

# CARACTÉRISATION D'UNE POPULATION DE LYMPHOCYTES B RÉGULATEURS EN TRANSPLANTATION RÉNALE

## CHARACTERIZATION OF A POPULATION OF REGULATORY B LYMPHOCYTES IN RENAL TRANSPLANTATION

Par Sophie BROUARD<sup>1,2</sup> & Le Hoa MAI<sup>1,2</sup>

(Communication présentée le 12 juin 2021, manuscrit accepté le 2 mars 2022)

### RÉSUMÉ

Au cours de la dernière décennie, plusieurs populations de lymphocytes B avec des fonctions régulatrices ont été identifiées dans un nombre croissant de conditions pathologiques. Alors que depuis plusieurs années nous nous intéressons à une population de patients transplantés tolérants leur greffon rénal, nous avons voulu explorer ce processus de régulation chez ces patients. Après avoir montré que les patients tolérants présentaient un profil transcriptionnel avec une forte empreinte lymphocytaire B, nous avons montré qu'ils présentaient un nombre plus élevé de cellules B exprimant le granzyme B capables d'inhiber la prolifération des cellules T effectrices par un mécanisme dépendant du contact du lymphocyte B avec sa cible et du granzyme B. Nous avons caractérisé ces lymphocytes B et avons pu établir un protocole d'expansion de ces cellules permettant d'envisager leur utilisation future en thérapie cellulaire.

**Mots-clés :** Transplantation, Régulation, Lymphocyte B, tolérance

### ABSTRACT

Over the last decade, several populations of B cells with regulatory functions have been identified in an increasing number of pathological conditions. Since for several years we have been interested in a population of kidney transplant patients tolerant to their graft, we wanted to explore this regulatory process in these patients. After having shown that tolerant patients had a transcriptional profile with a strong B lymphocyte imprint, we showed that they had a higher number of B cells expressing granzyme B capable of inhibiting the proliferation of effector T cells by a mechanism depending on the contact of the B lymphocyte with its target and on granzyme B. We characterized these B lymphocytes and were able to establish a protocol for the expansion of these cells allowing us to consider their future use in cell therapy.

**Keywords:** Transplantation, Regulation, B lymphocyte, tolerance

### INTRODUCTION

Les lymphocytes B sont principalement connus comme des effecteurs de la réponse immunitaire en raison de leur capacité à sécréter des anticorps et à induire l'activation des cellules T par la présentation d'antigènes (Crawford *et al.* 2006 ; Hampe, 2012 ; Martin & Chan, 2006 ; Parker Harp *et al.* 2015). Néanmoins, des preuves de l'existence de lymphocytes B ayant des propriétés suppressives ont également été trouvées dans différentes situations. Ces lymphocytes B, également appelées *Lymphocytes B régulateurs (Bregs)*, ont été décrits pour la première fois pour leur capacité à réguler l'inflammation dans des modèles murins

de colite, d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale et d'arthrite (Hampe, 2012 ; Martin & Chan, 2006 ; Parker Harp *et al.* 2015 ; Floudas *et al.* 2016). Chez l'homme, les fonctions régulatrices de ces *Bregs* ont également été démontrées dans divers contextes cliniques, notamment dans le cancer, l'auto-immunité et la tolérance aux allogreffes rénales (Mauri & Menon, 2017 ; Rosser & Mauri, 2015 ; Wasik *et al.* 2018). Les *Bregs* exercent des fonctions suppressives qui affectent différents types de cellules et agissent par différents mécanismes, ouvrant ainsi une nouvelle voie pour la thérapie cellulaire. Cependant, plusieurs obstacles empêchent actuellement leur utilisation en clinique. La nature, le phénotype et la fonction

1. CHU Nantes, Nantes Université, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

2. Labex IGO, Nantes, France. Courriel : [Sophie.brouard@univ-nantes.fr](mailto:Sophie.brouard@univ-nantes.fr)



des *Bregs* restent mal décrits et dépendent du contexte immunologique ; les mécanismes d'action des *Bregs* peuvent différer entre l'homme et les modèles animaux (Mauri & Menon, 2017 ; Rosser & Mauri, 2015). Enfin, les lymphocytes B ne sont pas faciles à cultiver dans le temps et il est difficile aujourd'hui d'envisager pour les *Bregs* une application future en thérapie cellulaire.

Au cours de la dernière décennie, une population de lymphocytes B sécrétant du granzyme B (GZMB) a été identifiée comme une nouvelle population de lymphocytes B suppresseurs impliquée dans un nombre croissant de conditions pathologiques, telles que la leucémie lymphocytaire B chronique (Jahrsdorfer *et al.* 2008), les tumeurs solides (Lindner *et al.* 2013), les maladies auto-immunes (Hagn *et al.* 2010) et les infections (Kaltenmeier *et al.* 2015).

Depuis plusieurs années nous nous intéressons à une population de patients transplantés rénaux ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur pour différentes raisons (non observance du traitement, pathologies secondaires nécessitant un arrêt des traitement...). Ces patients, rares soient-ils, présentent une fonction satisfaisante de leur greffon des années après la greffe alors qu'ils ne prennent plus aucun traitement (Brouard *et al.* 2012). On parle de tolérance opérationnelle à leur greffon. Cette situation est à la fois extraordinaire et exceptionnelle et nous avons voulu en comprendre la physiopathologie et notamment les processus de régulation sous-jacents. Nous allons au travers de ce manuscrit rapporter comment nous avons montré que ces patients tolérants présentaient d'abord un profil transcriptionnel avec une forte empreinte lymphocytaire B (Brouard *et al.* 2007), puis un nombre plus élevé de lymphocytes B GZMB+ que les transplantés rénaux stables et les volontaires sains (Pallier *et al.* 2010), et que ces lymphocytes B GZMB+ étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Chesneau *et al.* 2015). Nous avons caractérisé ces lymphocytes B et avons pu établir un protocole d'expansion permettant d'induire l'expression de GZMB dans plus de 90% des lymphocytes B (Chesneau *et al.* 2020 ; Chesneau *et al.* 2021).

## LA TOLÉRANCE EN TRANSPLANTATION RÉNALE EST ASSOCIÉE À UNE FORTE SIGNATURE SANGUINE DE LYMPHOCYTES B

La survie à long terme des allogreffes nécessite généralement une immunosuppression à vie. Dans de rares cas, des patients présentent une "tolérance opérationnelle" spontanée avec une fonction stable de leur greffon en l'absence d'immunosuppression. L'absence de marqueurs biologiques de ce phénomène extraordinaire en clinique chez l'homme empêche d'identifier les patients potentiellement tolérants chez qui l'immunosuppression pourrait être réduite et entraver le développement de nouvelles stratégies d'induction de la tolérance. Notre premier objectif a donc été d'identifier des biomarqueurs sanguins peu invasifs de la tolérance opérationnelle et d'utiliser ces biomarqueurs pour déterminer la fréquence de cet état chez les patients traités avec une fonction stable de leur greffon. Les profils d'expression des gènes sanguins de 75 patients transplantés

rénaux (tolérance opérationnelle/rejet aigu et chronique/fonction stable du greffon sous immunosuppression) et de 16 individus sains ont été analysés. La comparaison des différents groupes de patients a permis d'identifier une "empreinte génique de tolérance" de 49 gènes. Ces biomarqueurs ont été testés pour la prédiction de la tolérance opérationnelle par microarray et PCR en temps réel dans des groupes de patients témoins indépendants. Trente-trois des 49 gènes ont correctement séparé les phénotypes de tolérance et de rejet chronique avec une spécificité de 99 % et 86 % (Figure 1).

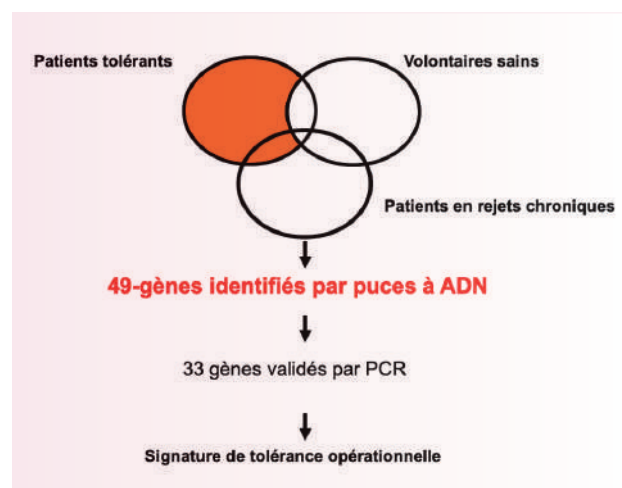


Figure 1 : Identification d'une signature de tolérance opérationnelle chez l'homme

Cette signature de la tolérance opérationnelle est composée d'un ensemble de gènes qui pourrait être utile comme outil de surveillance peu invasif pour guider le traitement des patients en adaptant les doses avec plus de précision, diminution des traitements chez les patients présentant une signature de tolérance, réajustement des traitements ou modification des protocoles thérapeutiques chez les patients ne présentant pas cette signature. Parmi ces gènes, nous avons noté une forte proportion de gènes associés aux cellules B et à leur fonction, tels que MS4A1, CD79A/B (Brouard *et al.* 2007). Cette première étude nous a donc poussé à étudier le compartiment lymphocytaire B de ces patients.

## LA TOLÉRANCE EN TRANSPLANTATION RÉNALE EST ASSOCIÉE À LA PRÉSENCE DE LYMPHOCYTES B AVEC UN PROFIL RÉGULATEUR

Nous avons ainsi comparé les caractéristiques des lymphocytes B périphériques des patients transplantés à celles d'autres patients dont la fonction du greffon était stable sous immunosuppression, à celles de patients souffrant de rejet chronique et à celles de volontaires sains. On a observé une augmentation significative du nombre absolu et de la fréquence des lymphocytes B chez les patients tolérants par rapport aux autres groupes de patients, corroborant ainsi leur profil transcriptionnel significativement enrichi en lymphocytes B de notre première étude

(Brouard *et al.* 2007). Les molécules costimulatrices et de migration (B7-2/CD80, CD40 et CD62L) étaient sur-exprimées dans les lymphocytes B, en particulier dans les cellules B CD19<sup>+</sup> IgD/CD38<sup>+</sup> /CD27<sup>+</sup> de ces patients. Cependant, ces cellules B purifiées répondent de façon normale à une stimulation polyclonale alors qu'elles présentent chez ces patients un profil plutôt inhibiteur (diminution du rapport FcγRIIA/FcγRIIB) ; un profil de régulation avec l'augmentation de l'expression de la molécule BANK1, qui module négativement l'activation des cellules B par la voie AKT et activées par le CD40 ; un nombre accru de cellules B exprimant le CD1d et le CD5. Enfin, les lymphocytes B de ces mêmes patients présentent une augmentation du rapport BAFF-R/BAFF qui pourrait expliquer leur nombre plus important dans cellules B périphériques. Ainsi, ces résultats montrent que les patients tolérants présentent un phénotype particulier de leurs lymphocytes B circulants qui pourrait contribuer au maintien de la fonction du greffon à long terme (Pallier *et al.* 2010). La prochaine étape de notre travail a

donc été d'explorer le profil régulateur de ces lymphocytes B.

## LA TOLÉRANCE EN TRANSPLANTATION RÉNALE EST ASSOCIÉE À UN NOMBRE PLUS IMPORTANT DE LYMPHOCYTES B PÉRIPHÉRIQUES CAPABLES DE CONTRÔLER LA PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS CIRCULANTS

Nous avons étudié le rôle des lymphocytes B sur la suppression des lymphocytes T de patients tolérants, de volontaires sains et de patients avec une fonction stable du greffon sous immuno-suppression. Nous avons analysé leur effet sur la prolifération, l'apoptose et la production en cytokines pro-inflammatoires des lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> après stimulation par anti-CD3/anti-CD28 (Figure 2).

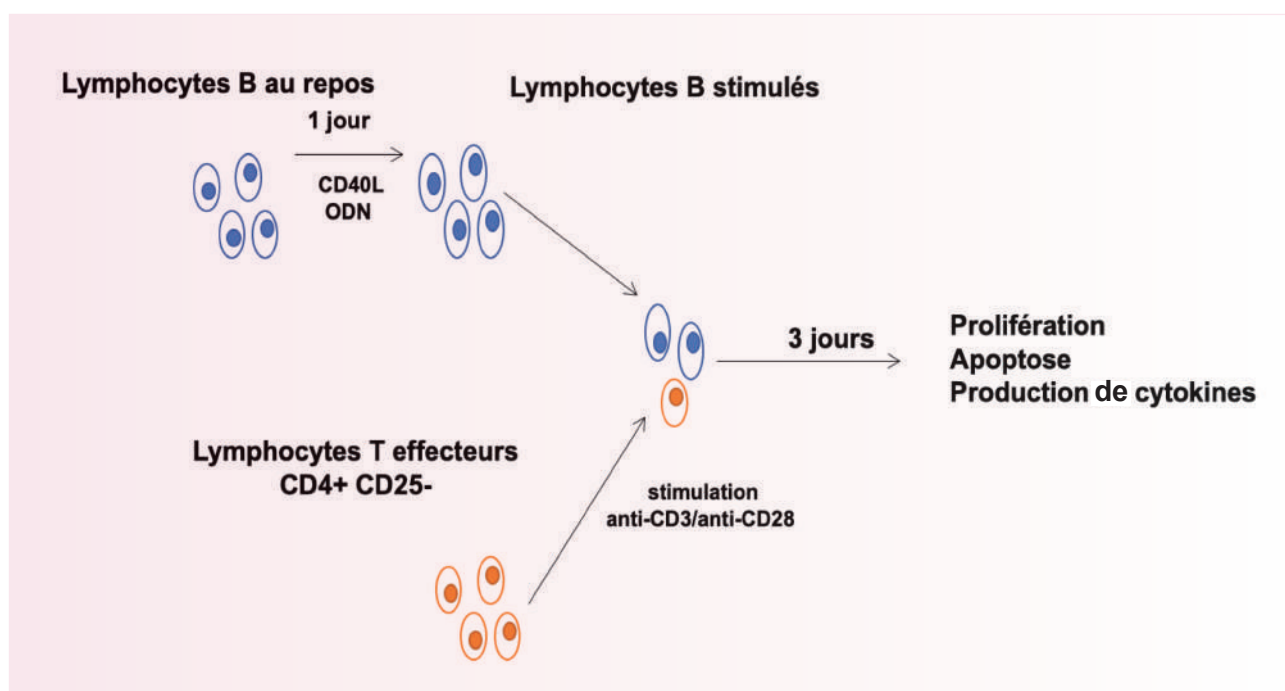


Figure 2 : Modèle d'étude de l'activité suppressive des lymphocytes B in vitro

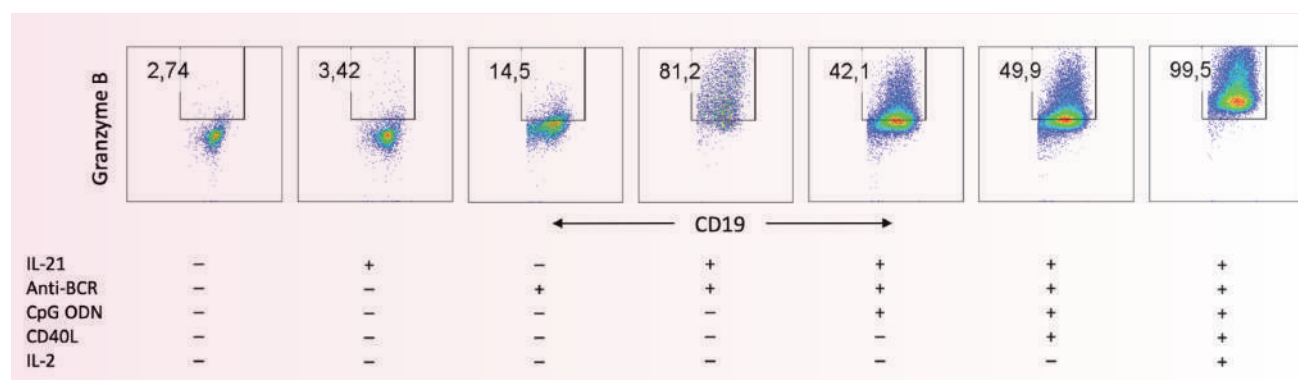
Nous avons montré que les lymphocytes B inhibaient la réponse des cellules T effectrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de manière dose-dépendante. Cet effet est dépendant de l'interaction entre le lymphocyte B et sa cible et passe par un mécanisme dépendant de la molécule du GZMB. Les patients tolérants présentent un nombre plus élevé de ces lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> circulants. La fréquence de ces lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> dépend de la production d'IL-21, avec la mise en place d'une boucle de rétroaction permettant d'éviter l'activation excessive de ces lymphocytes B aux fonctions régulatrices et permettant ainsi de contrôler leur régulation en cas de réaction immune (Chesneau *et al.* 2015).

## CES LYMPHOCYTES B RÉGULATEURS GZMB<sup>+</sup> PEUVENT ÊTRE PRODUITS *EX VIVO* LAISSANT ENVISAGER DE FUTURES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

Ces lymphocytes B exprimant le GZMB constituent donc une population importante dans la régulation du système immunitaire. Nous avons montré que ces cellules n'étaient pas seulement présentes dans des situations pathologiques mais également chez le volontaire sain ou elles exercent également

leur fonction de régulation homéostatique. Leur nombre reste néanmoins de quelques pourcents des lymphocytes B circulants en situation physiologique. Notre objectif a donc été de mieux caractériser cette population de lymphocytes B régulateurs mais également d'établir un protocole permettant d'induire efficace-

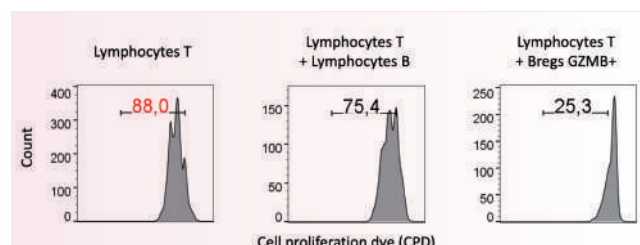
ment leur expansion *ex vivo*. En utilisant un cocktail contenant de l'IL-21, de l'anti-BCR, de l'oligonucléotide CpG, du CD40L et de l'IL-2, nous avons pu expandre ces lymphocytes B pour obtenir plus de 90% de cellules B GZMB<sup>+</sup> après 3 jours de culture (Chesneau *et al.* 2020) (Figure 3).



**Figure 3 :** Méthode d'expansion *in vitro* de lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B (Bregs GZMB<sup>+</sup>). Les lymphocytes B humains sont isolés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) par une sélection négative à l'aide de billes magnétiques, mis en culture pendant 3 jours avec ou sans des combinaisons de réactifs comme indiqués et analysés par cytométrie en flux. La combinaison de 5 réactifs permet une expansion à 99% des Bregs GZMB<sup>+</sup>. IL-21 : interleukin-21 ; anti-BCR : anti-B cell receptor (anti-IgM, IgG, IgA) ; CpG ODN : CpG oligonucleotide ; CD40L : CD40 ligand ; IL-2: interleukin-2. Les chiffres indiquent les pourcentages de lymphocytes B exprimant le granzyme B.

Les lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> obtenus par ce protocole gardent leurs propriétés régulatrices sur la prolifération des lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> autologues et allogéniques (Figure 4).

était enrichi en sous-populations de cellules B CD307b<sup>hi</sup>, CD258<sup>hi</sup>CD72<sup>hi</sup> et CD21<sup>lo</sup>PD-1<sup>hi</sup> (Chesneau *et al.* 2021).



**Figure 4 :** Les lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B (Bregs GZMB<sup>+</sup>) inhibent la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les lymphocytes T effecteurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) humain sont mis en culture seul, avec les lymphocytes B ou avec les Bregs comme décrit dans la figure 2. GZMB<sup>+</sup> qui ont été expandus au préalable par un cocktail de 5 réactifs : IL-21, anti-BCR, CpG ODN, CD40L et IL-2. L'image représentative de cytométrie en flux après 3 jours de co-culture montre l'effet inhibiteur des Bregs GZMB<sup>+</sup> sur la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les chiffres indiquent les pourcentages de prolifération de lymphocytes T effecteurs.

Nous avons montré que la molécule du GZMB produite par les lymphocytes B favorisait leur propre prolifération de manière dépendante de la molécule ERK1/2. Ces lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> sont par ailleurs plus sensibles à l'apoptose induite par une stimulation prolongée, permettant ainsi d'établir un mécanisme de rétrocontrôle négative pour limiter leur expansion. Enfin, nous avons mieux caractérisé ces lymphocytes B régulateurs et avons montré que ce profil phénotypique

## DISCUSSION & CONCLUSION

Au travers de ces travaux, nous avons essayé d'apporter un nouvel éclairage sur la biologie des lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> et avons établi une méthode efficace pour les expandre, en vue de futures applications en thérapie cellulaire.

Nous essayons maintenant, sur la base de nos travaux *in vitro*, d'envisager un mécanisme d'action pour ces lymphocytes B régulateur GZMB<sup>+</sup> *in vivo*. En présence de différents signaux présents au cours d'une infection ou d'une inflammation, protéines et ADN bactériens ou viraux stimulateurs du BCR et du TLR-9, cytokines inflammatoires, IL-21, IL-2, signaux de costimulation des lymphocytes T, CD40L, une partie des lymphocytes B expriment le GZMB, GZMB qui à son tour stimule directement la prolifération de ces lymphocytes B par un mécanisme ERK-dépendant. Les lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> régulent l'inflammation en prévenant la prolifération des cellules T effectrices par une voie dépendante de GZMB, de ERK et d'un contact entre la cellule et sa cible. Cependant, les lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> sont plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes B n'exprimant pas le GZMB, ce qui permet d'en contrôler le nombre et en éviter la prolifération incontrôlée permettant le retour à une situation « physiologique » une fois la phase d'inflammation contrôlée.

Nous avons trouvé le moyen de multiplier *ex vivo* ces cellules. Bien sûr, leur durée de vie relativement courte peut constituer un défi lorsqu'on envisage leur utilisation en thérapie cellulaire. Néanmoins, nous sommes convaincus que cette « thérapie à

courte durée de vie » pourrait être appropriée pour des pathologies telles que le rejet aigu d'allogreffe ou l'exacerbation de maladies auto-immunes dans lesquelles une intervention limitée est préférable pour éviter une sur-immunosuppression prolongée.

## REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble de mes collègues de l'équipe DORIt du CR2TI et l'équipe du CRB de Nantes qui ont permis par leur travail de contribuer à ce petit bout d'histoire.

## CONFLITS D'INTÉRÊTS

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt commercial ou financier.

## BIBLIOGRAPHIE

- Brouard S, Mansfield E, Li L, Hsieh S, Dupont A, Zhang M *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel for diagnosis and prediction of operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 25;104(39):15448-53.
- Brouard S, Pallier A, Renaudin K, Foucher Y, Danger R, Devys A *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant.* 2012; 12(12):3296-3307.
- Chesneau M, Le Mai H, Brouard S. New Method for the expansion of highly purified human regulatory granzyme B-expressing B Cells. *Methods Mol Biol.* 2021; 2270: 203-216.
- Chesneau M, Mai HL, Danger R, Le Bot S, Nguyen TV, Bernard J *et al.* Efficient expansion of human granzyme B-expressing B cells with potent regulatory properties. *J Immunol.* 2020; 205(9): 2391-2401.
- Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A *et al.* Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(10): 2588-98.
- Crawford A, Macleod M, Schumacher T, Corlett L, Gray D. Primary T cell expansion and differentiation *in vivo* requires antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 3498-3506.
- Floudas A, Amu S, Fallon PG. New insights into IL-10 dependent and IL-10 independent mechanisms of regulatory B cell immune suppression. *J. Clin. Immunol.* 2016; 36 (Suppl. 1): 25-33.
- Hagn M, Ebel V, Sontheimer K, Schweisinger E, Lunov O, Beyer T *et al.* CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 2060-2069.
- Hampe CS. B cell in autoimmune diseases. *Scientifica (Cairo):* 2012; 215308.
- Jahrsdorfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, Huang J, Andreski MW, Jacobus LS *et al.* B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood.* 2006;108: 2712-2719.
- Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, Lindner S, Trzaska T, van der Merwe JA *et al.* CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the *in vivo* development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J. Immunol.* 2015; 194: 3768-3777.
- Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TFE *et al.* Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013; 73: 2468-2479.
- Martin F & Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 467-496.
- Mauri C & Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 2017; 127: 772-779.
- Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé 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 Brouard. *Kidney Int.* 2010; 78 (5): 503-13.
- Parker Harp CR, Archambault AS, Sim J, Ferris ST, Mikesell RJ, Koni PA *et al.* B cell antigen presentation is sufficient to drive neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2015; 194: 5077-5084.
- Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015; 42: 607-612.
- Wasik M, Nazimek K, Bryniarski K. Regulatory B cell phenotype and mechanism of action: the impact of stimulating conditions. *Microbiol. Immunol.* 2018; 62: 485-496.