 1:1). Neutralizing anti-TGFβ1 or anti-IL-10 antibodies (10 µg/mL) were added at day 0 in co-culture. Supernatants were collected for ELISA and proliferation of CFSE-labelled responder T cells was measured by flow-cytometry in CD4⁺ labelled T cells.

Cytokine secretion in MLR

Rat TNF-α and IFN-γ cytokine levels in supernatants of 5-days MLR cultured with B cells were measured using ELISA purchased from BD Biosciences (BD OptEIA™) according to the manufacturer's instructions.

Determination of circulating anti-donor alloantibodies

LEW.1W splenocytes were incubated with de complemented sera (diluted at 1/8 in PBS, 0.02% sodium azide) from recipients transferred with B cells from syngenic, chronically rejected or tolerant recipients. Cells were then stained with mouse anti-rat IgG2a (MCA 278, Serotec) followed by FITC-goat anti-mouse IgG. FACS LSR II was used to measure fluorescence, and data were analyzed using the FlowJo® software. Data were expressed in Geometric mean of fluorescence intensity (MFI).

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using the Student's t-test for unpaired data, and results were considered significant if p values were <0.05 . Data are expressed as mean \pm SEM. The Kaplan–Meier method was used to calculate the survival curves followed by Mantel–Cox log rank analysis.

Results

Accumulated blood B cells of tolerant recipients are partially activated.

We characterized the B cells that accumulated in the blood of tolerant recipients and compared with blood B cells from syngenic or chronically rejected recipients. We observed that they corresponded preferentially to B cells expressing low level of λ chain of the Ig, that are IgD⁻ and IgM⁺ (Figure 1A). By lack of specific antibodies in rat, we analyzed the mRNA expression of some markers of activation. CD38 and CD23 are markers of activated B cells and AICDA expression is decreased in memory B cells and absent in plasma cells (21). We observed a higher mRNA expression of *CD38* and *CD23*, and a lower expression of *Aicda* transcripts in B cells from tolerant recipients compared to the ones from syngenic recipients (Figure 1B). Taken together, these data suggest that the B cells that accumulate in the blood of tolerant recipients correspond preferentially to activated B cells such as plasmablasts or memory B cells. Interestingly, B cells from tolerant recipients express higher mRNA level for *IL-10* and *Granzyme B*, two molecules previously described in regulatory B cells (1, 22), compared to the ones from chronically rejected recipients (Figure 1B). However, no significant quantitative difference in protein expression was observed (data not shown).

Spleen IgD⁻ B cells from tolerant recipients transfer allograft tolerance.

We isolated B cells from the spleen of tolerant recipients to assess their suppressive function and mechanisms of action. Transfer of 10 millions of spleen B cells from tolerant recipients to new LEW.1A recipients was able to transfer allograft tolerance, in contrast to the transfer of B cells from chronically rejected recipients (Figure 2A). Transfer of tolerance was specific to LEW.1W donor antigens since third-party LEW.1L allograft was rejected (Figure 2A). To determine which subpopulation of B cells was able to transfer tolerance, we purified B cells according to their maturation state (IgD and/or IgM expression) or to markers of regulatory B cells as follow : transitional type 1 IgD^{low} IgM^{high}, transitional type 2 IgD^{high} IgM^{high}, mature naïve IgD^{int} IgM^{low}, activated IgD⁻ (23), CD5⁻, CD24⁻ or CD27⁻ cells (1). We observed that the

transfer of transitional type 1 or type 2 B cells from tolerant recipients was not able to prevent graft rejection (Figure 2B). Transfer of mature naïve B cells was able to transfer tolerance in only 2 out of 7 recipients. However, activated IgD⁻ B cells were able to transfer tolerance in 5 out of 6 recipients. Moreover, transfer of tolerance was abrogated in more than half of cases (3 out of 5) when B cells were depleted in CD5⁺ or in CD27⁺ cells and in 1 out of 3 cases when depleted in CD24⁺ cells (Figure 2C). We observed that transfer of tolerance was abrogated in all recipients by anti-TGFβ1 or anti-IL-10 neutralizing antibody treatment (Figure 2D).

These data demonstrate that the regulatory B cells able to transfer tolerance are enriched in the IgD⁻ subpopulation, are specific to donor antigens, act via IL-10 and TGFβ1-dependant mechanisms and are heterogeneous for CD5, CD24 and CD27 suggesting activated B cells such as plasmablasts or memory B cells.

Spleen IgD⁻ B cells from tolerant recipients are partially refractory to *in vitro* anti-CD40 stimulation and inhibit TNFα secretion by T cells.

We then analyzed the phenotype and function of the IgD⁻ B cells from tolerant recipients following anti-CD40 stimulation. Interestingly, B cells from tolerant recipients, in contrast to B cells from chronically rejected recipients, were not able to down-regulate *Bcl6*, up-regulate *Prdm1* and transiently down-regulate *Irf4* transcripts expressions necessary for plasma cell differentiation (Figure 3) (24). These B cells, however, expressed higher level of *Irf4* transcripts. These results suggest that these B cells from tolerant recipients are blocked at the IRF4 induction mediated by the anti-CD40 agonistic stimulation and cannot go further into differentiation. Interestingly, it has been shown that IRF4 up-regulates IL-10 (25). However, contrary to the ones from blood, we do not see in these spleen B cells an increased in IL-10 transcripts (data not shown). Interestingly, these B cells also expressed higher transcripts of the inhibitory molecules *CD23* and “B cell adaptor with ankyrin repeats” (*Bank1*), and of *Granzyme B* than the B cells from chronically rejected recipients (Figure 3).

We then assessed the *in vitro* suppressive functions of the anti-CD40 stimulated spleen IgD⁻ B cells from tolerant recipients in a MLR and compared with the ones from chronically rejected recipients. We observed that these B cells were not able to inhibit MLR T cell proliferation or IFN γ secretion (Figure 4A and 4B respectively). However, these B cells strongly suppressed T-cell TNF α secretion (Figure 4C). This suppression of TNF α secretion was not restored by the addition of neutralizing anti-TGF β 1 or anti-IL-10 antibodies in the co-cultures (Figure 4C), suggesting that the role of IL-10 and TGF β 1 in the *in vivo* transfer experiments was indirect. Therefore, IgD⁻ B cells from tolerant recipients are partially refractory to stimulation, over-express inhibitory molecules and possess *in vitro* regulatory properties.

Following transfer, spleen IgD⁻ B cells from tolerant recipients migrate to the graft.

The transfer of tolerance with B cells is of particular interest to consider using these cells in cell therapy in clinic. We analyzed at long-term the recipients transferred with B cells from tolerant recipients, and observed in the graft, an absence of chronic rejection with a real integrity of the vessels, a weak deposit of IgM and IgG, and a moderate infiltration by leucocytes (data not shown).

In addition, in these tolerant transferred recipients, we observed a strong control of the allospecific B cell response with few anti-donor Th1 isotype IgG2a antibodies in the sera compared to rejecting recipients transferred with B cells from syngenic or chronically rejected recipients (Figure 5A). We found also less total IgG⁺ B cells in the bone marrow (Figure 5B). No difference in the number or in the phenotype of the B or regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells was noted in the blood or spleen between these groups (data not shown). Moreover, we observed in the spleen a similar donor-specific CD4⁺ T cell proliferation (Figure 5C) and normal CD4⁺ T cell IFN γ and IL-10 expression (data not shown) suggesting no deletion of alloreactive T cells or presence of regulatory T cells. Indeed, the transfer of B or CD4⁺ T cells from the spleen of tolerant transferred recipients was not able to re-transfer tolerance (Figure

5D). Even transfer of total spleen cells (50 millions) was not able to prevent graft rejection (data not shown).

Therefore, the absence of regulation in the spleen suggests that following transfer, regulatory B cells have neither migrated nor generated regulatory cells in the spleen. We hypothesized that, because of their IgD⁻ activated state, these transferred regulatory B cells did not need to be differentiated and re-activated in the germinal centres of the spleen but rather went directly to the graft, at the site of donor antigens to prevent graft rejection. Therefore, we assessed the capacity of graft infiltrating cells of tolerant transferred recipients to re-transfer tolerance. We observed, although a low number of cells was injected (1 million), a prolongation of allograft survival (Figure 5D) demonstrating the presence of regulatory cells in the graft.

To confirm this hypothesis, we followed the fate of the transferred B cells by using transgenic rats expressing GFP in leukocytes (20). Spleen purified GFP⁺ B cells from GFP transgenic tolerant recipients (by LF15-0195 treatment) were transferred in new recipients grafted with allogenic or syngenic heart as control. First, we observed that in contrast to a syngenic graft, numerous transferred GFP⁺IgD⁻ B cells from tolerant recipients were retrieved 45 days after transfer in the donor-specific graft, demonstrating that the B cells have migrated to the site of donor antigens (Figure 6A). Then, we noticed that the IgD⁻ subset of the transferred GFP⁺ B cells was enriched in the allograft compared to the other organs such as spleen or bone marrow (Figure 6B).

We assessed in the allografts of transferred recipients, a high mRNA expression of *CD19*, *IgM* and *Foxp3* compared to syngenic grafts and no mRNA expression of *IgG* (Figure 6C).

These data demonstrate that following transfer, IgD⁻ B cells have preferentially migrated to the graft, maintained their regulatory profile of unswitched cells, and have induced a local accumulation of regulatory T cells.

Presence of GRANZYME B⁺ CD138⁺ plasmablasts in the graft of tolerant recipients.

We observed an over-expression of *Granzyme B* mRNA in B cells from blood and spleen of tolerant recipients and the infiltration of regulatory B cells expressing GRANZYME B has been shown in human solid tumors (22, 26). Moreover, B cells expressing GRANZYME B and exhibiting a plasma-like cell phenotype have also been recently described in human tissues (27). In contrast to human B cells, mouse B cells do not express *Granzyme B* (28), however nothing was described for rat B cells. We observed the presence of B cells expressing GRANZYME B protein in the tolerated allografts (Representative Dot Plot, Figure 7A). Interestingly, all these GRANZYME B⁺ B cells were CD138⁺ and were more numerous in tolerated than in chronically rejected allografts, although more CD138⁺ plasmablasts and/or plasma cells were present in the latter ones (Figure 7B). We previously described a total absence of IgG synthesis by the B cells in tolerated allografts (12). Nevertheless, we observed a high mRNA expression of *IL-21* in tolerated allografts although at a lower level than the one in chronically rejected allografts (Figure 7C). Indeed, it has been shown that IL-21, a cytokine crucial for plasma cell differentiation (29), is also involved in the differentiation of regulatory B cells (30).

Taken together, these data suggest that these GRANZYME B⁺ CD138⁺ plasmablasts may represent highly differentiated regulatory B cells that accumulate in the graft tissue.

Discussion

In this study, we further characterized the phenotype and function of the B cells from tolerant recipients that we previously demonstrated to accumulate in the blood (12). By studying the blood, spleen and graft compartments, a body of evidence suggests that the regulatory B cells correspond preferentially to activated plasmablasts or memory IgD⁻ IgM^{low}CD23⁺CD38⁺CD27⁺ B cells. These B cells are specific to donor-antigens suggesting their previous priming in germinal centers. We previously showed in the tolerant recipients the presence of B cells blocked at the IgG switch in the germinal centers (12). Therefore, these blocked B cells may then exit from germinal centers into peripheral blood and accumulate there due to a defect in their recruitment in the bone marrow niches for their differentiation in long-lived plasma cells. Regulatory B cells in our model are enriched in the IgD⁻ subset and seem heterogeneous for CD24 and CD5, suggesting different subsets that could correspond to a similar subtype of regulatory B cells but at different stages of differentiation. Indeed, we do not exclude the possibility that these subsets come from B cells that have modeled their repertoire in the bone marrow by receptor editing in the presence of the antigens of the graft. Indeed, it has been shown in mice that deoxyspergualin blocks in the bone marrow the differentiation of sIgM⁻ pre-B into sIgM⁺ mature B cells (31). We observed that its analog LF15-0195 induces during treatment a drop in new emigrants T1 B cells (from bone marrow to periphery) that is then restored following treatment cessation in a mice skin graft model (unpublished results). Therefore, LF15-0195 treatment and inhibition of differentiation of precursors of B cells at the time of transplantation may have promote tolerance, by expanding after treatment de novo B-cells, which have become tolerized to the alloantigens since the beginning of their development.

IgD⁻ B cells from tolerant recipients cannot go further into differentiation following anti-CD40 stimulation and we previously demonstrated the accumulation of B cells blocked at the IgG switch (12), suggesting that these cells have a defect in plasma cell differentiation. Interestingly, it has been shown that the B cells from tolerant patients have a default in their *in vitro* terminal differentiation in plasma cells (16). We observed an induction of *Irf4* that may

be linked to the regulatory phenotype. Indeed, IRF4 in DC has been shown to inhibit IL-12 production, therefore controlling Th1 immune response (32). Moreover, expression of *Irf4* alone in a B cell line up-regulates IL-10 expression in culture supernatants, revealing a novel role for IRF4 in B regulatory phenotype (25). Interestingly, we noted a higher expression of the inhibitory molecules *Bank1* and *CD23* in B cells from tolerant recipients. BANK1 acts as a negative regulator of CD40-mediated Akt activation in B cells (33). The high expression of *Bank1* and *CD23* may prevent efficient CD40 signalling and may have enhanced the threshold for an efficient activation. Interestingly, we observed a higher expression of *Granzyme B* transcripts in B cells from tolerant recipients, and the presence of GRANZYME B⁺ CD138⁺ plasmablasts in the tolerated grafts. Recently, it has been shown that BCR and IL-21 signalling without an efficient CD40-CD40L ligation leads to the generation of GRANZYME B⁺ B cells that exert regulatory role in solid tumor infiltrates (22, 34, 35). These GRANZYME B⁺ B cells exhibit tissue trafficking and plasmablast phenotypes, accumulate specifically in tissues and have been suggested to play a critical role in early anti-viral immune responses, in the regulation of autoimmune mechanisms and in cancer immunosurveillance (26, 27, 36). Therefore in our model, B cells that have a defect in CD40 signaling may lead, by repetitive stimulation by donor antigens, to the generation of GRANZYME B⁺ regulatory B cells that exert an immunosuppressive role locally in graft tissue. We observed as reported in other studies (8, 37, 38), that regulatory B cells suppress specifically the TNF α secretion by activated T cells and that, although not involved in direct suppression, they require IL-10 and TGF β 1 to mediate transfer of tolerance.

Importantly, following transfer, regulatory B cells migrate to the graft and maintain their regulatory/inhibited profile in this new environment. Stability of the phenotype is an important point to consider B cell therapy in human. The tolerizing effect of the B cells following transfer may have occurred through direct migration and suppression by the regulatory B cells in the graft and to secondary induction of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. In the literature, B cells have been shown to generate Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (39, 40). Since we observed a concomitant accumulation of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and regulatory

B cells in the graft and spleen following the immuno-suppressive treatment cessation, we are currently investigating in our model the main role of the B cells in the promotion of regulatory T cells by using B cell deficient rats (IgM KO rats) (41).

The comprehension of the mechanisms of regulatory B cells and their potential for B cell therapy is important to decipher in experimental models to pave the way for future development of this approach in the clinic. We extended the human work, analyzing directly B cell phenotype and function in the graft and showing that adoptive transfer of B cells from spleen of tolerant recipients transmits donor-specific allograft tolerance. The mechanisms of action of regulatory B cells could be instrumental to develop new therapeutical strategies to promote tolerance or minimize immunosuppressive drug regimen.

Acknowledgments

Funding Sources: J. Durand was supported by “Fondation PROGREFFE” and “Société Francophone de Transplantation”, L. Le Texier by a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”, and M Cheneau by a ROTRF grant. This work was realized in the context of the IHU-Cesti project which received french government financial support managed by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

References

1. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
2. Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 26;104(52):20878-83.
3. Ding Q, Yeung M, Camirand G, Zeng Q, Akiba H, Yagita H, et al. 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.* 2011 Sep;121(9):3645-56.
4. Lee KM, Kim JI, Stott R, Soohoo J, O'Connor MR, Yeh H, et al. Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells. *Am J Transplant.* 2012 Aug;12(8):2072-8.
5. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7868-78.
6. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol.* 2009;182(12):7459-72.
7. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010 Jan 29;32(1):129-40.
8. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):530-41.
9. Clatworthy MR, Watson CJ, Plotnek G, Bardsley V, Chaudhry AN, Bradley JA, et al. B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18;360(25):2683-5.

10. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant.* 2002;2:745-57.
11. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol.* 2002;168:5058-69.
12. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant.* 2011 Mar;11(3):429-38.
13. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racape M, Degauque N, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010 Sep;78(5):503-13.
14. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1836-47.
15. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1848-61.
16. Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant.* 2014 Jan;14(1):144-55.
17. Ono K, Lyndsey ES. Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1968;57:225-9.
18. Souillou J-P, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation.* 1984;38:63-7.

19. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation*. 2006 Nov 15;82(9):1185-93.
20. Remy S, Tesson L, Usal C, Menoret S, Bonnamain V, Nerriere-Daguin V, et al. New lines of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy. *Transgenic Res*. 2010 Oct;19(5):745-63.
21. Xu Z, Pone EJ, Al-Qahtani A, Park SR, Zan H, Casali P. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit Rev Immunol*. 2007;27(4):367-97.
22. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*. 2013 Apr 15;73(8):2468-79.
23. Nduati EW, Ng DH, Ndungu FM, Gardner P, Urban BC, Langhorne J. Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e15007.
24. Willis SN, Good-Jacobson KL, Curtis J, Light A, Tellier J, Shi W, et al. Transcription Factor IRF4 Regulates Germinal Center Cell Formation through a B Cell-Intrinsic Mechanism. *J Immunol*. 2014 Mar 3.
25. Rangaswamy US, Speck SH. Murine gammaherpesvirus M2 protein induction of IRF4 via the NFAT pathway leads to IL-10 expression in B cells. *PLoS Pathog*. 2014 Jan;10(1):e1003858.
26. Hagn M, Jahrsdorfer B. Why do human B cells secrete granzyme B? Insights into a novel B-cell differentiation pathway. *Oncoimmunology*. 2012 Nov 1;1(8):1368-75.
27. Xu W, Narayanan P, Kang N, Clayton S, Ohne Y, Shi P, et al. Human plasma cells express granzyme B. *Eur J Immunol*. 2014 Jan;44(1):275-84.
28. Hagn M, Belz GT, Kallies A, Sutton VR, Thia KY, Tarlinton DM, et al. Activated mouse B cells lack expression of granzyme B. *J Immunol*. 2012 Apr 15;188(8):3886-92.

29. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):7867-79.
30. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012 Nov 8;491(7423):264-8.
31. Tepper MA, Nadler SG, Esselstyn JM, Sterbenz KG. Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70Z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation. *J Immunol.* 1995 Sep 1;155(5):2427-36.
32. Akbari M, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Matsuyama T, et al. IRF4 in Dendritic Cells Inhibits IL-12 Production and Controls Th1 Immune Responses against *Leishmania major*. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2271-9.
33. Aiba Y, Yamazaki T, Okada T, Gotoh K, Sanjo H, Ogata M, et al. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity.* 2006 Mar;24(3):259-68.
34. Hagn M, Ebel V, Sontheimer K, Schwesinger E, Lunov O, Beyer T, et al. CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur J Immunol.* 2010 Jul;40(7):2060-9.
35. Hagn M, Sontheimer K, Dahlke K, Brueggemann S, Kaltenmeier C, Beyer T, et al. Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol Cell Biol.* 2012 Apr;90(4):457-67.
36. Bulati M, Buffa S, Martorana A, Candore G, Lio D, Caruso C, et al. Trafficking phenotype and production of granzyme B by double negative B cells (IgG/IgD/CD27) in the elderly. *Exp Gerontol.* 2014 Jan 2.
37. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009 Mar 15;182(6):3492-502.

38. Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-Garcia A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, et al. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Dec;70(6):448-53.
39. Tu W, Lau YL, Zheng J, Liu Y, Chan PL, Mao H, et al. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4⁺ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2554-62.
40. Zheng J, Liu Y, Lau YL, Tu W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 2010 Jan;7(1):44-50.
41. Menoret S, Iscache AL, Tesson L, Remy S, Usal C, Osborn MJ, et al. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol.* 2011 Oct;40(10):2932-41.

Figures

Figure 1

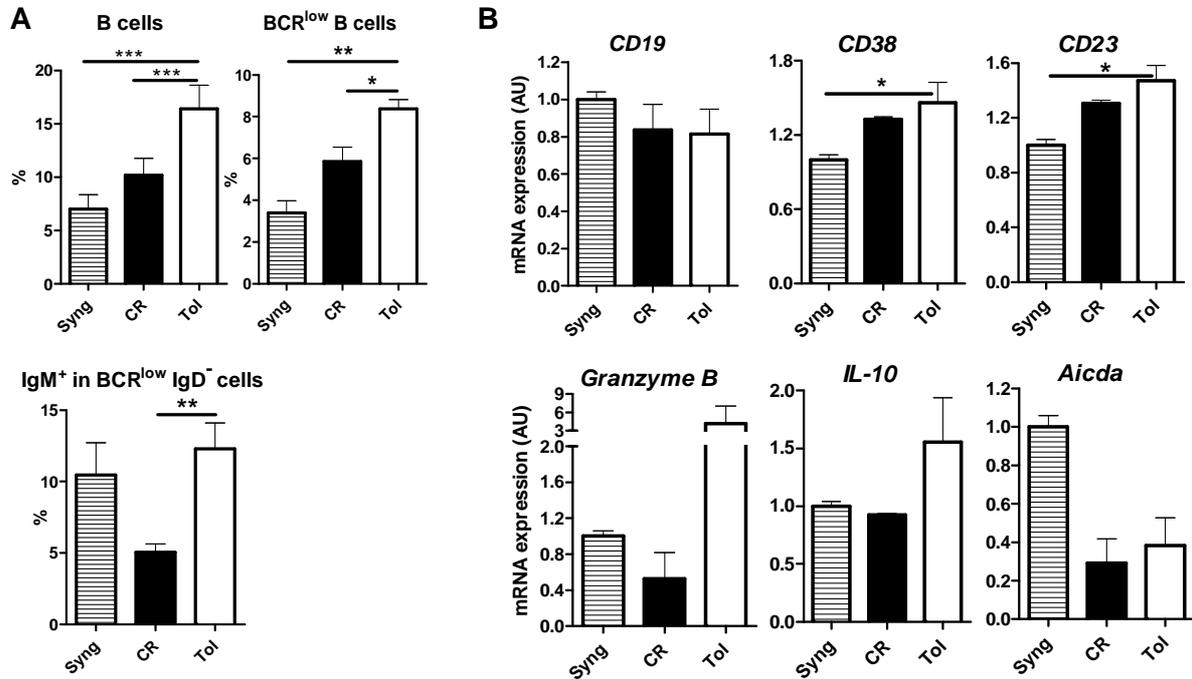


Figure 1 : Accumulated blood B cells in tolerant recipients are partially activated.

(A) % of B cells, of BCR^{low} and of IgM⁺ in BCR^{low}IgD⁻ B cells were assessed by flow cytometry as described in Material and Methods in blood of syngenic (Syng), chronically rejected (CR) and tolerant (Tol) recipients ± SEM, n≥5, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (B) mRNA expression of *CD19*, *CD38*, *CD23*, *Granzyme B*, *IL-10* and *Aicda* was analyzed by quantitative RT-PCR as described in Material and Methods in purified blood B cells from syngenic (Syng), chronically rejected (CR) and tolerant (Tol) recipients. Results were analyzed for the specific *gene/HPRT* transcript ratio, and expressed in arbitrary unit (AU) compared to syngenic recipients (= 1) ± SEM, n=4, *p<0.05.

Figure 2

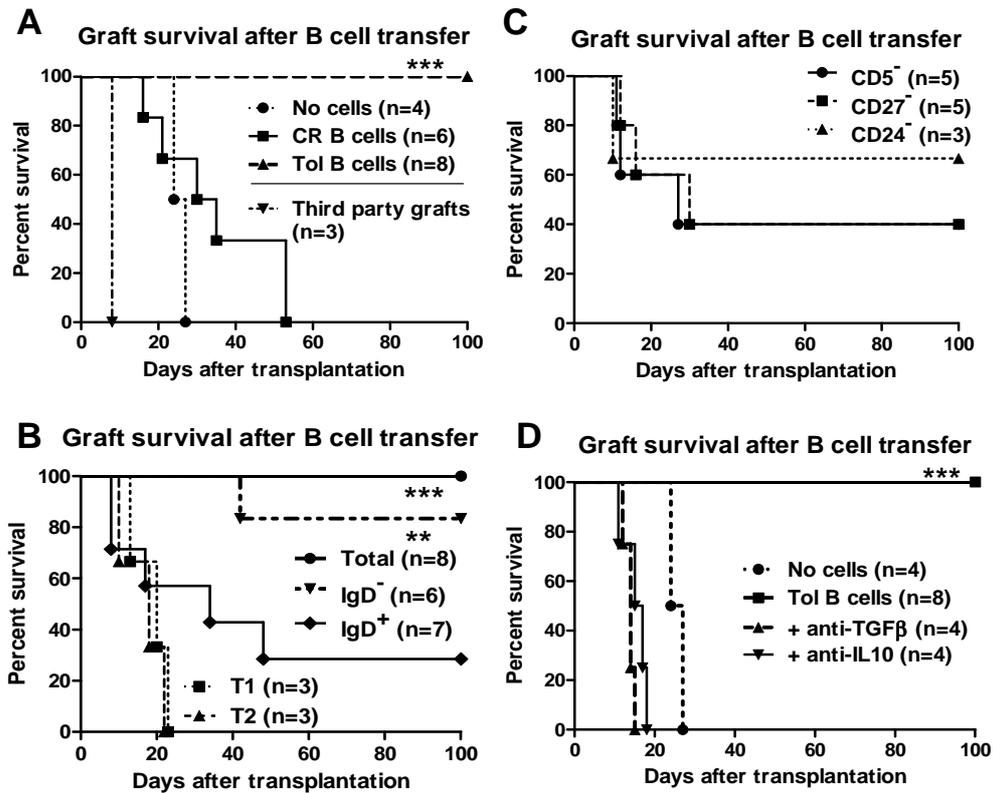


Figure 2 : Mechanisms and subpopulations of B cells that transfer tolerance.

(A) Survival curves of donor-type or third party allografts ($n \geq 3$; $***p < 0.001$) from recipients transferred with purified spleen B cells from chronically rejected (CR) or tolerant (Tol) recipients. (B, C, D) Survival curves of donor-type allografts ($n \geq 3$; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) from recipients transferred with purified subpopulations of spleen B cells from tolerant recipients as follow: (B) Total B, transitional 1 (T1), transitional 2 (T2), IgD⁻ or IgD⁺ cells, (C) CD5⁻, CD27⁻ or CD24⁻ cells or (D) total B cells with anti-TGFβ or anti-IL-10 neutralizing antibodies as described in Material and Methods.

Figure 3

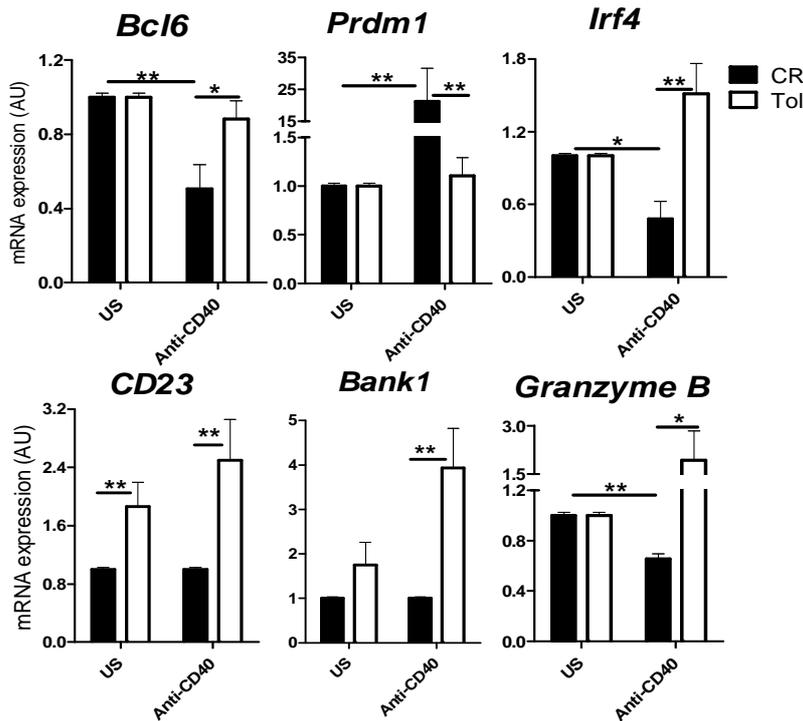


Figure 3 : Regulatory B cells are partially refractory to CD40 activation.

mRNA expression of *Bcl6*, *Prdm1*, *Irf4*, *CD23*, *Bank1* and *Granzyme B* was analyzed by quantitative RT-PCR as described in Material and Methods in purified IgD⁻ spleen B cells from chronically rejected (CR) and tolerant (Tol) recipients, either un-stimulated (US) or stimulated for 18 hours with anti-CD40 antibody. Results were analyzed for the specific *gene/HPRT* transcript ratio, and expressed in arbitrary unit (AU) compared to US cells from CR recipients (= 1) ± SEM, n=6, *p<0.05, **p<0.01.

Figure 4

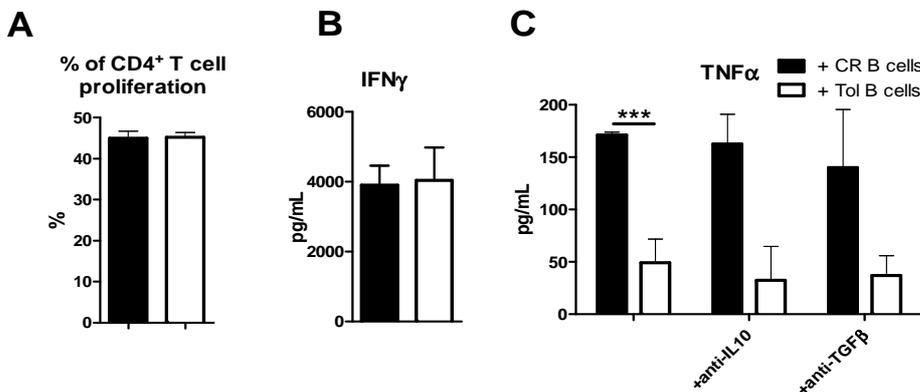


Figure 4 : Regulatory B cells suppress secretion of TNF α in MLR.

(A) % of proliferation and (B) IFN γ and (C) TNF α secretion in MLR of CFSE labelled-CD4⁺ T cells stimulated by donor-type dendritic cells, in the presence of IgD⁻ spleen B cells from chronically rejected (+CR B cells) or tolerant (+Tol B cells) recipients as described in Material and Methods. Neutralizing anti-IL10 or anti-TGF β antibodies (10 μ g/mL) were added in the MLR. Data were expressed in % of proliferation and cytokine expression was assessed by ELISA and expressed in pg/mL \pm SEM, n \geq 4, ***p<0.001.

Figure 5

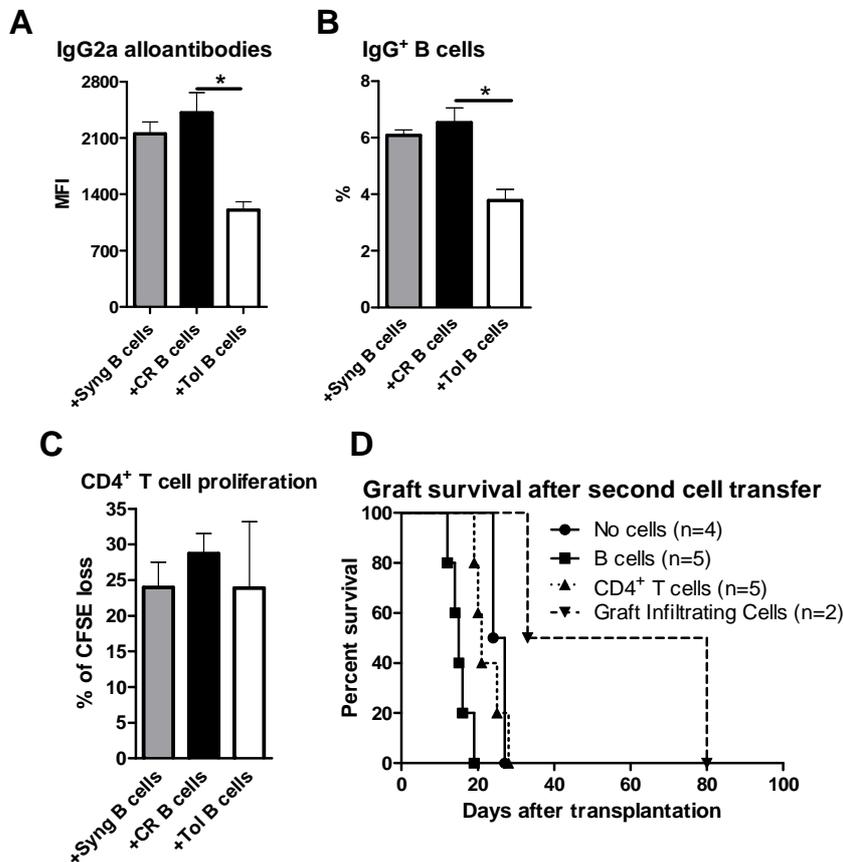


Figure 5 : Transfer of regulatory B cells suppresses anti-donor B cell response.

(A) Assessment of IgG2a alloantibodies in the sera from recipients transferred with spleen B cells from syngenic (+Syng B cells), chronically rejected (+CR B cells) or tolerant (+Tol B cells) recipients as described in Material and Methods. Results were expressed in MFI \pm SEM, n \geq 3, *p<0.05. (B) % of intracellular IgG⁺ B cells in the bone marrow from recipients transferred with spleen B cells from syngenic (+Syng B cells), chronically rejected (+CR B

cells) or tolerant (+Tol B cells) recipients \pm SEM, $n=4$, $*p<0.05$. (C) Spleen $CD4^+$ T cell proliferation in MLR from recipients transferred with spleen B cells from syngenic (+Syng B cells), chronically rejected (+CR B cells) or tolerant (+Tol B cells) recipients \pm SEM, $n=4$. (D) Survival curves of allografts in recipients re-transferred with graft infiltrating cells, $CD4^+$ T cells or B cells from spleen of recipients transferred with B cells from tolerant recipients ($n\geq 2$).

Figure 6

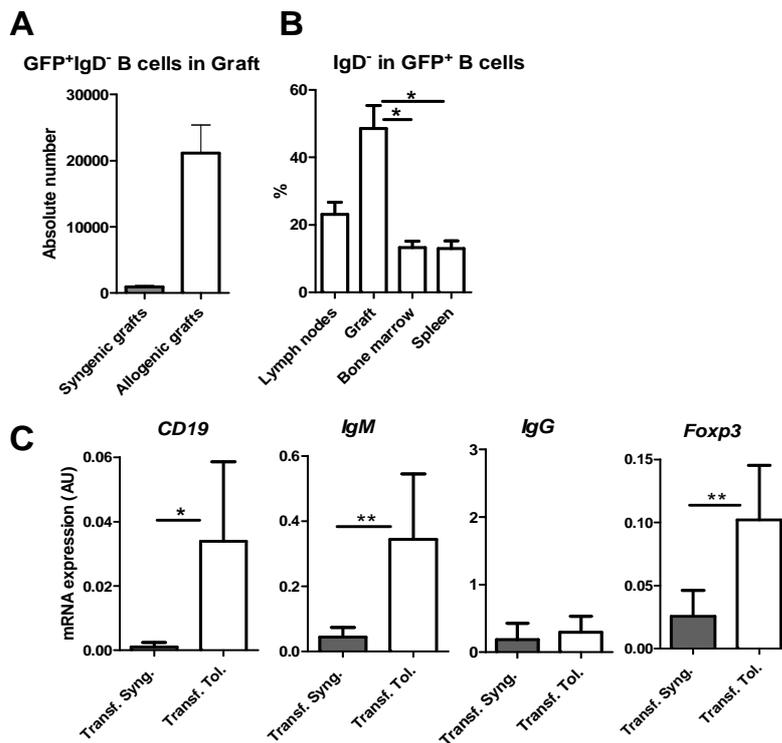


Figure 6 : Activated IgD⁻ B cells accumulate in the graft following transfer.

(A) Absolute number of GFP⁺IgD⁻ B cells following transfer of GFP⁺ spleen B cells from tolerant recipients in syngenic or allogenic grafts. (B) % of IgD⁻ in GFP⁺ B cells in lymph nodes, graft, bone marrow and spleen following transfer of GFP⁺ spleen B cells from tolerant recipients in allogenic grafted recipients, \pm SEM $n=4$, $*p<0.05$. (C) mRNA expression of *CD19*, *IgM*, *IgG* and *Foxp3* was analyzed by quantitative RT-PCR as described in Material and Methods in syngenic or allogenic grafts from recipients transferred with B cells from tolerant recipients. Results were analyzed for the specific *gene/HPRT* transcript ratio and expressed in arbitrary unit (AU) \pm SEM, $n\geq 4$, $*p<0.05$, $**p<0.01$.

Figure 7

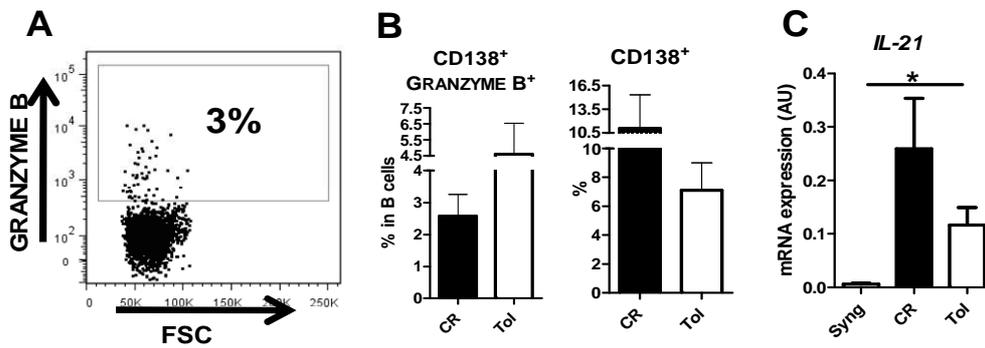


Figure 7 : Presence of CD138⁺ GRANZYME B⁺ B cells and *IL-21* in tolerated grafts.

(A) Protein expression of GRANZYME B was assessed by flow cytometry on graft B cells. Data were expressed as a representative Dot plot of GRANZYME B⁺ (%) versus side scatter (SSC) in B cells. (B) CD138⁺GRANZYME B⁺ in graft infiltrating B cells and CD138⁺ in total graft infiltrating cells were assessed by flow cytometry in chronically rejected (CR) and tolerant (Tol) recipients and expressed in % ± SEM, n≥3. (C) mRNA expression of *IL-21* was analyzed by quantitative RT-PCR as described in Material and Methods in grafts from syngenic (Syng), chronically rejected (CR) and tolerant (Tol) recipients. Results were analyzed for *IL-21/HPRT* transcript ratio and expressed in arbitrary unit (AU) ± SEM, n≥3, *p<0.05.

Target molecule	Sequences (Forward/Reverse)
<i>Aicda</i>	GGAGTCCAGATCGGGATCAT
	CCCAAATACGAAACGCATC
<i>Bank1</i>	AATGCTTCCTGTGGCTTCTG
	TCAAGTATAGAGCCCATTCTTG
<i>Bcl6</i>	ATCTAGGCTCAACCTGAGGGA
	ACTCTTCACGGGGAGGCTT
<i>CD19</i>	TTTTGCTACTGCCCCAAGC
	AAAGCCGCCATAGAAACCA
<i>CD23</i>	AGAGGTGGCAAAACTGTGGA
	TCCTGCTCCTTCTGGCTGT
<i>CD38</i>	GATCCAGGGGAAAATGTTCA
	CCAATGTGGGCAAGAGTCAT
<i>Foxp3</i>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
	CTGCTTGGCAGTGCTTGAGAA
<i>Granzyme B</i>	TGTGCTATGTGGCTGGTTGG
	TTTGATCTTTGGGTCCCCTG
<i>Hprt</i>	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC
	TTCGCTGATGACACAAACATGA
<i>IgG</i>	CATTCCCTGCCCCATC
	CCGTTTCACTTCCACTCCGT
<i>IgM</i>	ACCGCCTCTACCTTCATCGT
	CTGTGGGAGGGTCTCTTGCT
<i>IL-10</i>	TGCTATGTTGCCTGCTCTTACTG
	TCAAATGCTCCTTGATTTCTGG
<i>IL-21</i>	CGTGGCCATAAATCAAGCC
	AAGCTTCGTGCTCACATTGC
<i>Irf4</i>	CGGGCAAACAGGACTACAAC
	GCTCCCTCTGGAACAATCCT
<i>Prdm1</i>	AAGTATGCCGCCAACAACAG
	TTTTCTCCTCGTTAAAGCCGT

Table 1 – List of rat primers used for quantitative PCR

Discussion/Perspectives

Ces expériences nous ont permis d'en apprendre d'avantage sur les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces LB inhibés et accumulés dans le sang et régulateurs dans la rate des animaux tolérants, même si les outils développés chez le rat sont très restreints. L'existence de ces LB régulateurs promet de grandes avancées dans la recherche de traitements mieux adaptés et moins contraignants pour les patients, tout en garantissant une survie à long terme de leur greffon. La thérapie cellulaire représente à l'heure actuelle un des axes majeurs de la recherche dans l'établissement de cette tolérance spécialisée. Comme je l'ai explicité dans l'introduction (Partie II-B), différents types cellulaires, connus pour leurs propriétés régulatrices, sont étudiés afin de contrer l'activité des cellules effectrices et empêcher ainsi le rejet. Dans notre modèle, nous nous sommes alors intéressés au pouvoir tolérogène de ces lymphocytes B, mais également à leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

I-Characterisation des Breg

A/Caractérisation phénotypique des LB régulateurs

L'une de nos perspectives est bien évidemment de continuer la caractérisation de ces LB régulateurs en utilisant des marqueurs plus restrictifs et permettant d'identifier plus précisément la sous-population de ces Breg. Cela risque d'être contraignant, du fait du manque d'un marqueur exclusif pour ces cellules et de l'hétérogénéité d'autres marqueurs exprimés à la surface des LB, pouvant être présents à différents stades pendant la différenciation de ces lymphocytes et de ce fait, ne permettant pas d'identifier un état d'activation spécifique. Au vu des marqueurs dont nous sommes déjà en possession, nous supposons que nos Breg, enrichis dans la sous-population $IgD^{neg} IgM^{low/neg}$, correspondent plutôt à des LB activés (plasmablastes ou mémoires) qui ont une mémoire antigénique car ils ont déjà rencontré l'antigène. Nos résultats semblaient jusqu'à présent aller à l'inverse de ce qui est observé dans la littérature. En effet, la plupart des études réalisées chez la souris et l'Homme afin de caractériser le phénotype de ces Breg pointaient généralement un phénotype de cellules B transitionnelles/naïves et non des LB de fin de maturation comme les plasmocytes ou les LB mémoires (Blair et al., 2010b)(Iwata et al., 2011)(Mauri et al., 2003b) (Montandon et al., 2013). Cependant, avec le seul marqueur IgD, nos Breg pourraient non seulement correspondre à des LB activés, qui auraient déjà diminué l'expression de l'IgD afin

de se préparer à la recombinaison isotypique, mais également à une sous-population de LB très immatures qui n'exprimeraient pas encore l'IgD à leur surface. Or, ces cellules pré-B, même si elles n'expriment pas encore l'IgD, possèdent quand même à leur surface une IgM. Lors de nos premières expériences, nous avons réalisé des tris des cellules B de la rate des animaux tolérants avec les marqueurs IgD et IgM (*Figure A*) et ainsi, la population que nous appelons ensuite IgD^{neg} correspondait en fait à une sous-population de LB IgD^{neg} et IgM^{low/neg}, capable d'induire une tolérance chez des rats nouvellement greffés, écartant ainsi l'hypothèse de Breg immatures.

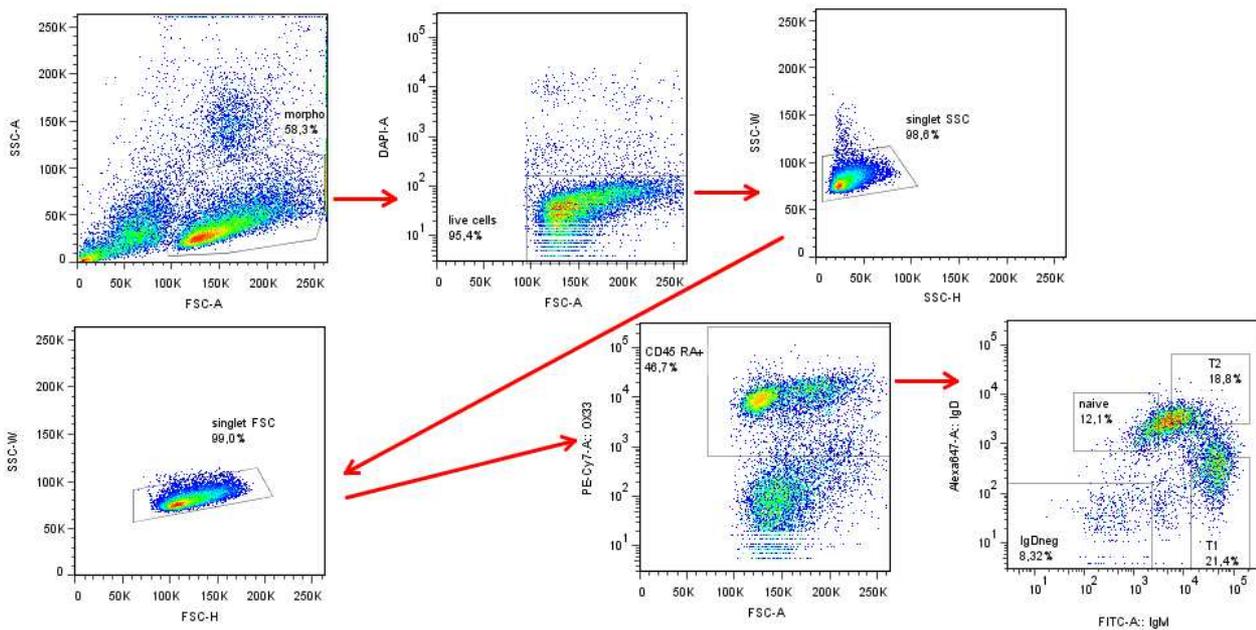


Figure A : Image représentant la stratégie de tri des lymphocytes B de la rate des animaux tolérants

De plus, une très récente étude a permis de démontrer l'existence de LB régulateurs dans le sang de volontaires sains, capables d'inhiber la prolifération et la sécrétion d'IFN γ par des LT CD4⁺ autologues via l'IL-10 qu'ils sécrètent, et enrichis dans les sous-populations de LB transitionnels CD19⁺ CD24^{high} CD38^{high} mais également de LB mémoires CD19⁺ IgM⁺ CD27⁺ (Khoder et al., 2014). Ainsi, nous n'excluons pas la possibilité que ces Breg proviennent d'un progéniteur dans la moelle, qui en migrant vers la rate acquièrent un phénotype plus activé, rencontrent l'antigène et acquièrent donc leur mémoire antigénique en sortant de la rate, pour finalement migrer vers le greffon pour induire la tolérance. De façon intéressante, une étude de 1996 avait démontré le rôle de la DSG chez la souris sur les populations lymphocytaires T et B (Wang et al., 1996). L'effet sur la différenciation des LT

dans le thymus a déjà été évoqué précédemment (Partie Résultats I-B). De façon surprenante, pendant un traitement avec la DSG chez une souris, il a été observé une disparition progressive des cellules lymphoïdes sans affectation du compartiment myéloïde au sein de la moelle osseuse (siège de la différenciation précoce des LB). Grâce à différents marqueurs cellulaires permettant d'identifier les sous-populations de LB pré-B, pro-B et matures, ils ont pu démontrer que la DSG éliminait les sous-populations de LB pas encore matures subissant l'expansion et la sélection, et au contraire épargnait les populations de LB très immatures et très matures. Une autre étude réalisée chez la souris a également démontré que la DSG bloquait la différenciation des lymphocytes pré-B sIgM⁻ en LB matures IgM⁺ (Tepper et al., 1995). Durant ma thèse, je me suis également intéressée à l'effet du LF15-0195 chez la souris, dans un modèle de greffe de peau male sur femelle (résultats non-publiés). Nous avons alors observé dans le sang des souris traitées une forte inhibition de la présence de LB transitionnels T1 nouvellement sortis de la moelle pendant le traitement, inhibition progressivement levée suite à l'arrêt du traitement. Ainsi, nous n'excluons pas l'hypothèse que notre sous-population de Breg, bien que retrouvée avec un phénotype activé dans la rate, le sang et le greffon des rats tolérants, puisse provenir initialement de LB présents dans la moelle à des stades très précoces ou très avancés de leur différenciation suite au traitement LF, qui auraient alors été éduqués et auraient remodelé leur répertoire en présence de l'antigène de la greffe.

Nous avons démontré qu'*in vitro*, les LB des animaux Tol n'étaient pas capables de diminuer l'expression de BCL6 ni d'augmenter celle de PRDM1 suite à une stimulation anti-CD40 contrairement à ceux des animaux en RC, que ce soit des LB immatures IgD⁺ ou des LB déjà activés IgD^{neg}. De plus, nous avons préalablement démontré une accumulation dans le sang de LB bloqués au niveau du switch IgM vers IgG (Le Texier et al., 2011). Cela souligne le fait que les LB des Tol semblent être bloqués à une étape dans la différenciation en plasmocytes ou utilisent une voie alternative pour leur activation. De façon intéressante, des études chez l'Homme ont démontré la présence de LB dans le sang de patients opérationnellement tolérants présentant un défaut dans leur différenciation terminale *in vitro* en plasmocytes (Chesneau et al., 2014). Ces résultats soulignent l'homologie qui existe entre les phénomènes observés chez l'Homme et chez le rat, et donc l'intérêt de ces études plus approfondies chez le rongeur pour lequel nous avons accès à l'organisme tout entier. Nous avons également observé une surexpression d'IRF4 par les LB de la rate des animaux tolérants, qui peut être lié au phénotype régulateur de ces cellules. En effet, des études récentes sur des DC ont démontré le rôle important d'IRF4 dans le contrôle de réponses

immunes, notamment de réponse de type Th1, en inhibant la production d'IL-12 (Akbari et al., 2014). De plus, une autre étude a mis en évidence le rôle d'IRF4 dans un phénotype de Breg en démontrant que l'expression d'IRF4 seule dans une lignée cellulaire B pouvait augmenter l'expression IL-10 dans les surnageants de culture (Rangaswamy and Speck, 2014). Nous avons ensuite réalisé des études complémentaires afin de comparer l'expression de ces trois molécules chez des animaux tolérants, en rejet chronique mais également naïfs (*Figure B*) afin de voir comment se comportaient exactement les LB des tolérants, à savoir s'ils étaient plus proches des LB des rats naïfs ou de ceux en rejet chronique. Ce que nous observons est très intéressant car il semble que les LB des rats CR et naïfs se comportent finalement de la même façon contrairement aux LB des rats Tol. En effet, alors que les LB des rats naïfs et CR diminuent l'expression de BCL6 et augmentent celle de PRDM1 suite à la stimulation avec l'anti-CD40, les LB des rats Tol ne modulent pas l'expression de ces deux molécules, suggérant un vrai défaut d'activation des LB des Tol. De plus, seuls les LB des rats Tol augmentent l'expression d'IRF4, soulignant un rôle probable de cette molécule dans les phénomènes de tolérance.

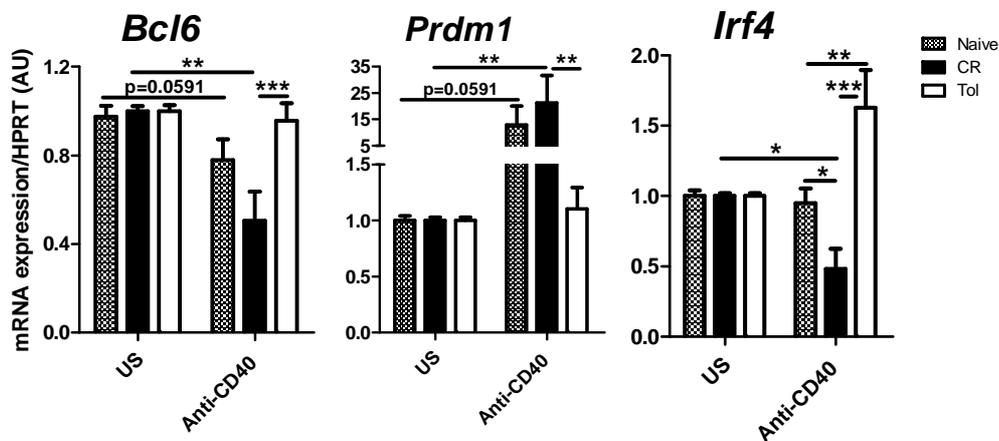


Figure B : Histogrammes représentant l'expression de l'ARN messager des molécules BCL6, PRDM1, IRF4 par les lymphocytes B de la rate de rats naïfs, greffés allogéniquement tolérant leur greffe (Tol) ou en rejet chronique (CR).

Nous avons également observé une forte expression des molécules inhibitrices BANK1 et CD23 par les LB des rats tolérants. BANK1 est un inhibiteur de la voie d'activation des LB médiée par le CD40 (Aiba et al., 2006b), suggérant ainsi que la forte expression de ces

molécules puisse empêcher une activation via la voie de signalisation du CD40 efficace, ou bien augmenter le seuil d'activation des LB conduisant à une activation non-efficace du LB.

L'expression d'autres molécules impliquées dans les phénomènes d'immunosuppression, telles qu'IDO ou plus récemment l'IL-35, a également été analysée dans ces LB triés de la rate des animaux tolérants ou en rejet chronique. Malheureusement, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes pour le transcrite de p35 (l'une des sous-unités de l'IL-35). Les transcrits d'IDO et d'EBI3, la seconde sous-unité de l'IL-35, étaient quant à eux indétectables dans les échantillons.

B/Caractérisation fonctionnelle des Breg

Dans cette étude, nous avons démontré le rôle du TGF β et de l'IL-10 dans le phénomène de transfert de la tolérance *in vivo*, via l'administration d'anticorps bloquants post-greffes, qui ne sont alors pas en mesure de permettre l'établissement d'une tolérance chez les receveurs. Ces cytokines sont importantes à de nombreux niveaux dans les phénomènes de réponses immunes. Cependant, elles sont exprimées par différents types cellulaires. Ce que nous observons dans notre modèle ne peut alors pas nous permettre d'affirmer que le transfert de tolérance via les LB se fait par la sécrétion d'IL-10 et de TGF β par ces cellules même. En effet, ce phénomène pourrait être du à la sécrétion de ces cytokines par des LT ou des DC, qui en agissant sur les LB, induisent le changement de phénotype des LB en Breg.

La particularité de l'existence de LB exprimant Granzyme B en présence d'IL-21 a déjà été identifiée chez l'Homme dans des modèles de tumeurs. En effet, des études ont permis de démontrer qu'en présence d'IL-21, d'un signal BCR opérationnel et de LT effecteurs mais en l'absence d'une liaison CD40-CD40L efficace, les LB étaient induits à se différencier en cellules B Granzyme B⁺ possédant des propriétés régulatrices (Lindner et al., 2013)(Hagn et al., 2010)(Hagn et al., 2012b). En revanche, il a été démontré qu'il n'y avait pas d'équivalent chez la souris (Hagn et al., 2012a). La force de notre modèle est d'avoir mis en évidence l'existence de ces LB Granzyme B⁺ chez le rat. Ainsi, dans notre modèle, les LB ayant un défaut au niveau de la voie de signalisation du CD40 et surexprimant des molécules inhibitrices peuvent mener à une liaison CD40-CD40L non-efficace et, par des stimulations répétées avec les antigènes du donneur, conduire à la génération de cellules B Granzyme B⁺ régulant localement la réponse inflammatoire au niveau du greffon. En revanche, à l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de savoir si ces LB particuliers correspondent ou non

aux LB régulateurs capables d'induire une tolérance à long-terme chez de nouveaux receveurs irradiés et greffés. Au vu du faible nombre de LB exprimant le Granzyme B, il n'est pas possible de les utiliser *in vivo* en les injectant directement après le tri. De plus, le Granzyme B étant un marqueur intracellulaire, le tri de ces cellules conduirait à la destruction de leur membrane et donc à l'incapacité d'étudier le rôle de ces cellules *in vivo*. Pour y remédier, il faudrait pouvoir les étendre *in vitro*, afin d'avoir un nombre de cellules suffisant avant de les injecter à de nouveaux receveurs. De même, des tests *in vitro* pourraient être utilisés pour étudier le pouvoir suppressif de ces LB dans une MLR. L'un des « stimulateurs » évident pouvant être utilisé pour permettre l'expansion de ces LB semble, d'après les études citées précédemment, être l'IL-21.

Nous avons démontré dans ce modèle l'émergence de LB régulateurs suite à l'arrêt d'un traitement immunosuppresseur, capables de garder leur fonction suppressive et leur phénotype de cellules inhibées suite à un transfert, soulignant leur stabilité même au sein d'un environnement inflammatoire (induit par la greffe). Ceci souligne le caractère important de ces cellules, qui pourrait alors être transposé de ce modèle à l'Homme. Nous nous intéressons alors à l'existence ou non de ces cellules à l'état naturel, soit en l'absence de toute opération chirurgicale et de tout traitement. En effet, si ces cellules sont présentes naturellement, nous pourrions envisager de les isoler du patient directement à partir du sang ou de la moelle, les étendre *ex vivo/in vitro*, puis de les réinjecter au patient pré ou post-greffe.

Dans notre modèle, nous avons observé à la fois la présence de Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ et de Breg IgD^{neg} bloqués au niveau du switch dans la rate et le greffon. Ainsi, nous sommes à même de nous demander si ce sont les Treg générés suite au traitement avec le LF15-0195 qui auraient éduqués des LB émergents de la moelle au contact de l'antigène, ou bien si c'est le cas inverse. En effet dans la littérature, une étude a démontré que des LB du sang de volontaires sains, pré-activés via le CD40, étaient capables d'induire la prolifération de Treg, et ce de façon plus efficace que des DC immatures (Zheng et al., 2010). Au sein de nos greffons tolérés, nous observons la présence de LB préférentiellement de grosse taille, avec un phénotype de cellules activées puisqu'ils sont à plus de 50% IgD^{neg} et IgM^{low/neg}, ce qui a tendance à écarter l'hypothèse de LB immatures/pré-B et à privilégier celle de LB activés (*Figure C*). De plus, ces LB sont faiblement CD27⁺, ce qui confirme l'hypothèse de cellules B plasmablastes/plasmocytes bloquées au niveau du switch des Ig et non des LB mémoires.

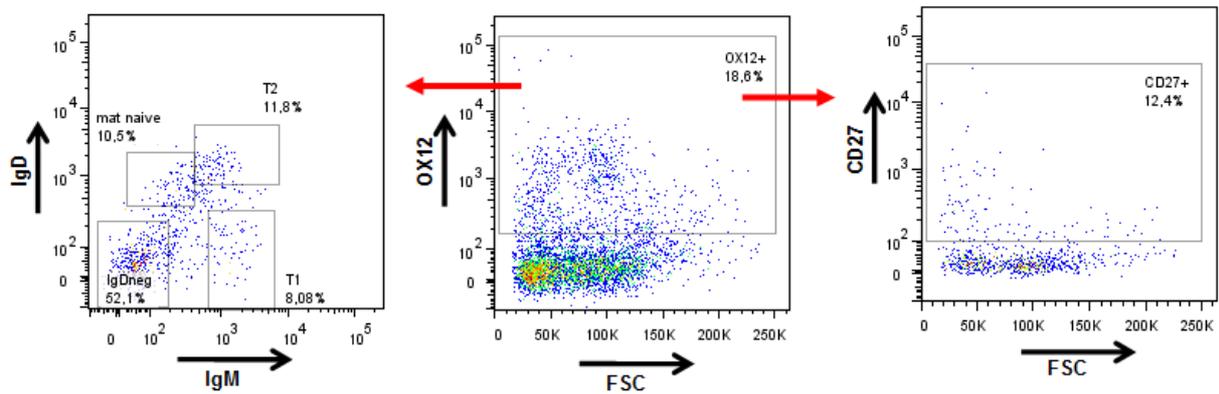


Figure C: Dot-plots représentatifs du phénotype des lymphocytes B présents dans les greffons tolérés.

Dans le modèle annexe de greffe de peau chez la souris, étudié également pendant ma thèse, nous avons aussi retrouvé des lymphocytes T régulateurs présents dans le ganglion drainant de la greffe, au contact de LB « killers » activés $GL7^+ CD95^+$ (Figure D), confirmant la probable coopération LT/LB afin d'induire une tolérance efficace à long terme. Nous pensons alors par la suite utiliser des rats déficients en LB (KO pour IgM, en collaboration avec la Plateforme Transgénique de Nantes, dirigée par le Dr Ignacio Anegón), afin d'étudier le rôle de ces LB dans l'induction/expansion de LT régulateurs (Ménoret et al., 2010).

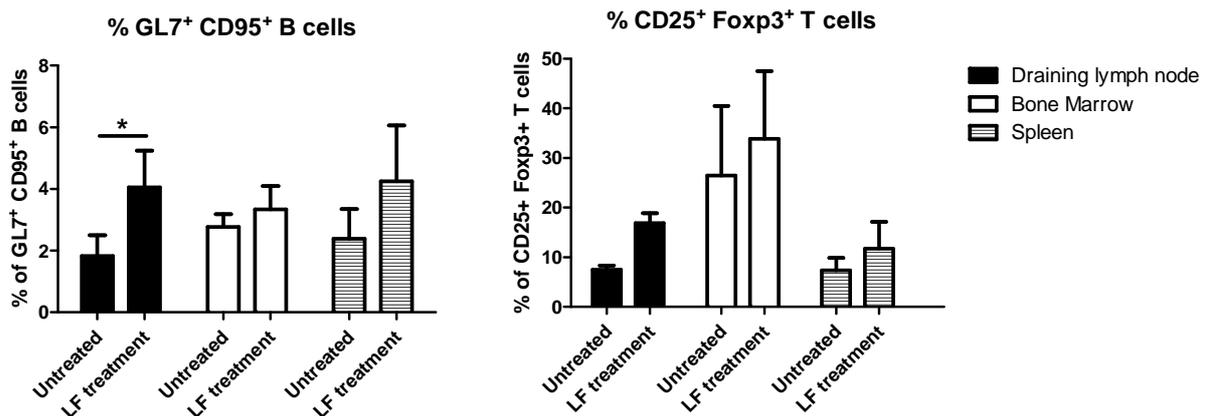


Figure D: Histogrammes représentant les cellules B $GL7^+ CD95^+$ et les LT $CD25^+ Foxp3^+$ dans le ganglion drainant de la greffe, la moelle osseuse et la rate de souris non-traitées ou traitées avec le LF15-0195 pendant vingt jours suite à une greffe de peau male sur femelle.

II-Expansion de LB in vitro et isolement des LB amplifiés

A/Expansion de LB in vitro

Afin d'étudier la possibilité d'expandre des LB *in vitro*, nous avons réalisé des tests préliminaires à l'aide d'une banque de peptides spécifiques du donneur Lew 1W (en collaboration avec C. Guillonnet de l'Equipe 2 de l'unité Inserm U1064). Ces peptides ont préalablement été utilisés chez le rat dans un modèle de tolérance à une allogreffe Lew 1W sur Lew 1A via l'injection d'un adénovirus CD40-Ig, dans lequel il a été observé l'induction de LT CD8⁺ CD45RC^{low} régulateurs capables de transférer la tolérance chez un nouveau receveur (Guillonnet et al., 2007b). L'utilisation de ces peptides a permis de démontrer qu'un peptide particulier, dérivé d'une région polymorphique du CMH de classe II, était capable d'expandre ces Treg en présence de DC plasmacytoïdes, et que le transfert de ces Treg induisait une tolérance chez un second receveur (Picarda et al., 2014). Le but a donc été de voir si, en mettant en contact des LB du sang d'animaux tolérants et en rejet chronique avec seulement différents peptides pendant cinq jours, nous étions capables de stimuler ces LB. Nous avons également réalisé les mêmes expériences avec des LT CD4⁺ CD25⁺ purifiés en coculture avec des DC de la rate syngéniques (Lew 1A) stimulées, afin de voir si les mêmes peptides étaient capables de stimuler en même temps les LT et les LB, mais également de voir si certains peptides n'étaient capables d'activer que les cellules des animaux en rejet chronique et pas celles des animaux tolérants. Les résultats préliminaires (*Figure E*) nous ont permis de valider le fait que les LB pouvaient être directement activés par certains peptides, de la même façon que les LT. Ces observations ne peuvent être vraies que si nous supposons que les cellules B répondant aux peptides sont des cellules qui ont été déjà activées et ont déjà rencontré les antigènes du donneur, correspondant donc à des LB mémoires/plasmocytes. Nous avons observé dans un premier temps que certains pools de cinq à six peptides (n°2 et 5) étaient capables d'activer les LB des animaux tolérants comme ceux des animaux en rejet chronique, visualisé par une up-régulation des marqueurs d'activation CD80, CD86 et par une diminution de l'expression du CMH de classe II. En revanche, nous avons pu observer que les LB des rats tolérants étaient plus réfractaires à cette activation et modulaient donc beaucoup moins l'expression de ces différentes molécules contrairement aux LB de ceux en rejet chronique. De plus, de façon intéressante, certains pools de peptides (n°4 et 7) sont capables d'activer les LB des rats en rejet chronique mais pas ceux des animaux tolérants, pouvant suggérer un rôle de ces peptides dans l'induction de cellules B sécrétrices d'anticorps

spécifiques du donneur afin de détruire le greffon. Aussi, certains de ces peptides ont le pouvoir d'activer des LB effecteurs et régulateurs sans distinction entre les deux mécanismes, alors que d'autres peuvent activer différemment des LB « pathogènes » de rats en CR et des LB « régulateurs » de rats Tol.

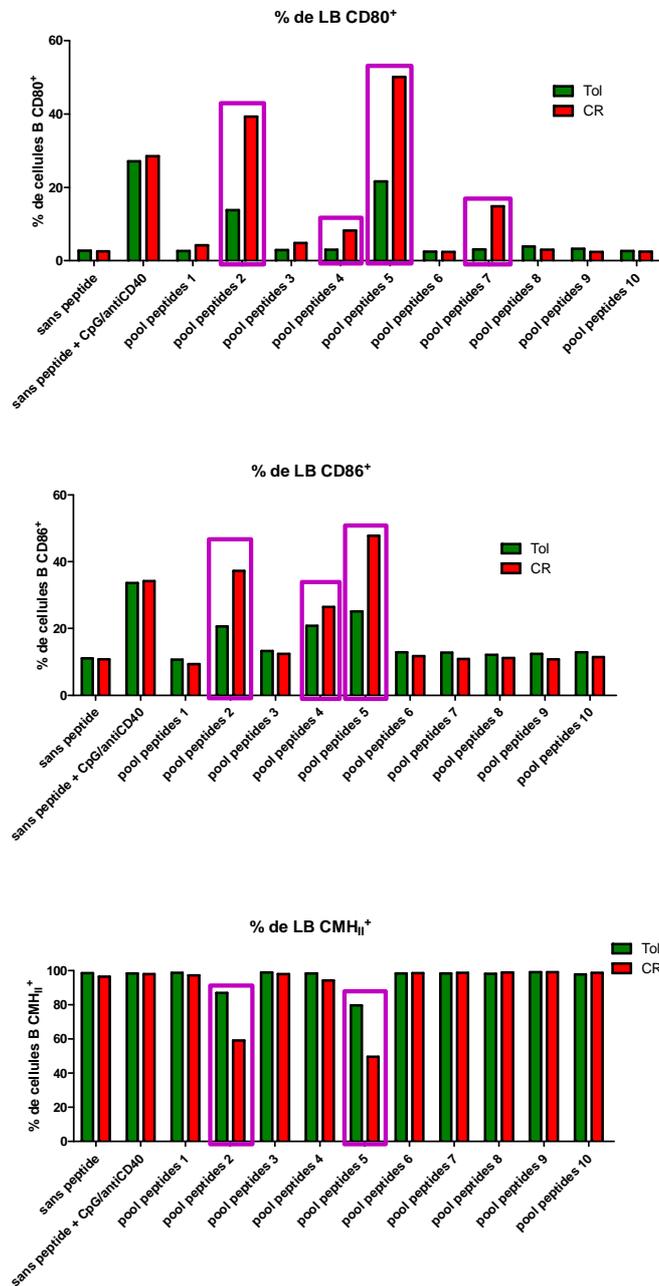


Figure E: Histogrammes représentant le pourcentage de cellules B CD80⁺, CD86⁺ et CMH de classe II⁺ du sang de rats tolérants (Tol) ou en rejet chronique (CR) suite à une co-culture avec des peptides du donneur LEW 1W.

Nous allons alors poursuivre l'analyse en regardant individuellement ce que chacun de ces 82 peptides est capable d'induire ou non, sur les LB du sang de rats tolérants et de rats en rejet chronique dans un premier temps, puis nous étudierons également la réponse des LB de la rate de ces animaux face à ces différents peptides, afin de voir si les mêmes LB sont capables de répondre aux mêmes peptides quelque soit leur localisation dans l'organisme.

B/ Isolement des LB par des tétramères

Ensuite, nous pensons développer une méthode dans le but d'isoler les LB ayant répondu à certains peptides au bout des 5 jours, par l'intermédiaire de tétramères. En effet, à la manière de l'étude de 2013 réalisée sur des LB spécifiques de la MOG chez des patients atteints de sclérose en plaques (Degauque et al., 2013), nous pensons coupler le (ou les) peptide(s) stimulant l'expansion de nos LB sur des billes fluorescentes afin de pouvoir les isoler spécifiquement et étudier plus précisément leur phénotype. Ainsi, nous pourrions isoler de façon plus efficace les LB ayant répondu à la stimulation par certains peptides et s'en servir pour étudier leur localisation au sein de différents tissus comme le sang, la rate ou le greffon.

C/Test de suppression *in vitro*

Grâce à l'outil décrit précédemment, nous pourrions alors envisager d'ajouter ces LB isolés sur une MLR afin de voir si certains LB répondant à des peptides particuliers possèdent une fonction régulatrice. En effet, nous serons à même de distinguer chez des rats tolérants ou en rejet chronique des LB effecteurs de LB régulateurs. Ainsi, afin d'élargir les applications à la thérapie clinique, nous souhaiterions réaliser ces expériences chez des rats naïfs et déterminer ainsi si des LB régulateurs existent à l'état naturel. Si tel est le cas, nous pourrions alors envisager d'expandre spécifiquement ces cellules à l'aide des peptides concernés, et de les transférer chez de nouveaux receveurs. Des résultats encourageants obtenus dans ces conditions nous permettraient alors de voir plus loin dans l'application thérapeutique de ces cellules régulatrices. Une collaboration avec l'équipe du Dr Brouard serait alors envisageable afin d'étudier le potentiel tolérogène de ces cellules chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

- Aiba, Y., Yamazaki, T., Okada, T., Gotoh, K., Sanjo, H., Ogata, M., and Kurosaki, T. (2006a). BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity* 24, 259–268.
- Aiba, Y., Yamazaki, T., Okada, T., Gotoh, K., Sanjo, H., Ogata, M., and Kurosaki, T. (2006b). BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity* 24, 259–268.
- Akbari, M., Honma, K., Kimura, D., Miyakoda, M., Kimura, K., Matsuyama, T., and Yui, K. (2014). IRF4 in dendritic cells inhibits IL-12 production and controls Th1 immune responses against *Leishmania major*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 2271–2279.
- Akbari, O., Stock, P., Singh, A.K., Lombardi, V., Lee, W.-L., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., Umetsu, D.T., and Dekruyff, R.H. (2010). PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol.* 3, 81–91.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *Plos One* 6, e24226.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19, 345–354.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., and Fallon, P.G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1114–1124.e8.
- Anolik, J.H., Barnard, J., Owen, T., Zheng, B., Kemshetti, S., Looney, R.J., and Sanz, I. (2007). Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum.* 56, 3044–3056.
- Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., Ashline, D.J., Reinhold, V.N., Paulson, J.C., and Ravetch, J.V. (2008a). Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 320, 373–376.
- Anthony, R.M., Wermeling, F., Karlsson, M.C.I., and Ravetch, J.V. (2008b). Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19571–19578.
- Anthony, R.M., Kobayashi, T., Wermeling, F., and Ravetch, J.V. (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475, 110–113.
- Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.*

11, 854–861.

Ashour, H.M., and Niederkorn, J.Y. (2006). Peripheral tolerance via the anterior chamber of the eye: role of B cells in MHC class I and II antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5950–5957.

Azuma, H., Chandraker, A., Nadeau, K., Hancock, W.W., Carpenter, C.B., Tilney, N.L., and Sayegh, M.H. (1996). Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12439–12444.

Baddoura, F.K., Nasr, I.W., Wrobel, B., Li, Q., Ruddle, N.H., and Lakkis, F.G. (2005). Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 510–516.

Badell, I.R., Russell, M.C., Thompson, P.W., Turner, A.P., Weaver, T.A., Robertson, J.M., Avila, J.G., Cano, J.A., Johnson, B.E., Song, M., et al. (2010). LFA-1-specific therapy prolongs allograft survival in rhesus macaques. *J. Clin. Invest.* 120, 4520–4531.

Ballet, C., Renaudin, K., Degauque, N., Mai, H.L., Boëffard, F., Lair, D., Berthelot, L., Feng, C., Smit, H., Usal, C., et al. (2009). Indirect CD4+ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 697–708.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.

Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S., and Okumura, K. (2005). Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 115, 1896–1902.

Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.-K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115, 975–984.

Battaglia, M., Stabilini, A., Draghici, E., Gregori, S., Mocchetti, C., Bonifacio, E., and Roncarolo, M.-G. (2006). Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 55, 40–49.

Bedke, J., and Stenzl, A. (2010). Immunologic mechanisms in RCC and allogeneic renal transplant rejection. *Nat. Rev. Urol.* 7, 339–347.

Benichou, G., Takizawa, P.A., Olson, C.A., McMillan, M., and Sercarz, E.E. (1992). Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J. Exp. Med.* 175, 305–308.

Bennett, W.M., DeMattos, A., Meyer, M.M., Andoh, T., and Barry, J.M. (1996). Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 28, 2100–2103.

Bereshchenko, O.R., Gu, W., and Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the

transcriptional repressor BCL6. *Nat. Genet.* 32, 606–613.

Billingham, R.E., BRENT, L., and MEDAWAR, P.B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603–606.

Binder, C.J., Hartvigsen, K., Chang, M.-K., Miller, M., Broide, D., Palinski, W., Curtiss, L.K., Corr, M., and Witztum, J.L. (2004). IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 114, 427–437.

Bingaman, A.W., and Farber, D.L. (2004). Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 846–852.

Blair, P.A., Chavez-Rueda, K.A., Evans, J.G., Shlomchik, M.J., Eddaoudi, A., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2009). Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 3492–3502.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010a). 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.

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010b). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32, 129–140.

Bölling, T., Kreuziger, D.C., Ernst, I., Elsayed, H., and Willich, N. (2011). Retrospective, monocentric analysis of late effects after Total Body Irradiation (TBI) in adults. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgengesellschaft A1* 187, 311–315.

Bonardelle, D., Benihoud, K., Kiger, N., and Bobé, P. (2005). B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1052–1059.

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

Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13, 829–840.

Brandt, C., Liman, P., Bendfeldt, H., Mueller, K., Reinke, P., Radbruch, A., Worm, M., and Baumgrass, R. (2010). Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 77, 607–613.

Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., et al. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 15448–15453.

Brown, K., Sacks, S.H., and Wong, W. (2011). Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur. J. Immunol.* *41*, 89–96.

Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., and Hansen, W. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *34*, 623–630.

Bruhns, P., Samuelsson, A., Pollard, J.W., and Ravetch, J.V. (2003). Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* *18*, 573–581.

Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., and Ware, C.F. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* *373*, 441–444.

Buckwalter, M.R., and Albert, M.L. (2009). Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr. Biol. Cb* *19*, R355–361.

Cai, J., Lee, J., Jankowska-Gan, E., Derks, R., Pool, J., Mutis, T., Goulmy, E., and Burlingham, W.J. (2004). Minor H Antigen HA-1–specific Regulator and Effector CD8⁺ T Cells, and HA-1 Microchimerism, in Allograft Tolerance. *J. Exp. Med.* *199*, 1017–1023.

Callard, R.E., Herbert, J., Smith, S.H., Armitage, R.J., and Costelloe, K.E. (1995). CD40 cross-linking inhibits specific antibody production by human B cells. *Int. Immunol.* *7*, 1809–1815.

Calne, R., Friend, P., Moffatt, S., Bradley, A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K., and Waldmann, H. (1998). Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* *351*, 1701–1702.

Calne, R., Moffatt, S.D., Friend, P.J., Jamieson, N.V., Bradley, J.A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K.G., and Waldmann, H. (1999). Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* *68*, 1613–1616.

Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 179–185.

Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., and Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5569–5579.

Celli, S., Albert, M.L., and Bousso, P. (2011). Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat. Med.* *17*, 744–749.

Chang, A.T., and Platt, J.L. (2009). The role of antibodies in transplantation. *Transplant. Rev. Orlando Fla* 23, 191–198.

Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986–991.

Chen, X., and Jensen, P.E. (2007). Cutting edge: primary B lymphocytes preferentially expand allogeneic FoxP3⁺ CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 2046–2050.

Chen, W., Ford, M.S., Young, K.J., Cybulsky, M.I., and Zhang, L. (2003). Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 1846–1853.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237–1240.

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. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 144–155.

Chiffoleau, E., Bériou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soullillou, J.-P., and Cuturi, M.C. (2002a). Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2, 745–757.

Chiffoleau, E., Bériou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soullillou, J.-P., and Cuturi, M.C. (2002b). Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 5058–5069.

Chin, J.T., Troke, J.J., Kimura, N., Itoh, S., Wang, X., Palmer, O.P., Robbins, R.C., and Fischbein, M.P. (2011). A novel cardioprotective agent in cardiac transplantation: metformin activation of AMP-activated protein kinase decreases acute ischemia-reperfusion injury and chronic rejection. *Yale J. Biol. Med.* 84, 423–432.

Chou, H.-S., Hsieh, C.-C., Charles, R., Wang, L., Wagner, T., Fung, J.J., Qian, S., and Lu, L.L. (2012). Myeloid-derived suppressor cells protect islet transplants by B7-H1 mediated enhancement of T regulatory cells. *Transplantation* 93, 272–282.

Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417–428.

Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.

- Clatworthy, M.R. (2011). Targeting B Cells and Antibody in Transplantation. *Am. J. Transplant.* *11*, 1359–1367.
- Clatworthy, M.R., Watson, C.J.E., Plotnek, G., Bardsley, V., Chaudhry, A.N., Bradley, J.A., and Smith, K.G.C. (2009). B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2683–2685.
- Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 6003–6010.
- Cohen, A.H., and Nast, C.C. (1998). TGF-beta in renal allograft rejection. *Miner. Electrolyte Metab.* *24*, 197–201.
- Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* *9*, 243–269.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566–569.
- Colovai, A.I., Mirza, M., Vlad, G., Wang, S. u, Ho, E., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2003). Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum. Immunol.* *64*, 31–37.
- Colvin, R.B., and Smith, R.N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 807–817.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 1757–1764.
- Cortesini, R., Renna-Molajoni, E., Cinti, P., Pretagostini, R., Ho, E., Rossi, P., and Suci-Foca Cortesini, N. (2002). Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. *Hum. Immunol.* *63*, 1010–1018.
- Couper, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5771–5777.
- Coutinho, A., and Möller, G. (1975). Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv. Immunol.* *21*, 113–236.
- Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L., and Gray, D. (2006). Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3498–3506.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626–635.

- Cyster, J.G., Hartley, S.B., and Goodnow, C.C. (1994). Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371, 389–395.
- Dang, V.D., Hilgenberg, E., Ries, S., Shen, P., and Fillatreau, S. (2014). From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 28, 77–83.
- Darrasse-Jèze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 1853–1862.
- Degauque, N., Ngono, A.E., Akl, A., Lepetit, M., Crochette, R., Giral, M., Lepourry, J., Pallier, A., Castagnet, S., Dugast, E., et al. (2013). Characterization of Antigen-Specific B Cells Using Nominal Antigen-Coated Flow-Beads. *Plos One* 8, e84273.
- Delikouras, A., Fairbanks, L.D., Simmonds, A.H., Lechler, R.I., and Dorling, A. (2003). Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors. *Eur. J. Immunol.* 33, 3127–3135.
- Deng, S., Moore, D.J., Huang, X., Lian, M.-M., Mohiuddin, M., Velededeoglu, E., Lee, M.K., Sonawane, S., Kim, J., Wang, J., et al. (2007). Cutting Edge: Transplant Tolerance Induced by Anti-CD45RB Requires B Lymphocytes. *J. Immunol.* 178, 6028–6032.
- Denk, A., Wirth, T., and Baumann, B. (2000). NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 303–320.
- Dharnidharka, V.R., Stablein, D.M., and Harmon, W.E. (2004). Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 384–389.
- Dickneite, G., Schorlemmer, H.U., Walter, P., Thies, J., and Sedlacek, H.H. (1986). The influence of (+/-)-15-deoxyspergualin on experimental transplantation and its immunopharmacological mode of action. *Behring Inst. Mitt.* 93–102.
- DiLillo, D.J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K.M., Kelsoe, G., and Tedder, T.F. (2008). Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 361–371.
- DiLillo, D.J., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2010). B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 38–57.
- Ding, B.B., Bi, E., Chen, H., Yu, J.J., and Ye, B.H. (2013). IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J. Immunol.*
- 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.
- Ding, Y., Xu, D., Feng, G., Bushell, A., Muschel, R.J., and Wood, K.J. (2009). Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* *58*, 1797–1806.
- Dorshkind, K., and Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 213–219.
- Drappa, J., Vaishnav, A.K., Sullivan, K.E., Chu, J.L., and Elkon, K.B. (1996). Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1643–1649.
- Du, W., Wong, F.S., Li, M.O., Peng, J., Qi, H., Flavell, R.A., Sherwin, R., and Wen, L. (2006). TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells. *J. Clin. Invest.* *116*, 1360–1370.
- Ducoroy, P., de Fornel, D., Chirade, F., Fontet, P., and Dutartre, P. (2001). The immunosuppressant LF 15-0195 prevents collagen-induced arthritis with IL-10 down-regulation. *Transplant. Proc.* *33*, 2142–2145.
- Ducoroy, P., Micheau, O., Perruche, S., Dubrez-Daloz, L., de Fornel, D., Dutartre, P., Saas, P., and Solary, E. (2003). LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood* *101*, 194–201.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6092–6099.
- Duplan, V., Berioux, G., Heslan, J.-M., Bruand, C., Dutartre, P., Mars, L.T., Liblau, R.S., Cuturi, M.-C., and Saoudi, A. (2006). LF 15-0195 treatment protects against central nervous system autoimmunity by favoring the development of Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 839–847.
- Ellis, D., Shapiro, R., Moritz, M., Vats, A., Basu, A., Tan, H., Kayler, L., Janosky, J., and Starzl, T.E. (2007). Renal transplantation in children managed with lymphocyte depleting agents and low-dose maintenance tacrolimus monotherapy. *Transplantation* *83*, 1563–1570.
- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2009). Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *156*, 149–160.
- Essery, G., Feldmann, M., and Lamb, J.R. (1988). Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* *64*, 413–417.
- 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.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 5149–5153.
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002a). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002b). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.
- Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C.A., Andreesen, R., and Mackensen, A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* *105*, 2828–2835.
- Fleming, B.D., and Mosser, D.M. (2011). Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2498–2502.
- 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.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* *22*, 329–341.
- Ford, M.S., Chen, W., Wong, S., Li, C., Vanama, R., Elford, A.R., Asa, S.L., Ohashi, P.S., and Zhang, L. (2007). Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur. J. Immunol.* *37*, 2234–2241.
- Ford McIntyre, M.S., Young, K.J., Gao, J., Joe, B., and Zhang, L. (2008). Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2271–2275.
- Förster, I., Hirose, R., Arbeit, J.M., Clausen, B.E., and Hanahan, D. (1995). Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* *2*, 573–585.
- Frey, A.B., and Rao, T.D. (1999). NKT cell cytokine imbalance in murine diabetes mellitus. *Autoimmunity* *29*, 201–214.
- Fritz, J.H., Rojas, O.L., Simard, N., McCarthy, D.D., Hapfelmeier, S., Rubino, S., Robertson, S.J., Larijani, M., Gosselin, J., Ivanov, I.I., et al. (2012). Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* *481*, 199–203.
- Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D.J., Tegzová, D., Sanchez-Guerrero, J., Schwarting, A., Merrill, J.T., Chatham, W.W., et al. (2011). A phase III, randomized,

placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 63, 3918–3930.

Garcia, M.R., Ledgerwood, L., Yang, Y., Xu, J., Lal, G., Burrell, B., Ma, G., Hashimoto, D., Li, Y., Boros, P., et al. (2010). Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2486–2496.

Ge, W., Jiang, J., Baroja, M.L., Arp, J., Zassoko, R., Liu, W., Bartholomew, A., Garcia, B., and Wang, H. (2009). Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 1760–1772.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903–914.

Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Liebhaver, S.A. (1972). Suppressor T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 108, 586–590.

Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33–45.

Goldstein, D.R. (2006). Toll like receptors and acute allograft rejection. *Transpl. Immunol.* 17, 11–15.

Goodnow, C.C., Adelstein, S., and Basten, A. (1990). The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 248, 1373–1379.

Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Lorschach, R.B., Abbas, A.K., and Sharpe, A.H. (2001). CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, 145–155.

Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 184, 19–29.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007a). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117, 1096–1106.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007b). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117, 1096–1106.

Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive

immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18.

Haas, K.M., Watanabe, R., Matsushita, T., Nakashima, H., Ishiura, N., Okochi, H., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2010). Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4789–4800.

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., Ebel, V., Sontheimer, K., Schwesinger, E., Lunov, O., Beyer, T., Fabricius, D., Barth, T.F.E., 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., Belz, G.T., Kallies, A., Sutton, V.R., Thia, K.Y., Tarlinton, D.M., Hawkins, E.D., and Trapani, J.A. (2012a). Activated Mouse B Cells Lack Expression of Granzyme B. *J. Immunol.* 188, 3886–3892.

Hagn, M., Sontheimer, K., Dahlke, K., Brueggemann, S., Kaltenmeier, C., Beyer, T., Hofmann, S., Lunov, O., Barth, T.F., Fabricius, D., et al. (2012b). Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol. Cell Biol.* 90, 457–467.

Hagopian, W., Ferry, R.J., Sherry, N., Carlin, D., Bonvini, E., Johnson, S., Stein, K.E., Koenig, S., Daifotis, A.G., Herold, K.C., et al. (2013). Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: two-year results from the randomized, placebo-controlled Protégé trial. *Diabetes* 62, 3901–3908.

Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H.R., and Tschopp, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur. J. Immunol.* 26, 721–724.

Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* 351, 2715–2729.

Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 595–621.

Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., Relland, L.M., et al. (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35, 109–122.

Haririan, A., Kiangkitiwan, B., Kukuruga, D., Cooper, M., Hurley, H., Drachenberg, C., and Klassen, D. (2009). The impact of c4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2758–2767.

Hartung, H.-P., and Kieseier, B.C. (2010). Atacicept: targeting B cells in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 3, 205–216.

- Haspot, F., Séveno, C., Dugast, A.-S., Coulon, F., Renaudin, K., Usal, C., Hill, M., Anegon, I., Heslan, M., Josien, R., et al. (2005). Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2339–2348.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 676–688.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., and Herzenberg, L.A. (1983). The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157, 202–218.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S.A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C.L., Silver, J., and Hardy, R.R. (1999). Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285, 113–116.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001). Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 6012–6018.
- He, X., Smeets, R.L., Koenen, H.J.P.M., Vink, P.M., Wagenaars, J., Boots, A.M.H., and Joosten, I. (2011). Mycophenolic acid-mediated suppression of human CD4+ T cells: more than mere guanine nucleotide deprivation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 439–449.
- Heeger, P.S., Greenspan, N.S., Kuhlenschmidt, S., DeJelo, C., Hricik, D.E., Schulak, J.A., and Tary-Lehmann, M. (1999). Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2267–2275.
- Heidt, S., Hester, J., Shankar, S., Friend, P.J., and Wood, K.J. (2012). B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 1784–1792.
- Herold, K.C., Gitelman, S.E., Ehlers, M.R., Gottlieb, P.A., Greenbaum, C.J., Hagopian, W., Boyle, K.D., Keyes-Elstein, L., Aggarwal, S., Phippard, D., et al. (2013). Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes* 62, 3766–3774.
- Herzenberg, L.A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol. Rev.* 175, 9–22.
- Heslan, J.M., Renaudin, K., Thebault, P., Josien, R., Cuturi, M.-C., and Chiffolleau, E. (2006a). New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82, 1185–1193.
- Heslan, J.M., Renaudin, K., Thebault, P., Josien, R., Cuturi, M.-C., and Chiffolleau, E. (2006b). New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance.

Transplantation 82, 1185–1193.

Hill, M., Zagani, R., Voisine, C., Usal, C., and Anegon, I. (2007). Nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase mediate CTLA4Ig-induced survival in heart allografts in rats. *Transplantation* 84, 1060–1063.

Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Bériou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffolleau, E., and Cuturi, M.-C. (2011). Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 2036–2045.

Himmel, M.E., MacDonald, K.G., Garcia, R.V., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2013). Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 2001–2008.

Hippen, B.E., DeMattos, A., Cook, W.J., Kew, C.E., 2nd, and Gaston, R.S. (2005). Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2248–2252.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.

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.

Hussain, S., and Delovitch, T.L. (2007). Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 7225–7232.

Hutchinson, J.A., Riquelme, P., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Miqueu, P., Zuhayra, M., Oberg, H.H., Pascher, A., Lützen, U., Janssen, U., et al. (2011). Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2072–2078.

Illigens, B.M., Yamada, A., Anosova, N., Dong, V.M., Sayegh, M.H., and Benichou, G. (2009). Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants. *Eur. J. Immunol.* 39, 3000–3009.

Islam, M., Burke, J.F., McGowan, T.A., Zhu, Y., Dunn, S.R., McCue, P., Kanalas, J., and Sharma, K. (2001). Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 59, 498–506.

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.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389–392.

Jahrsdörfer, 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.

Janeway, C.A., Jr (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13, 11–16.

Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165, 302–319.

Jindra, P.T., Zhang, X., Mulder, A., Claas, F., Veale, J., Jin, Y.-P., and Reed, E.F. (2006). Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation* 82, S33–35.

Kabelitz, D., Pohl, T., and Pechhold, K. (1993). Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol. Today* 14, 338–339.

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

Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., et al. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* 26, 555–566.

Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670–673.

Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 905–913.

Katz, S.I., Parker, D., and Turk, J.L. (1974). B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251, 550–551.

Kehry, M.R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 2345–2348.

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.

Kelsoe, G. (1996). Life and Death in Germinal Centers (Redux). *Immunity* 4, 107–111.
Kendall, P.L., Yu, G., Woodward, E.J., and Thomas, J.W. (2007). Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 5643–5651.

- Keymeulen, B., Walter, M., Mathieu, C., Kaufman, L., Gorus, F., Hilbrands, R., Vandemeulebroucke, E., Van de Velde, U., Crenier, L., De Block, C., et al. (2010). Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia* 53, 614–623.
- Khoder, A., Sarvaria, A., Alsuliman, A., Chew, C., Sekine, T., Cooper, N., Mielke, S., de Lavallade, H., Muftuoglu, M., Fernandez Curbelo, I., et al. (2014). Regulatory B-Cells Are Enriched Within the IgM Memory and Transitional Subsets in Healthy Donors but Deficient In Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Blood*.
- Kitchens, W.H., Haridas, D., Wagener, M.E., Song, M., and Ford, M.L. (2012). Combined costimulatory and leukocyte functional antigen-1 blockade prevents transplant rejection mediated by heterologous immune memory alloresponses. *Transplantation* 93, 997–1005.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7, 773–782.
- Klinker, M.W., and Lundy, S.K. (2012). Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 123–137.
- Koch, C.A., Khalpey, Z.I., and Platt, J.L. (2004). Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 5143–5148.
- Kojima, Y., Tsurumi, H., Goto, N., Shimizu, M., Kasahara, S., Yamada, T., Kanemura, N., Hara, T., Sawada, M., Saio, M., et al. (2006). Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur. J. Haematol.* 76, 465–472.
- Komesli, S., Dumas, C., and Dutartre, P. (1999). Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues. *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 349–358.
- Krupnick, A.S., Kreisel, D., Popma, S.H., Balsara, K.R., Szeto, W.Y., Krasinskas, A.M., Riha, M., Wells, A.D., Turka, L.A., and Rosengard, B.R. (2002). Mechanism of T cell-mediated endothelial apoptosis. *Transplantation* 74, 871–876.
- Lange, K., and Gold, M.M.A. (1949). Autoantibodies in human glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 28, 50–55.
- Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., et al. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 443–453.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.

- Lebreton, L., Jost, E., Carboni, B., Annat, J., Vaultier, M., Dutartre, P., and Renaut, P. (1999). Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 2. Structural modifications of the spermidine moiety. *J. Med. Chem.* *42*, 4749–4763.
- Lechler, R.I., and Batchelor, J.R. (1982). Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J. Exp. Med.* *155*, 31–41.
- Lee, K.M., Kim, J.I., Stott, R., Soohoo, J., O'Connor, M.R., Yeh, H., Zhao, G., Eliades, P., Fox, C., Cheng, N., et al. (2012). Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2072–2078.
- Lee, K.M., Stott, R.T., Zhao, G., SooHoo, J., Xiong, W., Lian, M.M., Fitzgerald, L., Shi, S., Akrawi, E., Lei, J., et al. (2014). TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1728–1736.
- Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., and Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J. Autoimmun.* *36*, 228–238.
- Lenert, P., Brummel, R., Field, E.H., and Ashman, R.F. (2005). TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J. Clin. Immunol.* *25*, 29–40.
- Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzig, G., Herzig, R., et al. (2012). Chimerism and Tolerance Without GVHD or Engraftment Syndrome in HLA-Mismatched Combined Kidney and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Sci. Transl. Med.* *4*, 124ra28–124ra28.
- Li, F., Atz, M.E., and Reed, E.F. (2009). Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 557–562.
- Li, X.C., Wells, A.D., Strom, T.B., and Turka, L.A. (2000). The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 522–527.
- Lin, H., Bolling, S.F., Linsley, P.S., Wei, R.Q., Gordon, D., Thompson, C.B., and Turka, L.A. (1993). Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J. Exp. Med.* *178*, 1801–1806.
- Lin, L., Gerth, A.J., and Peng, S.L. (2004). Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *J. Exp. Med.* *200*, 115–122.
- Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-Induced Granzyme B-Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Res.* *73*, 2468–2479.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* *17*, 975–982.

- Lipsky, P.E. (2001). Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* *2*, 764–766.
- Liu, C., Noorchashm, H., Sutter, J.A., Naji, M., Prak, E.L., Boyer, J., Green, T., Rickels, M.R., Tomaszewski, J.E., Koeberlein, B., et al. (2007). B lymphocyte-directed immunotherapy promotes long-term islet allograft survival in nonhuman primates. *Nat. Med.* *13*, 1295–1298.
- Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (1998). Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int. Immunol.* *10*, 775–783.
- Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard, N., Moreau, A., Soullou, J.-P., and Brouard, S. (2006). Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* *81*, 398–407.
- Lundy, S.K. (2009). Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* *58*, 345–357.
- Lundy, S.K., and Fox, D.A. (2009). Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5+ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R128.
- Lutz, M.B., Suri, R.M., Niimi, M., Ogilvie, A.L., Kukutsch, N.A., Rössner, S., Schuler, G., and Austyn, J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1813–1822.
- Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F., and Radbruch, A. (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 367–386.
- Mariani, S.M., and Krammer, P.H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* *28*, 973–982.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 823–835.
- Martin, F., and Chan, A.C. (2006). B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 467–496.
- Martínez, M.R., Corradin, A., Klein, U., Álvarez, M.J., Toffolo, G.M., Camillo, B. di, Califano, A., and Stolovitzky, G.A. (2012). Quantitative modeling of the terminal differentiation of B cells and mechanisms of lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 2672–2677.
- Matas, A.J., Gillingham, K.J., Payne, W.D., and Najarian, J.S. (1994). The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* *57*, 857–859.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* *118*, 3420–3430.

- 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. Baltim. Md 1950* *185*, 2240–2252.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003a). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* *197*, 489–501.
- Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N., and Londei, M. (2003b). Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* *197*, 489–501.
- McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 487–513.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., and McHeyzer-Williams, L. (2012). Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 24–34.
- Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* *205*, 2887–2898.
- Menges, M., Rössner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* *195*, 15–21.
- Ménoret, S., Iscache, A.-L., Tesson, L., Rémy, S., Usal, C., Osborn, M.J., Cost, G.J., Brüggemann, M., Buelow, R., and Anegón, I. (2010). Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2932–2941.
- Millan, M.T., Shizuru, J.A., Hoffmann, P., Dejbakhsh-Jones, S., Scandling, J.D., Grumet, F.C., Tan, J.C., Salvatierra, O., Hoppe, R.T., and Strober, S. (2002). Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* *73*, 1386–1391.
- Min, W.-P., Zhou, D., Ichim, T.E., Strejan, G.H., Xia, X., Yang, J., Huang, X., Garcia, B., White, D., Dutartre, P., et al. (2003). Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 1304–1312.
- 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.
- Mittrücker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kündig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S., and Mak, T.W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* *275*, 540–543.

- Miyashita, T., McIlraith, M.J., Grammer, A.C., Miura, Y., Attrep, J.F., Shimaoka, Y., and Lipsky, P.E. (1997). Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 4620–4633.
- 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. (2002a). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* *16*, 219–230.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002b). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* *16*, 219–230.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F.I., and Bhan, A.K. (2000). Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* *12*, 597–605.
- Montandon, R., Korniotis, S., Layseca-Espinosa, E., Gras, C., Mégret, 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.* *110*, E2199–E2208.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* *7*, 293–301.
- Morris, A., and Möller, G. (1968). Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *101*, 439–445.
- Nadazdin, O., Boskovic, S., Murakami, T., Tocco, G., Smith, R.-N., Colvin, R.B., Sachs, D.H., Allan, J., Madsen, J.C., Kawai, T., et al. (2011). Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* *3*, 86ra51.
- Nagata, S., and Suda, T. (1995). Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol. Today* *16*, 39–43.
- Nakashima, S., Qian, Z., Rahimi, S., Wasowska, B.A., and Baldwin, W.M., 3rd (2002). Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4620–4627.
- Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L.-S., O'Connell, P.J., Allen, R.D.M., and Chapman, J.R. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2326–2333.
- Nemoto, K., Hayashi, M., Abe, F., Nakamura, T., Ishizuka, M., and Umezawa, H. (1987). Immunosuppressive activities of 15-deoxyspergualin in animals. *J. Antibiot. (Tokyo)* *40*, 561–562.
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Köhl,

- 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.
- Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W.J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., et al. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 1836–1847.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.
- Niu, H., Ye, B.H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev.* 12, 1953–1961.
- O’Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., and Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22, 711–717.
- O’Neill, S.K., Liu, E., and Cambier, J.C. (2009). Change you can B(cell)eive in: recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 16, 293–298.
- Obata, F., Yoshida, K., Ohkubo, M., Ikeda, Y., Taoka, Y., Takeuchi, Y., Shinohara, N., Endo, T., and Baba, S. (2005). Contribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and interferon-γ to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl. Immunol.* 14, 21–25.
- Obayashi, K., Doi, T., and Koyasu, S. (2007). Dendritic cells suppress IgE production in B cells. *Int. Immunol.* 19, 217–226.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., et al. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7, 652–662.
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., et al. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929.
- Ohki, S., Iizuka, K., Ishikawa, S., Kano, M., Dobashi, K., Yoshii, A., Shimizu, Y., Mori, M., and Morishita, Y. (2001). A highly selective inhibitor of Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, Y-27632, prolongs cardiac allograft survival of the BALB/c-to-C3H/He mouse model. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 20, 956–963.
- 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.

- Ollila, J., and Vihinen, M. (2005). B cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 518–523.
- Ono, K., and Lindsey, E.S. (1969). Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57, 225–229.
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., and Tarlinton, D.M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237, 140–159.
- Page, E.K., Dar, W.A., and Knechtle, S.J. (2012). Tolerogenic therapies in transplantation. *Front. Immunol.* 3, 198.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J.J., et al. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 78, 503–513.
- Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., and Matsuta, K. (1985). Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316, 452–457.
- Parsons, R.F., Vivek, K., Rostami, S.Y., Zekavat, G., Ziaie, S.M., Luo, Y., Koeberlein, B., Redfield, R.R., Cancro, M.P., Naji, A., et al. (2011). Acquisition of humoral transplantation tolerance upon de novo emergence of B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 614–620.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S.K., and Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101, 2914–2923.
- Penaranda, C., Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2011). Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 2015–2022.
- Perry, D.K., Burns, J.M., Pollinger, H.S., Amiot, B.P., Gloor, J.M., Gores, G.J., and Stegall, M.D. (2009). Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 201–209.
- Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., McGee, P.F., Moran, A.M., et al. (2009). Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N. Engl. J. Med.* 361, 2143–2152.
- Piazza, A., Poggi, E., Borrelli, L., Servetti, S., Monaco, P.I., Buonomo, O., Valeri, M., Torlone, N., Adorno, D., and Casciani, C.U. (2001). Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 71, 1106–1112.
- Picarda, E., Bézie, S., Venturi, V., Echasserieau, K., Mérieau, E., Delhumeau, A., Renaudin,

- K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegon, I., et al. (2014). MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* *124*, 2497–2512.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 959–971.
- Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., and Strober, S. (2009). Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* *113*, 4458–4467.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 161–196.
- Poirier, N., Azimzadeh, A.M., Zhang, T., Dilek, N., Mary, C., Nguyen, B., Tillou, X., Wu, G., Reneaudin, K., Hervouet, J., et al. (2010). Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci. Transl. Med.* *2*, 17ra10.
- Poirier, N., Mary, C., Dilek, N., Hervouet, J., Minault, D., Blancho, G., and Vanhove, B. (2012). Preclinical Efficacy and Immunological Safety of FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*
- Pratschke, J., Weiss, S., Neuhaus, P., and Pascher, A. (2008). Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *21*, 512–522.
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., and Romagnani, S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *150*, 353–360.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 741–750.
- Rangaswamy, U.S., and Speck, S.H. (2014). Murine Gammaherpesvirus M2 Protein Induction of IRF4 via the NFAT Pathway Leads to IL-10 Expression in B Cells. *Plos Pathog* *10*, e1003858.
- Rathmell, J.C., Townsend, S.E., Xu, J.C., Flavell, R.A., and Goodnow, C.C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* *87*, 319–329.
- Rathmell, J.C., Fournier, S., Weintraub, B.C., Allison, J.P., and Goodnow, C.C. (1998). Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* *188*, 651–659.
- Rauch, P.J., Chudnovskiy, A., Robbins, C.S., Weber, G.F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., Tiglao, E., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Theurl, I., et al. (2012). Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* *335*, 597–601.

- 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.
- Ries, S., Hilgenberg, E., Lampropoulou, V., Shen, P., Dang, V.D., Wilantri, S., Sakwa, I., and Fillatreau, S. (2014). B-type suppression: A role played by “regulatory B cells” or “regulatory plasma cells”? *Eur. J. Immunol.* 44, 1251–1257.
- Rocha, P.N., Plumb, T.J., Crowley, S.D., and Coffman, T.M. (2003). Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol. Rev.* 196, 51–64.
- Rolle, L., Memarzadeh Tehran, M., Morell-García, A., Raeva, Y., Schumacher, A., Hartig, R., Costa, S.-D., Jensen, F., and Zenclussen, A.C. (2013). Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. New York N 1989* 70, 448–453.
- Roncarolo, M.-G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 585–598.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182, 68–79.
- Saadi, S., Holzknacht, R.A., Patte, C.P., Stern, D.M., and Platt, J.L. (1995). Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J. Exp. Med.* 182, 1807–1814.
- Sachs, D.H., Sykes, M., Kawai, T., and Cosimi, A.B. (2011). Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Semin. Immunol.* 23, 165–173.
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D.A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., et al. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 1848–1861.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12, 280–292.
- Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., et al. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11294–11299.
- Samuelsson, A., Sönnernborg, A., Heuts, N., Cöster, 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.
- Sánchez-Fructuoso, A., Naranjo Garcia, P., Calvo Romero, N., Ridao, N., Naranjo Gómez, P.,

- Conesa, J., and Barrientos, A. (2007). Effect of the brain-death process on acute rejection in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 39, 2214–2216.
- Sarraj, B., Ye, J., Akl, A.I., Chen, G., Wang, J.-J., Zhang, Z., Abadja, F., Abecassis, M., Miller, S.D., Kansas, G.S., et al. (2014). Impaired selectin-dependent leukocyte recruitment induces T-cell exhaustion and prevents chronic allograft vasculopathy and rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 12145–12150.
- Sato, S., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (1995). The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11558–11562.
- Sato, S., Ono, N., Steeber, D.A., Pisetsky, D.S., and Tedder, T.F. (1996). CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 4371–4378.
- Schimpl, A., Berberich, I., Kneitz, B., Krämer, S., Santner-Nanan, B., Wagner, S., Wolf, M., and Hünig, T. (2002). IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 369–378.
- Schneider, P., Takatsuka, H., Wilson, A., Mackay, F., Tardivel, A., Lens, S., Cachero, T.G., Finke, D., Beermann, F., and Tschopp, J. (2001). Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J. Exp. Med.* 194, 1691–1697.
- Schwartz, R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349–1356.
- Schwartz, R.H. (1996). Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* 184, 1–8.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225–236.
- Secchiero, P., Tiribelli, M., Barbarotto, E., Celeghini, C., Michelutti, A., Masolini, P., Fanin, R., and Zauli, G. (2005). Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 246–252.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62.
- Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Lamy, L., Ngo, V.N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., et al. (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 454, 226–231.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 230–242.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G.,

- and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607–620.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., Savitsky, D., Liao, J., and Calame, K. (2005). Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 202, 1471–1476.
- Shaw, P.X., Hörkkö, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., and Witztum, J.L. (2000). Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest.* 105, 1731–1740.
- 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*.
- Sherry, N., Hagopian, W., Ludvigsson, J., Jain, S.M., Wahlen, J., Ferry, R.J., Jr, Bode, B., Aronoff, S., Holland, C., Carlin, D., et al. (2011). Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 378, 487–497.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3, 135–142.
- Shlomchik, M.J. (2008). Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 28, 18–28.
- Siepert, A., Ahrlich, S., Vogt, K., Appelt, C., Stanko, K., Köhl, A., van den Brandt, J., Reichardt, H.M., Nizze, H., Lehmann, M., et al. (2012). Permanent CNI Treatment for Prevention of Renal Allograft Rejection in Sensitized Hosts Can Be Replaced by Regulatory T Cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 2384–2394.
- Silvestris, F., Tucci, M., Cafforio, P., and Dammacco, F. (2001). Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression. *Blood* 97, 1155–1164.
- Silvestris, F., Cafforio, P., Tucci, M., Grinello, D., and Dammacco, F. (2003). Upregulation of osteoblast apoptosis by malignant plasma cells: a role in myeloma bone disease. *Br. J. Haematol.* 122, 39–52.
- Singh, A.K., Stock, P., and Akbari, O. (2011). Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy* 66, 155–162.
- Sis, B., Jhangri, G.S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P.F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2312–2323.
- Skelton, T.S., Tejpal, N., Gong, Y., Kloc, M., and Ghobrial, R.M. (2010). Downregulation of

- RhoA and changes in T cell cytoskeleton correlate with the abrogation of allograft rejection. *Transpl. Immunol.* *23*, 185–193.
- Smith, S.H., and Tedder, T.F. (2009). Targeting B-cells mitigates autoimmune diabetes in NOD mice: what is plan B? *Diabetes* *58*, 1479–1481.
- Sonoda, K.-H., and Stein-Streilein, J. (2002). CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. J. Immunol.* *32*, 848–857.
- Soulillou, J.P., Blandin, F., Günther, E., and Lemoine, V. (1984). Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* *38*, 63–67.
- Srivastava, R.K. (2001). TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia New York N* *3*, 535–546.
- Srivastava, P.K., Udono, H., Blachere, N.E., and Li, Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* *39*, 93–98.
- Stegall, M.D., Diwan, T., Raghavaiah, S., Cornell, L.D., Burns, J., Dean, P.G., Cosio, F.G., Gandhi, M.J., Kremers, W., and Gloor, J.M. (2011). Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 2405–2413.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 685–711.
- Stolp, J., Turka, L.A., and Wood, K.J. (2014). B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.*
- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* *204*, 1775–1785.
- Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T.G., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1485–1493.
- Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C.G. (2002). The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *169*, 2461–2465.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* *192*, 303–310.
- Takeda, A., Horike, K., Ohtsuka, Y., Inaguma, D., Goto, N., Watarai, Y., Uchida, K., and Morozumi, K. (2011). Current problems of chronic active antibody-mediated rejection. *Clin. Transplant.* *25 Suppl* *23*, 2–5.
- Takenouchi, M., Sahara, H., Yamamoto, Y., Matsumoto, Y., Imai, A., Fujita, T., Tamura, Y.,

Takahashi, N., Gasa, S., Matsumoto, K., et al. (2005). Mechanism of the immunosuppressive effect in vivo of novel immunosuppressive drug beta-SQAG9, which inhibits the response of the CD62L+ T-cell subset. *Transplant. Proc.* *37*, 139–142.

Takeuchi, T., Inuma, H., Kunimoto, S., Masuda, T., Ishizuka, M., Takeuchi, M., Hamada, M., Naganawa, H., Kondo, S., and Umezawa, H. (1981). A new antitumor antibiotic, spargualin: isolation and antitumor activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* *34*, 1619–1621.

Tan, J., Wu, W., Xu, X., Liao, L., Zheng, F., Messinger, S., Sun, X., Chen, J., Yang, S., Cai, J., et al. (2012). Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *Jama J. Am. Med. Assoc.* *307*, 1169–1177.

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.

Taylor, R.P., and Lindorfer, M.A. (2007). Drug insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease--the immune complex decoy hypothesis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *3*, 86–95.

Tepper, M.A., Nadler, S.G., Esselstyn, J.M., and Sterbenz, K.G. (1995). Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70Z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation. *J. Immunol.* *155*, 2427–2436.

Terasaki, P.I., and Cai, J. (2008). Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* *86*, 377–383.

Terasaki, P.I., Cecka, J.M., Gjertson, D.W., and Takemoto, S. (1995). High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* *333*, 333–336.

Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Souillou, J.P., Cuturi, M.C., Brouard, S., et al. (2011). Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile. *Am. J. Transplant.* *11*, 429–438.

Le Texier, L., Durand, J., Lavault, A., Hulin, P., Collin, O., Le Bras, Y., Cuturi, M.-C., and Chiffolleau, E. (2014). LIMLE, a new molecule over-expressed following activation, is involved in the stimulatory properties of dendritic cells. *Plos One* *9*, e93894.

Thaunat, O., Field, A.-C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.-F., Mandet, C., Belair, M.-F., Bruneval, P., Meilhac, O., et al. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14723–14728.

Thaunat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M.-C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J.-B., et al. (2010a). Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intra-graft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *J. Immunol.* *185*, 717–728.

Thaunat, O., Morelon, E., and Defrance, T. (2010b). Am“B”valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood* *116*, 515–521.

- Thebault, P., Condamine, T., Heslan, M., Hill, M., Bernard, I., Saoudi, A., Josien, R., Aneon, I., Cuturi, M.C., and Chiffolleau, E. (2007a). Role of IFN γ in Allograft Tolerance Mediated by CD4+CD25+ Regulatory T Cells by Induction of IDO in Endothelial Cells. *Am. J. Transplant.* 7, 2472–2482.
- Thebault, P., Condamine, T., Heslan, M., Hill, M., Bernard, I., Saoudi, A., Josien, R., Aneon, I., Cuturi, M.C., and Chiffolleau, E. (2007b). Role of IFN γ in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 2472–2482.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 183–190.
- Thornton, A.M., Donovan, E.E., Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 6519–6523.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3433–3441.
- Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D.L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1081–1089.
- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., and Taams, L.S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19446–19451.
- Trapani, J.A., and Sutton, V.R. (2003). Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 533–543.
- Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., and Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193, 839–846.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1158–1165.
- Turner, C.A., Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297–306.
- Valujskikh, A., Pantenburg, B., and Heeger, P.S. (2002). Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2, 501–509.

- Van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 1204–1212.
- Vibhakar, R., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., and Finger, L.R. (1997). Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp. Cell Res.* *232*, 25–28.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592–605.
- Villunger, A., Egle, A., Marschitz, I., Kos, M., Böck, G., Ludwig, H., Geley, S., Kofler, R., and Greil, R. (1997). Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood* *90*, 12–20.
- Vitale, G., Mion, F., and Pucillo, C. (2010). Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol. Immunol.* *48*, 1–8.
- Vugmeyster, Y., Seshasayee, D., Chang, W., Storn, A., Howell, K., Sa, S., Nelson, T., Martin, F., Grewal, I., Gilkerson, E., et al. (2006). A soluble BAFF antagonist, BR3-Fc, decreases peripheral blood B cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular B cells in cynomolgus monkeys. *Am. J. Pathol.* *168*, 476–489.
- Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 11–19.
- Walsh, R.C., Alloway, R.R., Girnita, A.L., and Woodle, E.S. (2012). Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* *81*, 1067–1074.
- Wang, B., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). The immunosuppressant 15-deoxyspergualin [correction of 1,5-deoxyspergualin] reveals commonality between preT and preB cell differentiation. *J. Exp. Med.* *183*, 2427–2436.
- Wang, H., Hosiawa, K.A., Garcia, B., Shum, J.B., Dutartre, P., Kelvin, D.J., and Zhong, R. (2003). Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15-0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model. *Transplantation* *75*, 1475–1481.
- Wang, J., Balog, C.I.A., Stavenhagen, K., Koeleman, C.A.M., Scherer, H.U., Selman, M.H.J., Deelder, A.M., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., and Wuhrer, M. (2011). Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cell stimuli. *Mol. Cell. Proteomics* *10*, M110.004655.
- 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.
- Watanabe, R., Fujimoto, M., Ishiura, N., Kuwano, Y., Nakashima, H., Yazawa, N., Okochi,

- H., Sato, S., Tedder, T.F., and Tamaki, K. (2007a). CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* *171*, 560–570.
- Watanabe, R., Fujimoto, M., Ishiura, N., Kuwano, Y., Nakashima, H., Yazawa, N., Okochi, H., Sato, S., Tedder, T.F., and Tamaki, K. (2007b). CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* *171*, 560–570.
- Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., and Fujimoto, M. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 4801–4809.
- Weiner, H.L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* *182*, 207–214.
- Wilhelm, M.J., Pratschke, J., Beato, F., Taal, M., Laskowski, I.A., Paz, D.M., Schmid, C., Hancock, W.W., Scheld, H.H., and Tilney, N.L. (2002). Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors: evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant. Proc.* *34*, 2359–2360.
- Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 2271–2278.
- Wong, S.-C., Puaux, A.-L., Chittezhath, M., Shalova, I., Kajiji, T.S., Wang, X., Abastado, J.-P., Lam, K.-P., and Biswas, S.K. (2010). Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2296–2307.
- Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 417–430.
- Wortis, H.H., Teutsch, M., Higer, M., Zheng, J., and Parker, D.C. (1995). B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 3348–3352.
- Wu, C.J., Lovett, M., Wong-Lee, J., Moeller, F., Kitamura, M., Goralski, T.J., Billingham, M.E., Starnes, V.A., and Clayberger, C. (1992). Cytokine gene expression in rejecting cardiac allografts. *Transplantation* *54*, 326–332.
- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B., and Kuchroo, V.K. (2008). Retinoic acid increases Foxp3⁺ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2277–2284.
- Xiu, Y., Wong, C.P., Bouaziz, J.-D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S.M., Tisch, R.M., and Tedder, T.F. (2008a). B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2863–2875.
- Xiu, Y., Wong, C.P., Bouaziz, J.-D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S.M., Tisch, R.M., and

- Tedder, T.F. (2008b). B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2863–2875.
- Xu, L., Kitani, A., Fuss, I., and Strober, W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6725–6729.
- Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* *104*, 3294–3301.
- Yamakuchi, M., Kirkiles-Smith, N.C., Ferlito, M., Cameron, S.J., Bao, C., Fox-Talbot, K., Wasowska, B.A., Baldwin, W.M., 3rd, Pober, J.S., and Lowenstein, C.J. (2007). Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1301–1306.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 235–247.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., et al. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 5538–5545.
- Yan, Y., van der Putten, K., Bowen, D.G., Painter, D.M., Kohar, J., Sharland, A.F., McCaughan, G.W., and Bishop, G.A. (2002). Postoperative administration of donor B cells induces rat kidney allograft acceptance: lack of association with Th2 cytokine expression in long-term accepted grafts. *Transplantation* *73*, 1123–1130.
- Yanaba, K., Hamaguchi, Y., Venturi, G.M., Steeber, D.A., St Clair, E.W., and Tedder, T.F. (2007a). B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 1369–1380.
- Yanaba, K., Hamaguchi, Y., Venturi, G.M., Steeber, D.A., St Clair, E.W., and Tedder, T.F. (2007b). B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 1369–1380.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008a). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* *28*, 639–650.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Magro, C.M., St Clair, E.W., and Tedder, T.F. (2008b). B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol. Rev.* *223*, 284–299.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T.F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen

- receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7459–7472.
- Yang, H., Issekutz, T.B., and Wright, J.R., Jr (1995). Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation* *60*, 71–76.
- Yang, H., Chen, G., Kanai, N., Shum, J., Garcia, B., Huang, X., Min, W., Luo, Y., Dutartre, P., and Zhong, R. (2003a). Monotherapy with LF 15-0195, an analogue of 15-deoxyspergualin, significantly prolongs renal allograft survival in monkeys. *Transplantation* *75*, 1166–1171.
- Yang, J., Bernier, S.M., Ichim, T.E., Li, M., Xia, X., Zhou, D., Huang, X., Strejan, G.H., White, D.J., Zhong, R., et al. (2003b). LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 438–447.
- Yang, M., Sun, L., Wang, S., Ko, K.-H., Xu, H., Zheng, B.-J., Cao, X., and Lu, L. (2010). Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10–Producing Regulatory B Cells. *J. Immunol.* *184*, 3321–3325.
- Yarkoni, Y., Getahun, A., and Cambier, J.C. (2010). Molecular underpinning of B-cell anergy. *Immunol. Rev.* *237*, 249–263.
- You, S., Leforban, B., Garcia, C., Bach, J.-F., Bluestone, J.A., and Chatenoud, L. (2007). Adaptive TGF- β -dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 6335–6340.
- You, S., Zuber, J., Kuhn, C., Baas, M., Valette, F., Sauvaget, V., Sarnacki, S., Sawitzki, B., Bach, J.-F., Volk, H.-D., et al. (2012). Induction of allograft tolerance by monoclonal CD3 antibodies: a matter of timing. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 2909–2919.
- You, Y., Myers, R.C., Freeberg, L., Foote, J., Kearney, J.F., Justement, L.B., and Carter, R.H. (2011). Marginal zone B cells regulate antigen capture by marginal zone macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2172–2181.
- Young, K.J., DuTemple, B., Phillips, M.J., and Zhang, L. (2003). Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 134–141.
- Zhai, Y., Meng, L., Gao, F., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4667–4673.
- Zhang, X., and Reed, E.F. (2009). Effect of antibodies on endothelium. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 2459–2465.
- Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., and Zhang, L. (2000). Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat.*

Med. 6, 782–789.

Zhao, P., Wang, J., He, L., Ma, H., Zhang, X., Zhu, X., Dolence, E.K., Ren, J., and Li, J. (2009). Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1513–1525.

Zheng, J., Liu, Y., Qin, G., Chan, P.-L., Mao, H., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2009). Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 3742–3750.

Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2010). CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 44–50.

Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C., and Rothstein, T.L. (2007). PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur. J. Immunol.* 37, 2405–2410.

Zhou, D., O'Brien, C., Shum, J., Garcia, B., Min, W., Jevnikar, A.M., Dutartre, P., and Zhong, R. (2003). LF 15-0195, a novel immunosuppressive agent prevents rejection and induces operational tolerance in a mouse cardiac allograft model. *Transplantation* 76, 644–650.

ANNEXES

A. Annexe 1 : LIMLE, a new molecule over-expressed following activation, is involved in the stimulatory properties of dendritic cells

Le Texier L, Durand J, Lavault A, Hulin P, Collin O, Le Bras Y, Cuturi MC, Chiffolleau E.
PLoS One. 2014 Apr 4;9(4):e93894.



LIMLE, a New Molecule Over-Expressed following Activation, Is Involved in the Stimulatory Properties of Dendritic Cells

Laëticia Le Texier^{1,2,3,9}, Justine Durand^{1,2,3,9}, Amélie Lavault^{1,2,3}, Philippe Hulin⁴, Olivier Collin⁵, Yvan Le Bras⁵, Maria-Cristina Cuturi^{1,2,3}, Elise Chiffolleau^{1,2,3*}

1 INSERM, U1064, Nantes, France, **2** CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes, France, **3** Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France, **4** Plateforme MicroPICell, SFR santé, Nantes, France, **5** Plateforme GenOuest, IRISA-INRIA, Campus de Beaulieu, Rennes, France

Abstract

Dendritic cells are sentinels of the immune system distributed **throughout the body**, that following danger signals will migrate to secondary lymphoid organs to induce effector T cell responses. We have identified, in a rodent model of graft rejection, a new molecule expressed by dendritic cells that we have named LIMLE (RGD1310371). To characterize this new molecule, we analyzed its regulation of expression and its function. We observed that LIMLE mRNAs were rapidly and strongly up regulated in dendritic cells following inflammatory stimulation. We demonstrated that LIMLE inhibition does not alter dendritic cell maturation or cytokine production following Toll-like-receptor stimulation. However, it reduces their ability to stimulate effector T cells in a mixed leukocyte reaction or T cell receptor transgenic system. Interestingly, we observed that LIMLE protein localized with actin at some areas under the plasma membrane. Moreover, LIMLE is highly expressed in testis, trachea, lung and ciliated cells and it has been shown that cilia formation bears similarities to formation of the immunological synapse which is required for the T cell activation by dendritic cells. Taken together, these data suggest a role for LIMLE in specialized structures of the cytoskeleton that are important for dynamic cellular events such as immune synapse formation. In the future, LIMLE may represent a new target to reduce the capacity of dendritic cells to stimulate T cells and to regulate an immune response.

Citation: Le Texier L, Durand J, Lavault A, Hulin P, Collin O, et al. (2014) LIMLE, a New Molecule Over-Expressed following Activation, Is Involved in the Stimulatory Properties of Dendritic Cells. PLoS ONE 9(4): e93894. doi:10.1371/journal.pone.0093894

Editor: Silke Appel, University of Bergen, Norway

Received: September 1, 2013; **Accepted:** March 10, 2014; **Published:** April 4, 2014

Copyright: © 2014 Le Texier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by Fondation Progreffe and Fondation Centaure. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: elise.chiffolleau@univ-nantes.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are central actors of the immune response. Localized at the interface with the external environment, DCs are sensors of pathogen penetration into the organism and are involved in both innate and adaptive immune responses. DCs detect microorganism components via pattern recognition receptors (PRRs), which transduce danger signals and induce their activation and maturation [1]. Moreover, DCs are professional antigen-presenting cells (APCs), able to capture and process antigen to present antigenic peptide on MHC Class I and Class II to activate CD8⁺ and CD4⁺ T cells respectively [2]. The fine-tuning of the maturation state of DCs is important to maintain the balance between immunity and tolerance. Under steady-state conditions, DCs remain in an immature state and do not mount an immune response against circulating self-antigens in the periphery, which maintains a state of tolerance. By contrast, foreign antigens result in maturation of DCs that will then migrate and activate T cells. This balance is required as any disturbance due to infection or tissue injury may result in chronic inflammation or autoimmunity.

Maturation of DCs is accompanied by numerous phenotypic and morphologic changes that are correlated with a reorganization of microfilaments and microtubules and an altered expression of specialized actin- and tubulin-associated proteins. Indeed, reorganization of the cytoskeleton is needed to allow dissolution of adhesion structures such as podosomes and acquisition of migratory ability [3]. Shape remodeling of DCs is also important in allowing acquisition of an elongated shape, as well as extension and retraction of long dendrites to form dynamic clusters with CD4⁺ T cells for efficient immune synapse formation and T cell activation [2,4,5,6].

Comprehension of the mechanisms involved in DC maturation represents a crucial aim of research, to be able to develop new strategies to manipulate the immune response. Immune properties of DCs arouse interest due to their involvement in various pathologies such as infectious diseases, cancer, autoimmunity and graft rejection. As part of a study to identify genes associated with allograft rejection or tolerance in transplantation, we identified a new molecule that we named "LIMLE" for "LPS-Induced MoLecule" and that we found to be over-expressed in the graft and blood of rats developing chronic rejection. In this study, we

attempted to characterize the immune regulation and the function of this new molecule.

Materials and Methods

Ethics statement

The prefecture of the Loire-Atlantique and the Agriculture and Fishing Ministry has reviewed and approved the current study for animal experimentations (No. 4491). All efforts were made to minimize animal suffering during the experiments. Human blood of healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France), which has informed the donors prior the use of their blood. All donors have signed an informed consent. Further approval by the ethical committee was not necessary. A signed convention was established between our institution (INSERM) and the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France) to have access to the blood from healthy donors for research purpose.

Animals and transplantation

MHC fully mismatched LEW.1A (RT1a) and LEW.1W (RT1u) rats and C57Bl/6 mice were purchased from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Transgenic mice S/SOPF B6.OT-I were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Rodents were maintained in an animal facility under standard conditions according to our institutional guidelines. Heterotopic syngenic LEW.1A to LEW.1A or allogeneic LEW.1W to LEW.1A heart transplantations were performed using the Ono and Lindsey technique [7]. Allografts in untreated recipients were acutely rejected within 7 days. Allograft tolerance was induced, as previously described, by a short-term treatment (20 days, 3 mg/kg/day) with an immune-suppressor, LF15-0195 (Fournier Laboratories), a deoxyspergualine analog [8]. Chronic allograft rejection was induced by two donor blood transfusions (DST) before transplantation as previously described [9]. Graft function was assessed by scoring pulsations through the abdominal wall and acute or chronic rejection was confirmed by heart beat cessation or the presence of vascular lesions (histology) respectively. The graft and blood were harvested at day 5 or 100 after transplantation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted from whole blood using Ficoll (GE Healthcare).

Cell purification, culture, and activation

-Rat splenic DCs, total T cells, CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells or B cells from naive rats were purified by positive selection on a FACSAria flow cytometer using Sirp α -FITC (OX62) and MHC Class II-APC/Cy7 (Ox6); TCR-Alexa Fluor 647 (R7/3); CD4-PE/Cy7 (W3/25) and CD25-PE (Ox39) or CD45RA-FITC (OX33) staining respectively. DCs, T cells and B cells were cultured in complete RPMI (RPMI plus 10% endotoxin-free Fetal Bovine Serum (Perbio Science), 2 mM l-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM HEPES, 5 \times 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol and penicillin-streptomycin (100 U/ml; 100 μ g/ml respectively) (all from Sigma-Aldrich) and stimulated for 12 hours with lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) and anti-CD28 (1 μ g/ml) antibodies (BD Biosciences) or CpG 2006 (5 μ M) (InvivoGen) respectively.

-Rat alveolar macrophage lineage NR8383 [10] cells were cultured in Ham's F12 complete medium and stimulated for 6 hours with rat IFN- γ (50 U/ml) (Serotec).

-Rat endothelial cell (EC) line of LEW.1W origin was isolated as previously described [11], plated into 12-well plates (Nunc; Merck/Eurolab France) (1 million cells/well) in complete RPMI

medium for 24 hours and then stimulated for 6 hours with rat IFN- γ (50 U/ml) (Serotec).

-Rat bone marrow derived DCs (BMDCs) were obtained as previously described [12]. Bone marrow cells were cultured for 10 days in complete RPMI medium supplemented with 0.4 ng/ml of rat IL-4 + transfected COS- conditioned medium, and 1.5 ng/mL of murine granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor (CSF)-transfected COS-conditioned medium (at 1 million cells/ml) in 6 ml in 6 well-plates (Nunc). The plasmids containing the rat IL-4 and murine GM-CSF (pCDSR GMCSF) cDNA sequences were from our laboratory [13] and DNAX (Palo Alto, CA) respectively. After 8 days of culture, cells were recovered and plated without growth factors. After 48 hours of subculture two major cell populations were obtained: adherent and non-adherent cells. We demonstrated that the non-adherent populations, which are the 'classical' DCs, were able to stimulate naive allogeneic T cells and could be induced to completely mature using various stimuli [12,14]. Therefore, for our experiments, rat non-adherent BMDCs were collected on day 8, plated (2 million cells/ml) in 6 ml in 6 well-plates and stimulated with LPS (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), recombinant rat IFN- γ (50 U/ml) (Serotec), CpG 2006 (5 μ M) (InvivoGen), poly (I:C) (25 μ g/ml) (InvivoGen) or recombinant rat IL-10 (20 ng/ml) (R&D Systems) for 6, 12, 24 and 48 hours.

-Human DCs were generated as previously described [15]. Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14⁺) and cultured for 6 days in RPMI complete medium supplemented with human GM-CSF (200 IU/ml) (CellGenix) and IL-4 (1000 IU/ml) (CellGenix). DCs were then harvested and stimulated at 1 million cells/ml for 24 hour with LPS (1 μ g/ml). All cells were cultured at 37°C and 5% CO₂, recovered and subjected to RNA extraction.

-For mouse BMDC generation, only murine GM-CSF (0.15 ng/ml) was added to complete RPMI medium during culture of bone marrow cells (at 1 million cells/ml) in 6 ml in 6 well-plates (Nunc).

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA from organs, tissues or cells was prepared using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative RT-PCR was performed as previously described [16] by using a step one plus instrument (Applied Biosystems) and SYBR Green PCR Master mix reagent (Applied Biosystems). Oligonucleotides used in this study were for rat (r), mouse (m) and human (h): rHypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) (For-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC, Rev-TTCGCTGATGACACAAACATGA), rLIMLE (For-GTGTGACTGCTGTGCCGA, Rev-CCAGACA-GAAGTCCTGCCC), mGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (For-CTACAGCAACAGGGTGGTGG, Rev-TATGGGGGTCTGGGATGG), mLIMLE (For-GCCCAGAT-GAAGTTAAAGCG, Rev-GCCCATAGACAACCACCTTGG), hHPRT (For-CGAGATGTGATGAAGGAGATGG, Rev-CCTGTTGACTGGTCATTACAATAGC), hLIMLE (For-GCAGTTCAAGCCAAGACCC, Rev-AAATCCTCCTGT-TATCCCCAG). HPRT (for rat and human) and GAPDH (for mice) were used as endogenous control genes to normalize for variations in the starting amount of RNA. Relative expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} method [16,17].

Bioinformatics analysis

Rat, mouse and human LIMLE amino-acid (AA) sequences were analyzed with NCBI blast (National Center for Biotechnology Information database). To study cellular localization, the rat

LIMLE AA sequence was analyzed using the AA sequence-based predictors PSORTII [18], TargetP1.1 [19] and NetNES [20]. The probability of LIMLE to be associated with the membrane was checked by the presence of alpha-helix with TMHMM 2.0 [21] and NMT tools [22]. The presence of specific signals or links with known family proteins according to the predictive secondary structure or predictive 3D structure, were analyzed by InterProScan portal [23], Gene3D [24], "Protein Homology/analogy Recognition Engine" (PHYRE) [21][25,26] and the "Iterative Threading ASSEMBLY Refinement" (I-TASSER) [27,28] web servers.

Plasmid construction and transfection

Full-length rat LIMLE mRNA sequence was cloned from rat testis cDNA by PCR with the specific primers: rLIMLE (Up-ACGCGGATCCATGGCGCGGAATGTGTATGGTCC, Lo-ATAGTTTACGGCGCCCTGTATTGATGCC-CATGGCCTGCTC) (Eurofins MWG) and inserted into the pcDNA6 vector (Invitrogen). 6×10^4 COS (CV-1 (simian) in origin, and carrying the SV40) fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue (kindly provided by the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France) which acquired it from Life Technologies), or rat BMDC (day 8 of culture) were plated on Microscope Cover glasses (Marienfeld GmbH & Co.KG) in 12-well plates (Nunc; Merck/Eurolab France) for 24 hours. Cells were transfected with pcDNA6 plasmid with lipofectamin (Invitrogen) and Plus reagent (Invitrogen) for COS and with Nucleofector Kit Dendritic cell (Lonza) for BMDCs, according to the manufacturer's instructions. Cells were stained 24 hours after transfection.

Immunohistology

COS cells or rat BMDCs were fixed with paraformaldehyde (4%) (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA), permeabilized with Triton (0.3%) and stained with anti-V5 antibody (11 μ g/ml) (Invitrogen), Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG antibody (4 μ g/ml) (Invitrogen) and FITC phalloidin (0.4 U/ml, Invitrogen). Cover glasses were mounted in Prolong Gold 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mounting medium (Invitrogen), and observed by fluorescence microscopy (Nikon A1 R Si Confocal microscope). Images were obtained (X60 Plan Apo N.A: 1.4, zoom 2) with sequential mode and analyzed by using Metamorph program.

RNAi BMDC and COS transfection, activation and T cell stimulation

Non-overlapping LIMLE specific Stealth RNAi (Stealth Select RNAi; Invitrogen) duplexes were both designed and purchased by Invitrogen: Rat RNAi-1 (5'-CCACUGGAUGCUGGUUACUG-GAAAU-3'), rat RNAi-2 (5'-CAUGCUAGACAUCUCUAAAC-CUAUU-3'), mouse RNAi-1 (5'-GCCGAAUUGGGCCAAGUG-GUUGUCUA-3') and mouse (RNAi-2 5'-UAGACAACCACUUGGCCCAUUUCGC-3'). Two million COS or adherent rat or mouse BMDCs (at day 8 of culture) were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and 200 pmol of control RNAi (medium GC content Stealth RNAi negative universal control, Invitrogen) or LIMLE specific RNAi. BMDCs were stimulated for 48 hours with LPS (0.5 μ g/ml). Two days following RNA transfection, COS cells were fixed with paraformaldehyde (4%), scraped, permeabilized with saponin (0.5%) and stained with anti-V5 antibody (11 μ g/ml) (Invitrogen) and Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG antibody (4 μ g/ml) (Invitrogen) for flow cytometric analysis.

-For rat mixed leukocyte reaction (MLR), LEW.1A BMDCs were harvested 2 days after transfection and plated in 96-well plates (6.25×10^4 cells/ml) with allogeneic LEW.1W lymph node-purified total, CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells (20×10^4 cells/ml) in complete RPMI medium. For the MLR with total T cells, cells were pulsed three days later for 8 h with 0.5 μ Ci/well [methyl-³H]-thymidine (Amersham) and ³H incorporation was measured using a scintillation counter (TopCount NXT; PerkinElmer). INF γ , IL-6 and IL-12 production was assessed in the MLR supernatants (at day 5) by ELISA according to the manufacturer instructions (BD Biosciences). For MLR with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled (Invitrogen) CD4⁺CD25⁻ or CD4⁺CD25⁺ T cells, cells were stained on day 4 of culture, with R73-biotin and streptavidin/Alexa Fluor 405 (TCR $\alpha\beta$) and W3/25-PE/Cy7 (CD4⁺) and T cell proliferation (CFSE dilution) was analyzed by flow cytometry.

-In the mouse experiments, efficiency of mouse BMDC RNAi transfection was determined by transfecting cells with an Alexa fluor Red control Oligo (Invitrogen). Analysis was performed 48 hours later by FACS.

-In vitro antigen-specific T cell stimulation assay: BMDC, 8-days post-transfection, were loaded with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (0.1 ng/ml) or ovalbumin protein (500 μ g/ml), stimulated with LPS (0.5 μ g/ml) for 24 hours, washed and then incubated (1×10^4 cells) with CFSE-labeled lymph node purified OT-I CD8⁺ T cells (10×10^4 cells) (Miltenyi kit) in 96-well plates. On day 4 of culture, cells were stained with anti-CD3-APC (BD Biosciences) and anti-CD8-PE/Cy7 (BD Biosciences) and T cell proliferation (by CFSE dilution) was analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Fluorescent labeling was measured using a FACS LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software.

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using Student's *t* test for unpaired data, and results were considered significant if *p* values were <0.05. Data are expressed as mean \pm SEM.

Online Supplemental Material

All the material and methods used for the supplemental data are described in the Material and Methods section.

Results

Identification of an uncharacterized molecule over-expressed in graft rejection

In an attempt to identify new genes that could be involved in the development of chronic rejection or tolerance in transplantation, we applied a pan genomic DNA chip. In a rat MHC fully mismatched cardiac allograft model, we compared whole allografts that develop chronic rejection with tolerated allografts induced by a short-term treatment with an immunosuppressor [9]. We have previously extensively described these models and shown that the DNA chip enabled the identification of molecules involved in these complex phenomena [9,29]. Among the genes up-regulated in chronically rejected allografts versus tolerated ones, we identified the rat gene ID 308794 (RGD1310371). This gene was previously identified as being highly expressed by mouse ciliated cells but has not been characterized [30]. We arbitrarily named this molecule "LIMLE" for "LPS-Induced Molecule". We confirmed, by quantitative RT/PCR, the over-expression of LIMLE mRNA in chronically rejected allografts compared to syngenic grafts (Fig. 1A, *n* = 5, **p*<0.05). We also observed a peak

of expression in acutely rejected allografts (Fig. 1A, $n = 5$, $**p < 0.01$). Interestingly, we also observed a higher mRNA expression of LIMLE in the blood of recipients developing chronic rejection compared to syngeneic or tolerant recipients (Fig. 1A, $n = 5$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$). These results suggest on over-expression of LIMLE during an inflammatory immune response.

LIMLE is highly expressed in activated myeloid cells and in testis, trachea and lung

In order to characterize this new molecule, we analyzed its expression in different rat cell types. Quantification of LIMLE mRNA showed a very low expression in all tested resting cells (NS) (spleen DCs, alveolar macrophage lineage Mac (NR83 83), B, T and EC) (Fig. 1B). However, we observed that LIMLE mRNA expression was strongly induced (up to 50 fold) following

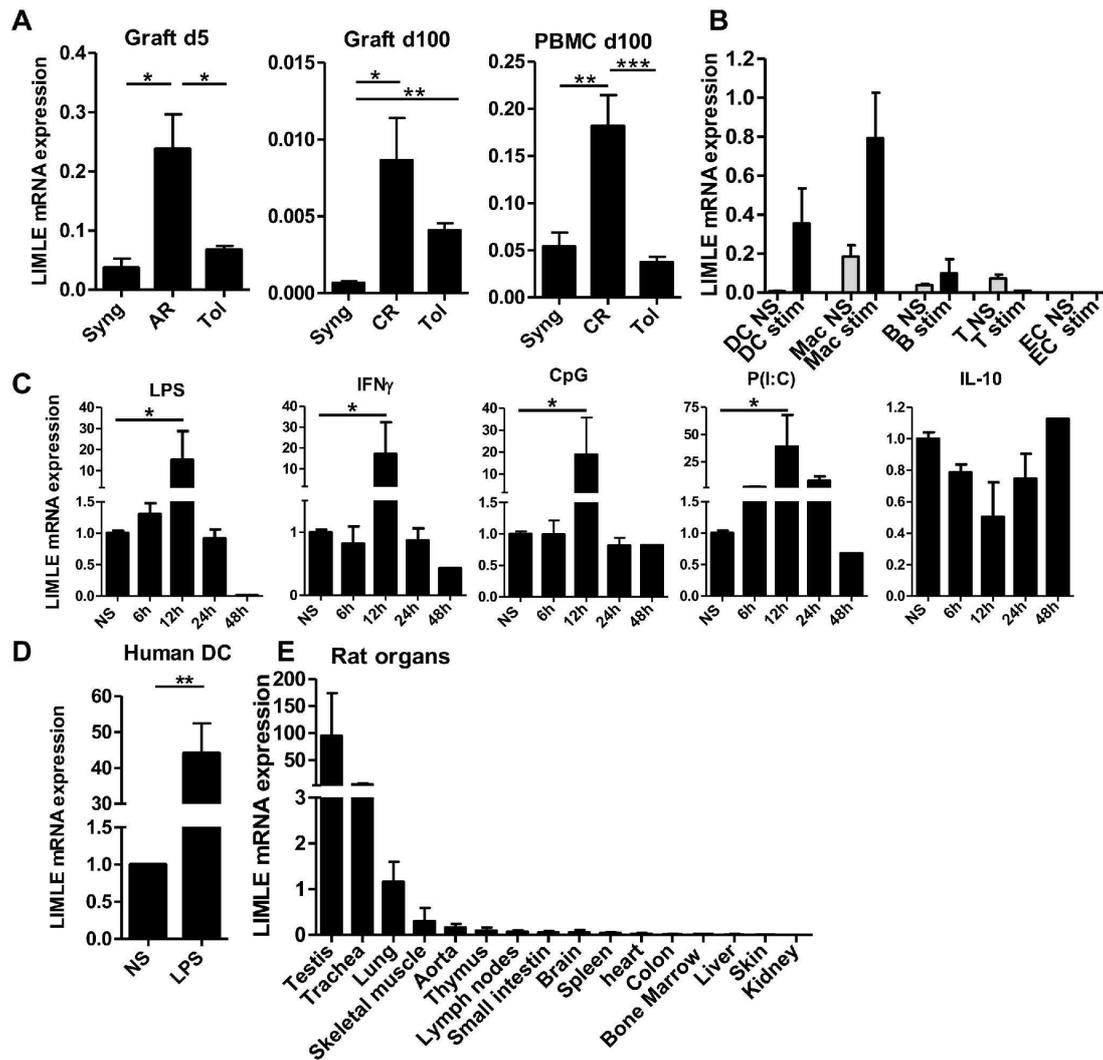


Figure 1. LIMLE mRNA expression in transplantation models, cell subtypes and organs. LIMLE mRNA expression in (A) cardiac grafts and PBMC of rat syngenic recipients ($n = 5$, $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ $***p < 0.001$), (B) Splenic DCs, alveolar macrophage lineage cells NR8383 (Mac), B cells and EC, stimulated (stim) or not (NS) with LPS, IFN γ , CpG, anti-CD3/CD28 or IFN γ respectively (for 12 hours) ($n = 3$), (C) rat BMDCs stimulated or not (NS) with LPS, IFN γ , CpG, Poly(I:C) or IL-10 for 6, 12, 24 or 48 hours ($n = 3$, $*p < 0.05$), (D) Human DCs stimulated or not (NS) with LPS for 12 hours ($n = 3$, $**p < 0.01$) (E) mRNA expression of LIMLE in different organs from naive rats as indicated ($n = 5$). (A–E) Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Units (AU) of LIMLE/HPRT transcript ratio \pm SEM. Statistical evaluation was performed using Student's t test for unpaired data, and results were considered significant if p values were < 0.05 . doi:10.1371/journal.pone.0093894.g001

inflammatory stimulation (Stim) in DCs and alveolar macrophage lineage cells but not in B, T or ECs (Fig. 1B). We performed a LIMLE mRNA expression kinetic analysis in BMDCs and observed that LIMLE was strongly induced (up to 100 fold) 12 hours after stimulation with the different pro-inflammatory stimuli tested (LPS, IFN γ , CpG or Poly(I:C)) (n = 3, *p < 0.05), following which expression rapidly decreased. Interestingly, in contrast to pro-inflammatory stimuli, LIMLE mRNA expression tended to decrease following 12 hours of stimulation with the immuno-regulatory cytokine IL-10 (Fig. 1C) (n = 3, not significant). We analyzed LIMLE mRNA expression in human monocyte-derived DCs and also observed a strong up-regulation (up to 45 fold) following LPS-stimulation, suggesting similar regulation of LIMLE expression across species (Fig. 1D, n = 3, **p < 0.01). We then analyzed LIMLE mRNA expression in different organs or tissues from naive rats. We noted strong expression in the testis, trachea and lung. The expression was lower in the other organs or tissues tested (skeletal muscle, aorta, thymus, lymph nodes, small intestine, brain, spleen, heart, colon, bone marrow, liver, skin, and kidney) (Fig. 1E, n = 3).

LIMLE is involved in the stimulatory properties of DCs

To determine the function of LIMLE, we used specific LIMLE reformed-type small interfering RNA (RNAi) that allows efficient and long-term inhibition of the specific gene without inducing maturation of the cells [31]. Two non-overlapping RNAi specific for LIMLE were tested in rat LPS-stimulated BMDC and compared to a control RNAi. We previously demonstrated that this technology transfects most of the rat BMDCs (up to 80% of the cells were transfected with a fluorescent RNAi) and allows efficient mRNA and protein inhibition [29,32]. With LIMLE specific RNAi, we obtained efficient inhibition of LIMLE mRNA expression in LPS-stimulated BMDCs compared to control RNAi (up to 70%) (Fig. 2A a), n = 3, *p < 0.05 and ***p < 0.001). To check for LIMLE protein inhibition, we attempted to generate anti-rat LIMLE polyclonal antibodies by immunizing rabbits with LIMLE specific peptides. Unfortunately, we did not obtain efficient immunization, suggesting that LIMLE is highly conserved between species. Therefore, we transfected eukaryote cells by lipofection with a plasmid encoding the rat LIMLE full-length sequence and containing the V5 tag. We then tested the inhibition efficiency of the LIMLE specific RNAi on LIMLE protein via the V5 tag. We obtained efficient inhibition of LIMLE protein expression compared to control RNAi (up to 70%) (Fig. 2A b), n = 6, **p < 0.01). We then analyzed whether LIMLE inhibition modified LPS-induced maturation of immature BMDCs. To generate immature BMDCs, we used low concentrations of GM-CSF and IL-4 to obtain the "non-adherent" population of immature cells that are able to further mature following LPS stimulation and to efficiently stimulate T cells. Although LIMLE mRNA expression is highest at 12 hours after stimulation, we incubated BMDC with RNAi for 48 hours to be sure that the mRNA expression and consequently the protein expression would be decreased. Moreover, we used 48 hours to be sure that the BMDC had the time to fully mature with the Toll-like receptor ligand (TLR-I) stimulus (LPS) and hence be able to stimulate T cells. We did not observe any effect of LIMLE inhibition on viability of the cells, on the expression of activation molecules such as MHC Class I and Class II, CD80 or CD86, or on the LPS-induced cytokine production of IL-12p70, IL-6 or IL-10 (Fig. S1, A, B and C respectively). Next, we investigated whether inhibition of LIMLE in matured BMDCs affected their ability to promote T cell proliferation. In a fully allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR), we observed a reduction in T cell proliferation when

LIMLE was inhibited in the matured BMDCs (Fig. 2B a), n = 3, *p < 0.05). Since we observed an increase in LIMLE expression with pro-inflammatory stimuli and a tendency for a decrease with IL-10, LIMLE could be involved in the expansion of effector T cells and not of regulatory T cells, to favor a strong immune response. To determine whether LIMLE inhibition decreased the ability of BMDCs to stimulate both allogeneic effector and regulatory T cells, we also stimulated highly purified CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} (mostly regulatory T cells) in a MLR. We observed that LIMLE inhibition in BMDCs decreased significantly the proliferation of purified CD4⁺CD25⁻ (Fig. 2B b), n = 4, *p < 0.05). This decrease is not evident with purified CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells (Fig. 2B c), n = 4). This could be due to their low proliferation. Nevertheless, increase of proliferation was not observed.

Low production of IFN γ was noted in the MLR supernatants due to the low proliferation of the allogeneic effector T cells (Fig. 2C, n = 3, *p < 0.05). However, we observed again no modification of IL-6 and IL-12 expression by the matured BMDCs in the MLR. These results demonstrate that LIMLE is not involved in the maturation of the DCs but rather in their capacity to stimulate effector T cells (Fig. 2C, n = 3).

We then used a more relevant and sensitive system of T cell stimulation using CD8⁺ T cells from OT-I transgenic mice that are TCR transgenic for ovalbumin (OVA). First, we evaluated the efficiency of transfection of mouse BMDCs with specific fluorescent RNAi. We observed that almost all of the cells (up to 97%) were transfected with RNAi (Fig. 2D). We confirmed inhibition of LIMLE mRNA expression in mouse BMDCs (up to 70%) with two different mouse LIMLE specific RNAi (Fig. 2E, n = 3, *p < 0.05 and ***p < 0.001). Similar to our observation in rat BMDCs, inhibition of LIMLE in mice DCs did not modify the viability of the cells or the expression of activation molecules (MHC Class I and Class II, CD80 or CD86) (Fig. S2, A and B respectively). However, LIMLE inhibition in OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide or OVA protein loaded BMDCs strongly reduced their ability to stimulate the transgenic CD8⁺ T cells (Fig. 2F, n = 3, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) (Fig. S3, gate strategy (A) and dose effect (B) respectively). The reduction of proliferation was observed with both OVA peptide or OVA protein loaded DC, demonstrating that this decrease was not due to a fault in antigen processing. These data confirm a role for LIMLE in DCs for the activation of effector T cells.

LIMLE protein localization and bioinformatic analysis

To determine the cellular localization of LIMLE, we analyzed its amino-acid (AA) sequence by using a variety of predictive software programs including PSORTII [18], TMHMM2.0 [21], NMT tools [22], TargetP1.1 [19] and NetNES [20]. Results revealed no transmembrane domain and a high probability for LIMLE to be located in the cytoplasm (data not shown). In addition, we detected a Nuclear Export Signal domain (NES) from AA 100 to 110 (**I-K-A-Q-L-N-D-D-L-E-I**), suggesting that LIMLE can circulate between the nucleus and cytoplasm.

To determine its exact cellular localization, without access to specific antibodies, we transfected eukaryote cells (COS) by lipofection with a plasmid encoding the rat LIMLE full-length sequence and containing the V5 tag. Confocal microscopy analysis revealed expression of the V5 tag-associated LIMLE protein in the cytoplasm and nucleus. Interestingly, tagged LIMLE protein appeared to be organized as a network in the cytoplasm of adherent COS cells, similarly to some cytoskeleton filament proteins (Fig. 3A). Therefore, we performed staining of LIMLE protein and polymerized actin using phalloidin. Interestingly, we

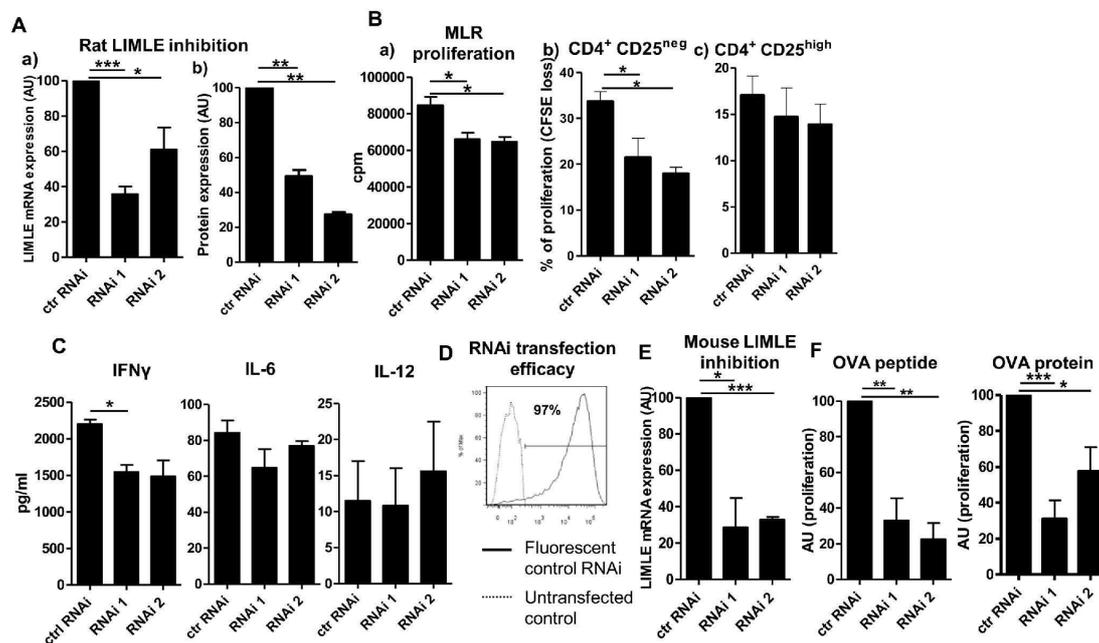


Figure 2. The role of LIMLE in the stimulatory properties of BMDCs. (A) a) LIMLE mRNA expression in rat BMDCs transfected with control or one of two LIMLE specific RNAi. Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Unit (AU) of LIMLE/HPRT transcript ratio \pm SEM ($n=3$ * $p<0.05$ *** $p<0.001$); b) V5 tagged LIMLE protein expression in eukaryote cells transfected with a plasmid encoding rat LIMLE and V5 and either a control or one of two LIMLE specific RNAi. Data were expressed in Arbitrary Units (AU) of % of V5⁺ cells assessed by flow cytometry compared to control RNAi = 100 ($n=6$, ** $p<0.01$) (B) Proliferation of allogeneic T cells stimulated with control or one of two LIMLE specific RNAi transfected BMDCs (MLR) for 4 days as follow a) ³H incorporation (cpm) for bulk T cells, b) CFSE loss from CD4⁺CD25^{neg} and c) CFSE loss from CD4⁺CD25^{high} T cells ($n\geq 3$, * $p<0.05$). (C) IFN γ , IL-6 and IL-12 quantification by ELISA of MLR supernatants ($n=3$, * $p<0.05$). (D) Representative histograms (flow cytometry) of mouse BMDC transfection efficiency (with red fluorescent control RNAi (plain line) or untransfected control (dotted line)). (E) LIMLE mRNA expression in mouse BMDCs transfected with control or one of two LIMLE specific RNAi. Quantitative RT-PCR results were expressed in Arbitrary Units (AU) of LIMLE/GAPDH transcript ratio \pm SEM ($n=3$, * $p<0.05$ *** $p<0.001$). (F) Proliferation of OT-I CD8⁺ T cells stimulated for 4 days with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (0.1 ng/ml) ($n=3$) or OVA protein (500 μ g/ml) ($n=4$) loaded mouse BMDCs (transfected with control or one of two LIMLE specific RNAi). Data were expressed in AU of CFSE dilution compared to control=100 (* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$). Statistical evaluation was performed using the Student's *t* test for unpaired data, and results were considered significant if *p* values were <0.05 . doi:10.1371/journal.pone.0093894.g002

observed that LIMLE localized with actin at some areas under the cell plasma membrane (at specific cytoskeleton organized structures or protrusions) (Fig 3B). The profiles of the fluorescent intensities for LIMLE and actin were plotted at two different cell membrane locations (transept white lines) (Fig 3B i) ii). Representative histograms showed overlapping staining and parallel fluctuations of LIMLE and actin intensities suggested a close relationship between these proteins at some areas under the plasma membranes. We attempted to confirm this staining in more physiologic eukaryote cells than the COS by using rat BMDCs. Rat BMDCs were transfected by nucleofection with the plasmid encoding rat LIMLE and confocal microscopy analysis revealed the same type of staining as in COS cells, with staining in the nucleus and cytoplasm (Figure 3C). We also observed some localization of LIMLE with actin at some areas under the plasma membrane in DCs (22.5% of LIMLE protein overlaps with actin in representative DC) (Fig 3C i).

In the literature, nothing has been described about the LIMLE gene except its high expression by mouse ciliated cells [30]. To obtain more information about LIMLE and notably, to determine whether this new molecule could be linked to a specific family, we performed *in silico* analysis of the LIMLE sequence in collaboration

with the GenOuest bioinformatics core facility (Rennes, France). NCBI blast of the rat LIMLE sequence (gene name RGD1310371, gene ID 308794) revealed 71% and 88% identity with the human (gene name C15orf26, gene ID 161502) and mouse (gene name 1700026D08Rik, gene ID 75556) sequences respectively, demonstrating that LIMLE is highly conserved between species. Any specific signal characteristic of a known family protein or specific pattern was revealed with InterProScan portal [23]. Moreover, sequence alignment algorithms such as "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) [33] and PSI-BLAST [34] could not detect a homolog of LIMLE in the protein databank.

Sometimes, structural information can help to predict biological function of a molecule (3D shape dictates how the protein interacts with a ligand or other proteins). We used the homology modeling web servers "gene3D" [24], the I-TASSER [27,28] and PHYRE for protein structure prediction [25,26,35]. Results from these 3 different web servers revealed a high probability for a structural link between LIMLE and the trefoil protein family (with 6 hits exhibiting a % of identity $\geq 20\%$, the threshold to consider homology). Trefoil molecules are characterized by a rich cysteine domain, named the trefoil domain, and by their "three-leaf"

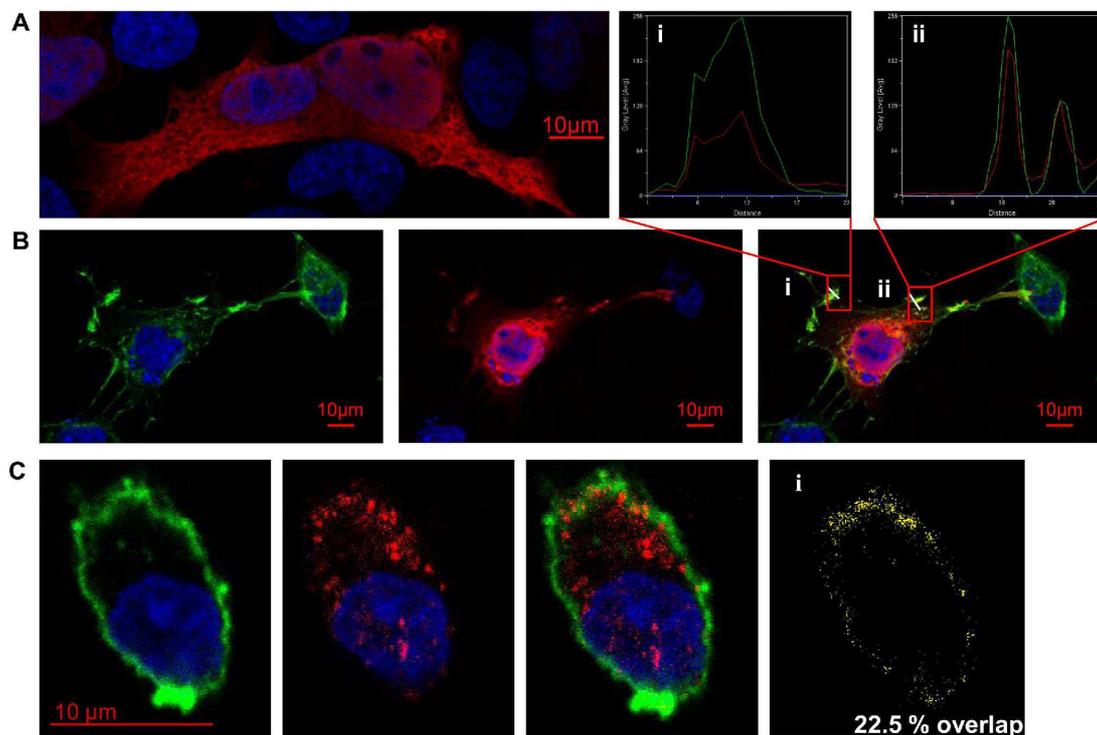


Figure 3. Cellular localization of LIMLE protein. Representative pictures of immuno-fluorescence staining of (A and B) COS or (C) BMDCs transfected with a plasmid encoding full length rat LIMLE protein and containing the V5 tag (red) with DAPI (blue) and and phalloidin (polymerized actin) (green). Original magnification $\times 1200$ (Plan Apo N.A: 1.4 zoom 2.). (Bi,ii) Representative histograms of fluorescence intensity (AU) in COS cells detected in pixels with the indicated box, graphed with the linescan function of Metamorph Image Processing Software. (Ci) Representative picture of LIMLE overlapping with actin in DCs, processed with Metamorph Image Processing Software. Pictures were representative of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0093894.g003

structure [36,37,38]. LIMLE does not contain a rich cysteine domain, so does not belong to the trefoil molecules. However, by its predictive structure, it presents similarities to the structure of the trefoil molecule family.

We also observed conserved gene order of the following genes *Tmc3*, *Stard5*, *IL-16*, *LIMLE* (RGD1310371), *Mesdc1* (mesoderm development candidate 1) and *Mesdc2* in rat, mouse and human chromosomes (Data not shown). Interestingly, the *LIMLE* gene is flanked by *IL-16* and *Mesdc-1*, two genes that have been described to bind the cytoskeleton proteins myosin [39] and actin [40,41] respectively. Exceptional conservation of shared synteny can reflect important functional relationships between genes [42]. Additionally, genes of similar structure or linked functions are often grouped in a locus/complex of genes or supergenes on a chromosome as is the case for the NK or MHC gene complexes [43,44]. Therefore, the proximity of *LIMLE* with these genes may suggest the presence of a locus/complex of genes sharing similar properties or functions related to the cytoskeleton.

Discussion

In this study, we characterized a molecule not yet described that we have named LIMLE and that we have identified as being over-expressed in the blood and graft of recipients developing rejection.

We showed that LIMLE is expressed by myeloid cells, notably by DCs, following stimulation with pro-inflammatory reagents. In contrast, LIMLE expression is not increased and even tends to decrease by the immuno-regulatory cytokine IL-10. Similarly, LIMLE gene has been reported to be inhibited by the anti-inflammatory agent arbutin [45,46]. This regulation of expression could explain the accumulation of LIMLE in recipients developing rejection versus tolerance. Indeed, rejection is characterized by the expression of pro-inflammatory cytokines and by the activation of myeloid cells that infiltrate the graft, uptake donor antigen and migrate to the secondary lymphoid organs to stimulate T cells [47]. In contrast, tolerance is associated with a strong inhibition of inflammation and cell activation and by the over-expression of immuno-regulatory factors that could repress LIMLE expression [8,48,49,50].

We observed co-localization of LIMLE with actin at some membrane protrusions. Moreover, LIMLE is highly expressed in activated myeloid cells, ciliated cells [30], and in the testis, trachea and lung which are rich in highly ciliated cells. These data suggest a possible involvement of LIMLE in dynamic cell extensions. LIMLE and its neighboring genes *IL-16* and *Mesdc-1*, that exhibit shared synteny between species, may form a complex of molecules sharing a functional relationship and the common feature of being associated with the cytoskeletal network.

Interestingly, LIMLE predictive structure study indicated a similarity of structure with trefoil proteins, some of which interact with actin. Among them are the actin filament (F-actin) bundling proteins Fascins [51] that exhibit the same expression profile as LIMLE, with a high expression in activated DCs (Fascin-1) [6] and a high expression in testis (Fascin-3) [52]. Fascin-1 is involved in the formation of filopodia, dendrites and invadopodia [53,54,55] that play critical roles in maturation-associated DC functions such as migration, cytokine production and interaction/activation of T cells [55,56,57,58]. Interestingly, Fascin-3, like LIMLE, is highly expressed in testis at the spermatid stage ([52] and GEO profiles, data not shown). Indeed, during spermiogenesis, round spermatids are remodeled into the fusiform shape of mature spermatozoa. For that, significant morphological changes occur and are correlated with a reorganization of microfilaments and microtubules in the head and tail regions of elongating spermatids by the expression of specialized actin- and tubulin-associated proteins [52]. LIMLE, like Fascin, may function in the microfilament rearrangements that accompany fertilization. The role of these molecules sharing the common feature of being associated with the cytoskeletal network is important to decipher. Indeed, Fascin has received a lot of attention because multiple clinical studies have implicated its expression in cancer progression and metastasis [53]. We observed LIMLE protein also in the nucleus and identified a NES signal that allows molecule exchange between the cytoplasm and nucleus through a nuclear pore complex. Similarly to actin, which contains two NES [59], LIMLE may shuttle between the cytoplasm and nucleus to play a role in both compartments. Indeed, in addition to playing a fundamental role in the cytoplasm, actin has been described to bind RNA polymerase and to promote chromatin remodeling [60,61,62,63].

We observed no role for LIMLE in the up-regulation of costimulatory molecules or in cytokine expression in DCs in response to TLR-L or in MLR. However, inhibition of LIMLE in DCs reduces the proliferation and IFN γ secretion of responding effector T cells. Therefore, LIMLE is not involved in DC maturation but rather plays a role in their ability to stimulate T cells. LIMLE, which is strongly up-regulated in DCs following inflammatory maturation, could be required for immune synapse formation with T cells to efficiently prime T cells. Indeed, recent studies have assigned an active role of DC actin cytoskeleton during immune synapse formation between T cells and DCs to allow efficient T cell activation [64]. We did not observe an effect of LIMLE expression in the expansion of regulatory T cells. Moreover, the immuno-regulatory cytokine IL-10 tends to decrease the expression of LIMLE suggesting that LIMLE inhibition could prevent expansion of effector T cells while sparing regulatory T cells. Therefore, a different expression of LIMLE in mature versus immature DCs may promote differently the formation and the stability of the immune synapse to generate either classical effector or regulatory T cells [65,66]. For example, it has been shown that the protein kinase C by its different localization in the immune synapse between effector and regulatory T cell offers therapeutic implications to block undesirable inflammatory responses [67]. Indeed, inhibition, in effector T cells will reduce effector function, and in regulatory T cells will increase suppressor function. LIMLE by acting on DC-T cell interaction may also modulate the fate of effector T cells versus regulatory T cells and therefore the nature of the adaptive immune response. Indeed, it has been shown that BMDc deficient in the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP), a regulator of the actin cytoskeleton reorganization, present no alteration of maturation or antigen endocytosis and processing but have a reduced ability to stimulate specific T cells due to an alteration in the immune synapse structure [58].

Interestingly, it has been shown that formation of the immunological synapse bears striking similarities to cilia formation and cytokinesis [68]. All share the unusual property of forming around the site of centrosomal docking at the plasma membrane. The synapse is a focal point for both exocytosis and endocytosis, both of which are triggered by localized cell signaling at the plasma membrane. Signaling triggers massive reorganization of both the actin and microtubule cytoskeletons, with the centrosome moving right up to plasma membrane allowing the synapse formation. LIMLE may play a role in this focal point important for cilia, cytokinesis and synapse formation. It will be interesting to further investigate the role of LIMLE in DC/T cell immune synapse formation. We did not observe an effect of LIMLE inhibition on DC migration in chemotaxis experiments (data not shown). This does not exclude a role for LIMLE in cytoskeleton rearrangement that is important for motility or mobility.

To conclude, we describe in this study a new molecule strongly expressed by inflammatory activated DC and important for efficient T cell priming. LIMLE could be involved in the dynamic function of the specialized structure of the cytoskeleton, important for cell adhesion, migration, motility or immune synapse formation in these cells. In the future, LIMLE may represent a new therapeutic target to regulate DC activity and immune responses.

Supporting Information

Figure S1 A) Viability of rat LPS-stimulated BMDC (transfected 48 hours with control or two LIMLE specific RNAi). Data were analyzed by DAPI exclusion by flow cytometry and are expressed in percentage of live cells. Data are shown as the mean \pm SEM of 3 independent experiments. **B)** Dot plot gate used and representative histograms of MHC class I, MHC class II, CD80 and CD86 expression by rat unstimulated or LPS-stimulated BMDCs transfected 48 hours with control or two LIMLE specific RNAi. Analysis was performed by flow cytometry. The same results were obtained in five independent experiments. **C)** Quantification of IL-6, IL-12, IL-10 cytokine production by rat LPS-stimulated BMDC (transfected for 48 hours with control or two LIMLE specific RNAi). Data were quantified by ELISA (BD Biosciences) and are shown as the mean \pm SEM of n = 3 samples pooled from three independent experiments. (TIF)

Figure S2 A) Viability of mouse LPS-stimulated BMDC (transfected 48 hours with control or two LIMLE specific RNAi). Data were analyzed by DAPI exclusion by flow cytometry and are expressed in percentage of live cells. Data are shown as the mean \pm SEM of 7 independent experiments. **B)** Dot plot gates used and representative histograms of MHC class I, MHC class II, CD80 and CD86 expression by mouse unstimulated or LPS-stimulated BMDCs (gated on CD11c⁺) transfected with control RNAi or two LIMLE specific RNAi. Analysis was performed by flow cytometry. Same results were obtained in five independent experiments. (TIF)

Figure S3 A) Gate strategy, Representative flow cytometry analysis gates used to quantify the proliferation of OT-I T cells stimulated in vitro with mouse transfected BMDC (shown in figure 2F). Arrows show next gate. **B)** Dose-effect of proliferation of OT-I CD8⁺ T cell stimulated (for 4 days) with OVA257–264 peptide (0.001-10 ng/ml) or OVA protein (0-1000 μ g/ml) loaded mouse LPS-stimulated BMDCs (transfected for 24 h with control or two LIMLE specific RNAi). Data are shown as the mean \pm SEM n = 2 samples from one experiment representative of four

independent experiments. Data were expressed as % of proliferation (CFSE dilution). (TIF)

References

- Medzhitov R, Janeway C Jr (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* 343: 338–344.
- Trombetta ES, Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975–1028.
- van Helden SF, Krooshoop DJ, Broers KC, Raymakers RA, Figdor CG, et al. (2006) A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J Immunol* 177: 1567–1574.
- Watts C, Zaru R, Prescott AR, Wallin RP, West MA (2007) Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 19: 73–78.
- Nobile C, Lind M, Miro F, Chemin K, Tourret M, et al. (2008) Cognate CD4+ T-cell-dendritic cell interactions induce migration of immature dendritic cells through dissolution of their podosomes. *Blood* 111: 3579–3590.
- Yamashiro S (2012) Functions of fascin in dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32: 11–21.
- Ono K, Lyndsey ES (1968) Improved technic of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57: 225–229.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, et al. (2002) Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2: 745–757.
- Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, et al. (2006) New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82: 1185–1193.
- Helmke RJ, Boyd RL, German VF, Mangos JA (1987) From growth factor dependence to growth factor responsiveness: the genesis of an alveolar macrophage cell line. In *Vitro Cell Dev Biol* 23: 567–574.
- Charreau B, Cassard A, Tesson L, Le Mauff B, Navenot J-M, et al. (1994) Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation* 58: 1222–1229.
- Peche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC (2003) Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76: 1503–1510.
- David A, Chetrit J, Coupel-Glauce H, Tesson L, Cassard A, et al. (1997) Adenovirus-mediated gene transfer in rat liver of IL-4 but not IL-10 produces severe acute hepatitis. *Cytokine* 9: 818–829.
- Peche H, Trinite B, Martinet B, Cuturi MC (2005) Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* 5: 255–267.
- Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Mefflah K, Gregoire M (2001) Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother* 50: 417–427.
- Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, et al. (2004) Induction of Fractalkin and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation* 78: 1259–1266.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34–36.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005–1016.
- la Cour T, Kiemer L, Molgaard N, Gupta R, Skriver K, et al. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17: 527–536.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580.
- Eisenhaber F, Eisenhaber B, Kubina W, Maurer-Stroh S, Neuberger G, et al. (2003) Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res* 31: 3631–3634.
- Zdobnov EM, Apweiler R (2001) InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17: 847–848.
- Yeats C, Maibaum M, Marsden R, Dibley M, Lee D, et al. (2006) Gene3D: modelling protein structure, function and evolution. *Nucleic Acids Res* 34: D281–284.
- Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJ, Kelley LA (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70: 611–625.
- Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4: 363–371.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725–738.
- Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2011) A protocol for computer-based protein structure and function prediction. *J Vis Exp*: e3259.
- Thebault P, Lhermite N, Tilly G, Le Texier L, Quillard T, et al. (2009) The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J Immunol* 183: 3099–3108.
- McClintock TS, Glasser CE, Bose SC, Bergman DA (2008) Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiol Genomics* 32: 198–206.
- Klatt AR, Klinger G, Zech D, Paul-Klaus B, Renno JH, et al. (2007) RNAi in primary human chondrocytes: efficiencies, kinetics, and non-specific effects of siRNA-mediated gene suppression. *Biologicals* 35: 321–328.
- Condamine T, Le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, et al. (2010) Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 88: 507–515.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Kelley LA, Shrimpton PJ, Muggleton SH, Sternberg MJ (2009) Discovering rules for protein-ligand specificity using support vector inductive logic programming. *Protein Eng Des Sel* 22: 561–567.
- Baker ME (1988) Oestrogen-induced pS2 protein is similar to pancreatic spasmodic polypeptide and the kringle domain. *Biochem J* 253: 307–309.
- Thim L (1988) A surprising sequence homology. *Biochem J* 253: 309.
- Thim L (1989) A new family of growth factor-like peptides. 'Trefol' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmodic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmodins). *FEBS Lett* 250: 85–90.
- Bannert N, Vollhardt K, Asomuddinov B, Haag M, Konig H, et al. (2003) PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *J Biol Chem* 278: 42190–42199.
- Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, et al. (2012) Novel oncogenic function of mesoderm development candidate 1 and its regulation by MiR-574-3p in bladder cancer cell lines. *Int J Oncol* 40: 951–959.
- Gingras AR, Bate N, Gault BT, Patel B, Kopp PM, et al. (2010) Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin. *J Biol Chem* 285: 29577–29587.
- Overbeek R, Fonstein M, D'Souza M, Pusch GD, Maltsev N (1999) The use of gene clusters to infer functional coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 2896–2901.
- Yokoyama WM, Plougastel BF (2003) Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3: 304–316.
- Martinez-Borra J, López-Larrea C (2012) The Emergence of the Major Histocompatibility Complex. In: López-Larrea C, editor. *Self and Nonself*. Springer US. pp. 277–289.
- Cheng SL, Liu RH, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, et al. (2007) Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J Biomed Sci* 14: 87–105.
- Lee HJ, Kim KW (2012) Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res* 61: 817–825.
- Celli S, Albert ML, Bouso P (2011) Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med* 17: 744–749.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, et al. (2002) Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 168: 5058–5069.
- Thebault P, Condamine T, Heslan M, Hill M, Bernard I, et al. (2007) Role of IFN-gamma in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am J Transplant* 7: 2472–2482.
- Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, et al. (2011) Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant* 11: 429–438.
- Ponting CP, Russell RB (2000) Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol* 302: 1041–1047.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC LLT JD AL PH OC YLB MCC. Performed the experiments: LLT JD AL PH OC YLB. Analyzed the data: LLT JD AL PH OC YLB EC. Contributed reagents/materials/analysis tools: EC LLT JD AL PH OC YLB MCC. Wrote the paper: EC LLT JD.

Role for LIMLE in Stimulatory Properties of DC

52. Tubb B, Mulholland DJ, Vogl W, Lan ZJ, Niederberger C, et al. (2002) Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head. *Exp Cell Res* 275: 92–109.
53. Machesky LM, Li A (2010) Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol* 3: 263–270.
54. Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, et al. (2010) The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol* 20: 339–345.
55. Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, et al. (2006) Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol* 174: 863–875.
56. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, et al. (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305: 1153–1157.
57. Lammermann T, Renkawitz J, Wu X, Hirsch K, Brakebusch C, et al. (2009) Cdc42-dependent leading edge coordination is essential for interstitial dendritic cell migration. *Blood* 113: 5703–5710.
58. Bouma G, Mendoza-Naranjo A, Blundell MP, de Falco E, Parsley KL, et al. (2011) Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood* 118: 2492–2501.
59. Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E (1998) Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J* 17: 1635–1641.
60. Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 16: 191–196.
61. Hu P, Wu S, Hernandez N (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 18: 3010–3015.
62. Hofmann WA, Stojilkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, et al. (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 6: 1094–1101.
63. Qi T, Tang W, Wang L, Zhai L, Guo L, et al. (2011) G-actin participates in RNA polymerase II-dependent transcription elongation by recruiting positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J Biol Chem* 286: 15171–15181.
64. Al-Ahwan MM, Liwski RS, Haeryfar SM, Baldrige WH, Hoskin DW, et al. (2003) Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent. *J Immunol* 171: 4479–4483.
65. Reichardt P, Dornbach B, Rong S, Beissert S, Gueler F, et al. (2007) Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 110: 1519–1529.
66. Roncarolo M-G, Levings M, Traversari C (2001) Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 193: F5–F9.
67. Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Blazar BR (2011) PKC-theta function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol* 32: 358–363.
68. Griffiths GM, Tsun A, Stinchcombe JC (2010) The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol* 189: 399–406.

Thèse de Doctorat

Justine DURAND

Etude de lymphocytes B régulateurs dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat

Study of regulatory B cells in a long-term cardiac allograft tolerance in rat model

Résumé

Actuellement, les travaux réalisés en transplantation visent à induire une tolérance à long terme et spécifique du greffon. Une meilleure compréhension des mécanismes associés à cette tolérance permettrait donc d'optimiser les traitements et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de cette thèse a donc été de caractériser les mécanismes immunologiques impliqués dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Durant cette étude, nous avons poursuivi les travaux précédemment entrepris par l'équipe, pour lesquels nous avons observé une accumulation de lymphocytes B (LB) en périphérie, associés à un profil inhibé. Ici, nous mettons en évidence la présence de LB régulateurs dans la rate de ces animaux, capables de transférer une tolérance spécifique du donneur chez de nouveaux receveurs via le TGF β et l'IL-10, avec un phénotype majoritairement mémoire ou plasmablaste (IgD⁻ IgM⁺ CD27^{het}). Suite à ce transfert, les LB migrent majoritairement dans le greffon où ils gardent leur phénotype IgM⁺ IgG⁻, pour médier localement la réponse immunitaire et promouvoir l'expansion de lymphocytes T (LT) régulateurs. *In vitro*, ces LB sont capables d'inhiber la sécrétion de TNF α par les LT et suite à une stimulation anti-CD40, ils ne peuvent moduler l'expression de différents gènes tels *Bcl6* ou *Prdm1*. Cependant, ils up-régulent l'expression de molécules inhibitrices comme CD23 et Bank1, mais également Granzyme B. Ces LB retrouvés ici montrant des similitudes avec ceux observés chez l'Homme, ce modèle offre une grande opportunité pour étudier plus précisément le rôle et le potentiel thérapeutique des Breg, afin de les moduler dans des études cliniques.

Mots clés

Transplantation, tolérance, lymphocytes B.

Abstract

Currently, the transplantation research aims to induce long term donor-specific graft tolerance. A better comprehension of tolerance-associated mechanisms could help to improve treatments and identify new therapeutical strategies. The purpose of this thesis is so to characterize immunological mechanisms involved in a model of cardiac allograft tolerance in rat. A first study of the B cell response in tolerant rats allowed us to show an accumulation of inhibited profile associated B cells. Here, we demonstrate the presence of regulatory spleen B cells (B_{reg}) mostly IgD⁻ IgM⁺ CD27^{het}, suggesting a memory/plasmablast phenotype, able to transfer a donor-specific allograft tolerance to new recipients via IL-10 and TGF β -dependent mechanisms. Following transfer, these cells migrate preferentially to the graft to locally mediate immunosuppression, where they maintain an immature IgM⁺ IgG⁻ phenotype and promote *in situ* the expansion of FoxP3⁺ T_{reg}. *In vitro*, these B cells suppress TNF α secretion by T cells in MLR and following anti-CD40 stimulation, they are not able to modulate *Bcl6* or *Prdm1* expression. However, they up-regulate the expression of the inhibitory molecules CD23 and Bank1, and Granzyme B (GZB). Therefore, given that it recapitulates several findings from patients, and that our B_{reg} seem to maintain a stable phenotype following transfer, our model offers the unique opportunity to decipher the role and therapeutical potential of these B_{reg} to modulate them in transplantation and cancer in clinic.

Key Words

Transplantation, tolerance, B cells.