UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Alexis CHENOUARD

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*
Spécialité : *Immunologie*
Unité de recherche : *INSERM UMR 1064*

Soutenue le *9 novembre 2016*

Analyse des lymphocytes T folliculaires helper chez les patients tolérant leur greffon rénal

JURY

Rapporteurs :	**Flora ZAVALA**, DR, CNRS, Institut Necker, Paris **Nuala MOONEY**, DR, Inserm U1160, Paris
Examinateur :	**Karim ASEHNOUNE**, PU-PH, EA3826, Nantes
Invitée :	**Béatrice CHARREAU,** Docteur, Inserm U1064, Nantes
Directeur de Thèse :	**Sophie BROUARD**, DR, Inserm UMR 1064, Nantes
Président du jury :	**Karim ASEHNOUNE**, PU-PH, EA3826, Nantes

Je remercie chaleureusement ma directrice Sophie Brouard, pour son intérêt et son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse. Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe 4 de l'UMR 1064, en particulier Mélanie Chesneau et Richard Danger, ainsi que l'ensemble des membres de l'ITUN qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à ce travail.

Un grand merci également à mes collègues de réanimation pédiatrique du CHU de Nantes, qui m'ont permis de me libérer des soins afin de me consacrer pleinement à l'élaboration de cette thèse.

Mes derniers remerciements s'adressent à ma femme Emma, pour m'avoir soutenu avec amour durant ces 3 années, et qui pour mon plus grand bonheur partage ma vie et forme avec Augustin, Camille et Joseph, mon cocon familial.

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS 5
LISTE DES FIGURES 6
INTRODUCTION 7
1) L'insuffisance rénale chronique terminale : état des lieux 7
2) La transplantation rénale : traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale 7
3) Le rejet de greffe : un problème toujours d'actualité 9
a) Le rejet cellulaire médié par les lymphocytes T 9
b) Le rejet humoral médié par les anticorps 9
4) Traitement anti-rejet : la lutte contre les 3 signaux de la réponse allo-immune 10
5) Importance de minimiser les effets secondaires des immunosuppresseurs : comment faire ? 13
a) Les protocoles de sevrage des immunosuppresseurs : pas encore efficaces 13
b) Les protocoles de tolérance induite en transplantation rénale : faisables mais non applicables en routine 14
c) La tolérance spontanée ou « opérationnelle » rénale : une piste à creuser 15
6) Mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance opérationnelle : un rôle pour les lymphocytes B ? 17
7) Les lymphocytes T folliculaires helper (TFH) 18
a) Origine et différenciation des TFH 18
b) Fonction « B helper » des TFH 19
c) Mécanisme de régulation dans les centres germinatifs : rôle des LT folliculaires régulateurs (TFR) 21
d) TFH circulants 21
e) Rôle des TFH en pathologie humaine 22
f) TFH et pathologie : qu'en est-il en transplantation ? 24
PARTIE 1 27
1) Objectifs et présentation du travail 27
2) Article 1 : en cours de révision dans *American Journal of Transplantation* 29
3) Discussion 69
a) Défaut quantitatif et qualitatif des TFHc chez les patients tolérants 69

b) Rôle des TFHc dans le processus de tolérance opérationnelle : une autre pierre à l'édifice dans la balance tolérogène 73
c) Les TFHc : rôle prédictif dans l'apparition des DSA ? 74
4) Perspectives 78
a) Analyser l'interaction entre les différentes populations cellulaires 78
b) Identifier les TFH dans le greffon 78
c) Confirmer le rôle prédictif des TFHc dans l'apparition des DSA 80
PARTIE 2 82
1) Objectifs et présentation du travail 82
2) Méthodes 83
a) RNA-Seq 83
b) Analyse statistique 83
3) Résultats 85
a) Préparation des données 85
b) Analyse multidimensionnelle 86
c) Sélection des gènes d'intérêt 89
4) Discussion et perspectives 94
REFERENCES 98
ANNEXE : article publié dans *Molecular Immunology* 105

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP : Analyse en composante principale

CD : Cluster de différenciation

CG : Centre germinatif

CNI (Calcineurin Inhibitor) : Inhibiteur de calcineurine

DSA : Anticorps anti-donneur spécifique

HLA : Human Leucocyte Antigen

HV (Healthy volunteer) : Volontaire sain

IL : Interleukine

IRCT : Insuffisance rénale chronique terminale

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LTreg : Lymphocyte T régulateur

PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) : Cellule sanguine périphérique mononuclée

PLS-DA : Partial-least-squares discriminant analysis

PTLD (Post transplantation lymphoproliferative disease) : Syndrome lymphoproliferatif post-greffe

RNA Seq (RNA Sequencing) : Séquençage de l'ARN

STA : Patient transplanté avec une fonction du greffon stable sous immunosuppresseurs

SEB (endotoxin-reduced Staphylococcal Enterotoxin B) : Entérotoxine B staphylococcique

TC : Traumatisme crânien

TCR (T Cell Receptor) : Récepteur des lymphocytes T

TFH : Lymphocyte T folliculaire helper

TFHc : Lymphocyte T Folliculaire helper circulant

TFR : Lymphocyte T folliculaire régulateur

TOL : Patient opérationnellement tolérant

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Survie globale du greffon (1993-2013) 8

Figure 2: Les 3 signaux de la réponse allo-immune. D'après [9] 11

Figure 3: Les différentes classes d'immunosuppresseurs et leurs sites d'action. D'après [9] 12

Figure 4: Différentes voies de différenciation des LT CD4$^+$ naïfs. 19

Figure 5: Coopération TFH-B permettant la différenciation des LB. D'après [55] 20

Figure 6: Histoire naturelle de l'apparition des DSA *de novo* aboutissant à la perte du greffon. 76

Figure 7: Mise en évidence des TFH par immunofluorescence dans une biopsie de patient transplanté rénal présentant un rejet humoral. 79

Figure 8: Pourcentage de valeurs nulles par groupe sur l'ensemble des gènes. 85

Figure 9: Représentation des patients dans l'ACP 87

Figure 10: Représentation des patients dans la sparse PLS-DA. 88

Figure 11: Diagramme de Venn illustrant les gènes différentiellement exprimés entre les 3 groupes issus de la sparse PLS-DA. 89

Figure 12: Stratégie de sélection des gènes d'intérêt basée sur une recherche bibliographique. 91

Figure 13: Expression de 4 molécules d'intérêt en cytométrie de flux par les LT CD4$^+$ de volontaires sains : CCNT1 (A), DUSP16 (B), DDX58 (C) et NFKBIZ (D). 96

INTRODUCTION

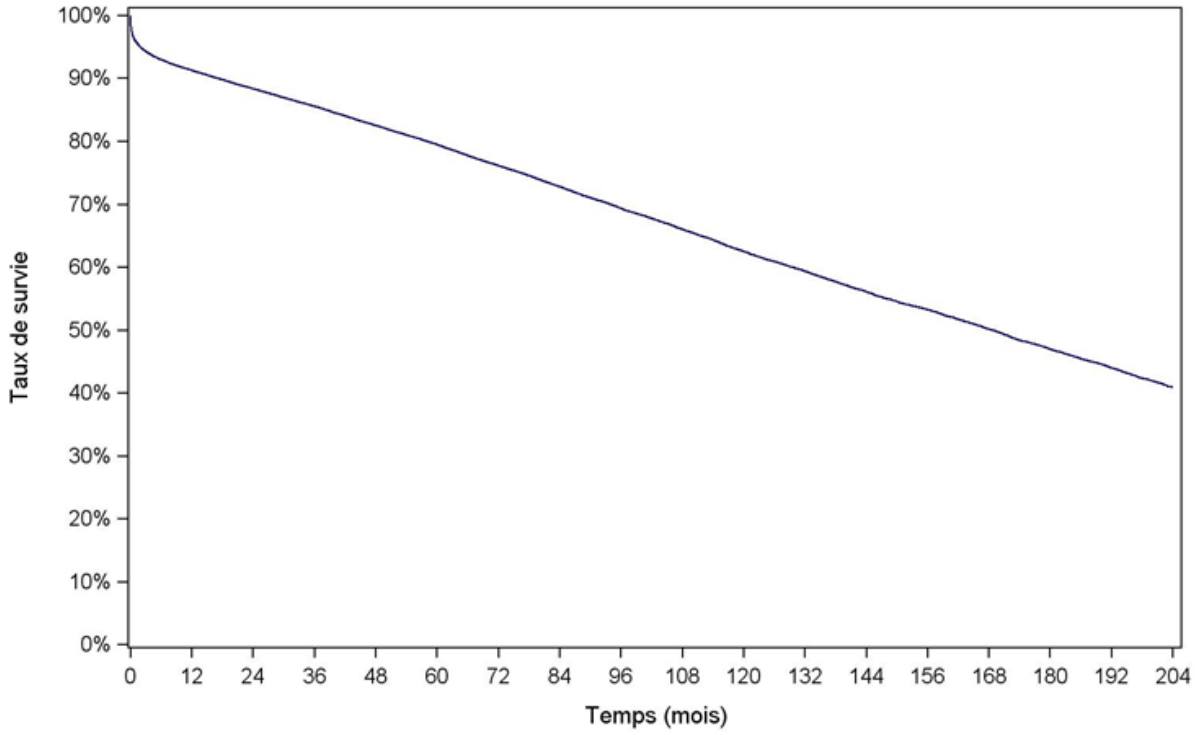
1) L'insuffisance rénale chronique terminale : état des lieux

L'insuffisance rénale chronique correspond à une dégradation progressive de la fonction de filtration des reins, pouvant évoluer vers un stade terminal (IRCT). En 2014, l'incidence globale de l'IRCT en France était de 163 par million d'habitants. Les 2 principales causes sont l'hypertension artérielle et le diabète, qui entrainent des lésions vasculaires altérant la fonction des reins. Toutefois, l'IRCT est de cause inconnue dans 15% des cas [1]. L'évolution de l'insuffisance rénale chronique vers le stade terminale est plus ou moins rapide selon le patient et la pathologie responsable. Même si il existe des moyens thérapeutiques pour ralentir la progression vers l'IRCT [2], un traitement de suppléance peut être nécessaire pour pallier au défaut fonctionnel des reins. Il s'agit de l'épuration extra-rénale par dialyse (hémodialyse ou dialyse péritonéale) ou de la transplantation rénale.

2) La transplantation rénale : traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale

La transplantation rénale est indiscutablement le traitement de choix en cas d'IRCT, puisque cela apporte au patient non seulement une meilleure qualité de vie [3], mais aussi une prolongation de survie comparé à la dialyse chronique [4]. En France, près de 3500 greffes rénales sont réalisées chaque année, soit à partir de donneurs décédés, soit à partir de donneurs vivants (environ 15%), et à ce jour, près des deux tiers des patients transplantés

possèdent un greffon fonctionnel après 10 ans de greffe (Figure 1) (rapport annuel de l'Agence de Biomédecine [1]).



Période de greffe	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
1993-2013	48829	95,9% [95,7% - 96,1%]	91,3% [91,0% - 91,5%]	79,5% [79,1% - 79,9%]	62,5% [61,9% - 63,0%]	46,9% [46,2% - 47,6%]	168,6 [166,3 - 171,0]
nombre de sujets à risque*		46457	42631	27343	12524	4485	

[] : Intervalle de confiance
NO : non observable
* : Nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun évènement n'est survenu

Figure 1: Survie globale du greffon (1993-2013)

3) Le rejet de greffe : un problème toujours d'actualité

Bien que de nombreux progrès aient été réalisés dans le domaine de la transplantation et de l'immunologie, le phénomène de rejet reste un obstacle majeur au succès de la greffe. La traduction clinique du rejet est très polymorphe en fonction de la chronologie par rapport à la transplantation (hyper-aigu, aigu, tardif, chronique), mais aussi en fonction du retentissement fonctionnel sur le greffon (clinique versus infra-clinique). Seule la biopsie du greffon affirme le diagnostic de rejet, défini à l'heure actuelle grâce à des critères histologiques détaillés dans la classification de Banff qui est mise à jour tous les 2 ans [5]. Schématiquement, le rejet peut être principalement cellulaire, humoral ou mixte.

a) Le rejet cellulaire médié par les lymphocytes T

Le rejet médié par les lymphocytes T (LT) ou rejet cellulaire est défini par la présence d'un infiltrat cellulaire mononuclée comprenant des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ dans l'interstitium rénal et dans les tubules rénaux. Cet envahissement cellulaire peut aboutir à une fibrose interstitielle et à une atrophie progressive des tubules, responsable d'une dysfonction du greffon. Les corticoïdes sont le plus souvent utilisés dans ce type de rejet [6].

b) Le rejet humoral médié par les anticorps

Historiquement, la présence d'anticorps anti-donneur était responsable du rejet hyper-aigu, survenant dans les heures suivant la transplantation, et aboutissant à une thrombose artérielle et à une nécrose du greffon. Ce rejet hyper-aigu a actuellement disparu grâce à la

généralisation du test du cross-match lymphocytaire avant la greffe, qui consiste à détecter ces anticorps anti-donneur préformés dans le sérum du receveur [7]. Cependant, les allo-anticorps peuvent apparaitre *de novo* après la greffe. Ces anticorps anti-HLA spécifiques du donneur ou DSA (Donor Specific Antibody) se fixent sur les cellules endothéliales et entrainent une inflammation de la microcirculation par l'activation de la voie du complément avec notamment la production de la fraction C4d. Dans la classification de Banff [5], le rejet humoral est actuellement défini par une dysfonction du greffon en présence :

- d'un infiltrat inflammatoire de neutrophiles et monocytes/macrophages dans les glomérules et/ou les capillaires péri-tubulaires ;
- de C4d dans les capillaires péri-tubulaires ;
- d'un anticorps spécifique du donneur (DSA) dans le sang.

Pour ce type de rejet, il est courant d'utiliser des stratégies visant à éliminer ou inhiber les anticorps (immunoglobulines polyvalentes, échanges plasmatiques), ou à bloquer leur production par les LB grâce à un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) [8].

4) Traitement anti-rejet : la lutte contre les 3 signaux de la réponse allo-immune

La prévention du rejet et/ou le traitement curatif d'un rejet repose sur une association de traitements immunosuppresseurs, qui vise à atténuer au maximum la réponse allogénique. Cette réponse allo-immune nécessite 3 signaux d'activation (Figure 2). Le premier signal est enclenché après la reconnaissance de l'allo-antigène par le récepteur TCR du LT naïf. Cette

reconnaissance entraine notamment la mise en jeu d'une protéine phosphatase (calcineurine) qui active certains facteurs de transcription induisant l'expression de CD40 ligand (CD40L) et de l'IL-2. Le second signal dépend de l'interaction CD40-CD40L et CD28/CD80-86 qui induit l'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (IL-2R). Enfin, la liaison IL-2/IL-2R correspond au 3ème signal responsable de la prolifération et de la survie des LT, ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines qui permettent aux LT de rejoindre l'organe cible [9].

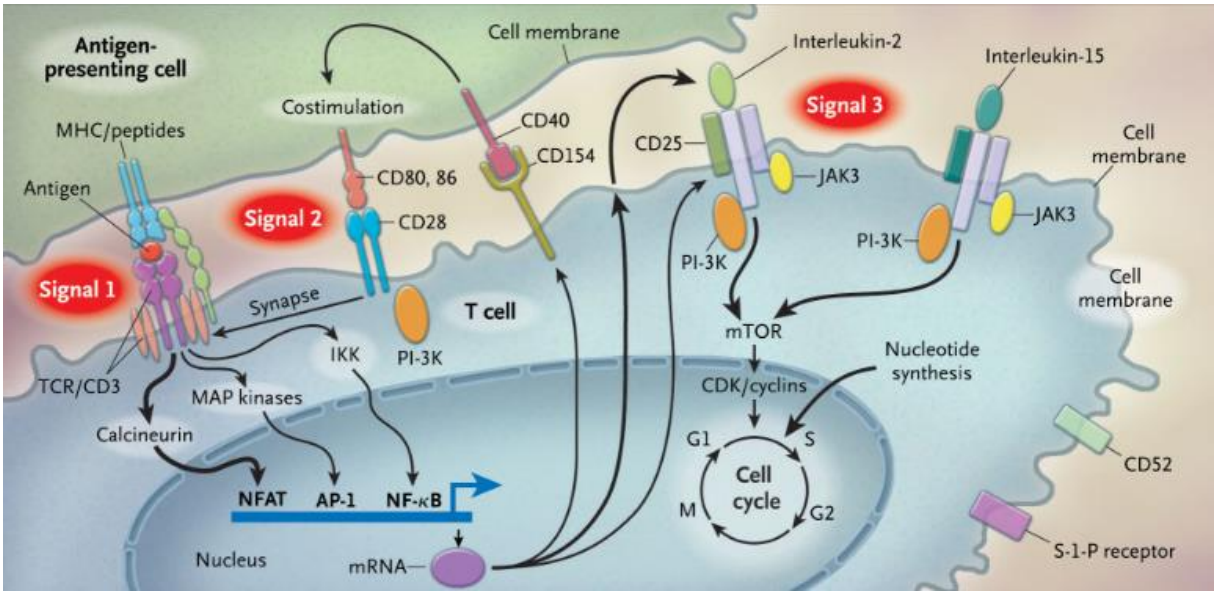


Figure 2: Les 3 signaux de la réponse allo-immune. D'après [9]

Il existe donc plusieurs stratégies médicamenteuses pour lutter contre cette réponse: les corticostéroïdes, les immunoglobulines polyvalentes, les anticorps déplétants ou non, et les molécules chimiques. Ces 2 dernières classes sont résumées dans la Figure 3. Les schémas thérapeutiques sont extrêmement divers et varient en fonction des caractéristiques du receveur (âge, état d'immunisation), mais aussi en fonction des habitudes des équipes de transplantation.

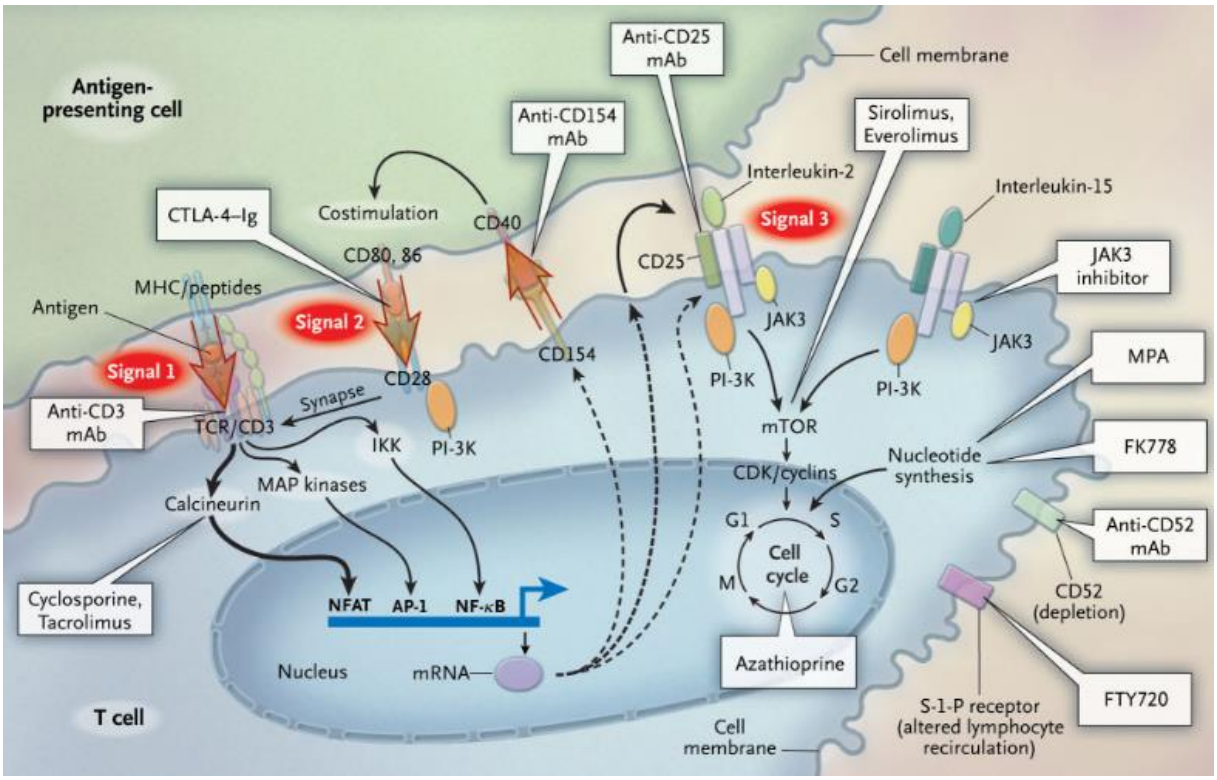


Figure 3: Les différentes classes d'immunosuppresseurs et leurs sites d'action. D'après [9]

Les progrès réalisés depuis plusieurs décennies notamment avec l'introduction des inhibiteurs de la calcineurine (CNI ; i.e. Tacrolimus et ciclosporine), ont grandement contribué à améliorer la survie du greffon. Cependant, ces différents traitements ont des effets secondaires pouvant être extrêmement graves, avec notamment un risque accru de cancers, d'infections opportunistes, et de toxicité sur le greffon [9-12]. Aussi, ces traitements ne

préviennent pas la dysfonction chronique du greffon, qui est actuellement un des problèmes majeurs en transplantation. Cette dysfonction chronique du greffon tient à des mécanismes immunologiques mais aussi à des mécanismes non immunologiques, indépendants de la stimulation allogénique (lésions d'ischémie-reperfusion, hypertension artérielle, dyslipidémie, infection à cytomégalovirus, néphrotoxicité des CNI). Ainsi, il apparait à l'heure actuelle important d'envisager des stratégies visant à minimiser au maximum les effets délétères des immunosuppresseurs.

5) Importance de minimiser les effets secondaires des immunosuppresseurs : comment faire ?

a) Les protocoles de sevrage des immunosuppresseurs : pas encore efficaces

Considérant l'importance des effets néphrotoxiques des CNI, plusieurs équipes ont tenté de mettre en place des protocoles de diminution et/ou d'arrêt de ces traitements en post-greffe [13-16]. Dans une méta-analyse récente, Sawinski et al. ont comparé quatre stratégies visant à réduire la toxicité des CNI : 1) la minimisation des CNI, qui consiste à réduire la posologie soit rapidement après la greffe, soit après l'apparition d'effets secondaires ; 2) la conversion, c'est-à-dire la réduction de la posologie jusqu'au remplacement par un autre traitement immunosuppresseurs ; 3) le sevrage progressif des CNI ; 4) le remplacement par un autre traitement immédiatement après la greffe. Les auteurs rapportent que seule la stratégie visant à minimiser les doses de CNI, tout en associant d'autres classes

thérapeutiques, permet d'améliorer la fonction rénale et de réduire les effets secondaires des CNI [17]. Cependant, cette méta-analyse repose sur des études comportant des stratégies thérapeutiques basées sur la ciclosporine, malgré le fait que la plupart des équipes préconisent d'utiliser en première intention le tacrolimus comme inhibiteur de calcineurine (Organ Procurement and Transplantation Network, Annual Report [18]). Il est donc nécessaire de poursuivre les études pour clarifier les avantages de ces stratégies. D'autres médicaments comme le Belatacept, qui possède un mode d'action différent des CNI, pourrait apporter une alternative intéressante pour minimiser les effets secondaires des CNI. Vincenti et al. ont ainsi démontré que les patients traités par Belatacept avaient une meilleur survie et une meilleur fonction de leur greffon à 7 ans post-transplantation comparés à ceux traités par ciclosporine [19].

b) Les protocoles de tolérance induite en transplantation rénale : faisables mais non applicables en routine

Ces protocoles d'induction de tolérance se basent sur l'association d'une greffe rénale et d'une greffe de cellules hématopoïétiques provenant d'un même donneur, afin d'obtenir un chimérisme, c'est-à-dire une coexistence des cellules du patient avec le greffon du donneur. Plusieurs équipes travaillent sur ces protocoles qui sont résumés dans le tableau 1 : les groupes de Stanford [20-24], Northwestern [25-27] et Massachusetts [28-30]. Bien que prometteurs, ces protocoles d'induction de tolérance comportent des risques et ne sont pas encore applicables en routine.

	Groupe de Stanforf (Millan et al., 2002; Scandling et al., 2008; Scandling et al., 2012; Scandling et al., 2011; Scandling et al., 2015)	Université de Northwestern (Leventhal et al., 2012; Leventhal et al., 2013; Yolcu et al., 2015)	Hôpital de Massachusetts (Kawai et al., 2008; Kawai et al., 2014; Kawai et al., 2013)
Nombre de patients	38	15	10
Type de greffe	Rein donneur vivant et cellules hématopoïétiques moelle osseuse CD34+ avec des lymphocytes T CD3+	Rein donneur vivant et cellules souches hématopoïétiques	Rein donneur vivant et greffe de moelle osseuse
HLA compatibilité	Greffe HLA non identique (n=6), HLA identique (n=22), HLA haplo identique (n=10)	Greffe HLA non identique	Greffe HLA haplo identique
Conditionnement	irradiation lymphoïde totale et sérum anti-lymphocytaire	fludarabine, cyclophosphamide et irradiation lymphoïde totale	cyclophosphamide, anticorps monoclonale anti CD2, ciclosporine, irradiation thymique (+ rituximab dans un 2ème temps)
Entretien	corticoïde, cellcept, ciclosporine	cellcept, tacrolimus	ciclosporine (+ corticoïde dans un 2ème temps)
Tolérance induite	16/22 des HLA identiques	6/15	7/10
Durée tolérance	2-66 mois	22 mois	> 4 ans

Tableau 1: Différents protocoles d'induction de tolérance en transplantation rénale

c) La tolérance spontanée ou « opérationnelle » rénale : une piste à creuser

Dans de rare cas, certains patients transplantés rénaux conservent une fonction correcte de leur greffon pendant plusieurs années et ce, en l'absence de traitement immunosuppresseurs. On parle alors de tolérance opérationnelle, définie par des critères fonctionnels : créatinémie inférieure à 150 µmol/L et protéinurie < 1g/jour en l'absence d'immunosuppresseurs pendant plus d'un an [31]. A ce jour, moins d'une centaine de patients ont pu être recensés comme étant tolérant après une greffe rénale [31-35]. D'après une étude européenne incluant une soixantaine de patients tolérants (TOL), l'incidence cumulée est

estimée à 3 cas pour 10 000 transplantés rénaux [35]. Ces patients ont arrêté leur traitement immunosuppresseurs soit par non-observance dans la grande majorité des cas, soit au décours d'une complication grave des immunosuppresseurs (e.g. syndrome lymphoprolifératif post-greffe). Peu de différences cliniques et démographiques au moment de la greffe sont observées entre les patients TOL et les patients sous immunosuppresseurs. Seul le traitement d'induction a été mis en évidence dans l'étude descriptive de Brouard et al., avec une proportion plus faible de patients TOL ayant reçu un traitement d'induction au moment de la greffe comparée à celle observée chez les patients avec une fonction stable sous immunosuppresseurs (STA) [32]. Il est intéressant de noter que la durée de tolérance est extrêmement variable, allant de quelques années à plus de 20 ans [32,35]. Pendant cette période, les patients TOL ne présentent pas plus d'infections opportunistes et ont une réponse immune adaptée après une vaccination anti-grippale [31,36]. Cette absence de déficit immunitaire global traduit un phénomène tolérogène probablement actif et spécifique. Cependant, il semble que l'immunisation en post-greffe par les anticorps DSA soit moindre chez les TOL comparée à celle observée chez les patients STA [32].

L'existence de ces rares patients TOL a incité certaines équipes à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce « paradoxe » immunologique. De plus, cette population apparait comme une population de choix pour l'identification de biomarqueurs de la survie du greffon [33,34,37,38], ce qui pourrait permettre par exemple de mieux cibler les patients dans le cadre de protocole de sevrage des immunosuppresseurs [39].

6) Mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance opérationnelle : un rôle pour les lymphocytes B ?

Les premiers travaux réalisés ont consisté à caractériser les différents compartiments cellulaires dans le sang des patients TOL [40,41]. Dans l'étude de Louis et al. en 2006, les patients TOL présentaient plus de LB dans le sang que les autres patients transplantés [41]. Cette observation a été renforcée par une analyse transcriptomique réalisée à partir de cellules mononuclées sanguines qui a mis en évidence une signature de 49 gènes fortement associée à l'état de tolérance opérationnelle, dont 7 étaient directement liés aux LB [37]. Plusieurs travaux ont confirmés par la suite l'augmentation du nombre de LB chez les patients TOL, avec notamment la présence de LB régulateurs exprimant des molécules pro-tolérogènes (IL-10, TGF-β, granzyme B) [33,34,42-45]. Aussi, il a été décrit récemment chez les patients TOL un défaut de différenciation des LB en plasmocytes [44]. Dans cette étude, les auteurs ont rapporté une diminution du nombre de plasmocytes sanguins chez les TOL comparés aux patients STA. Aussi, grâce à un modèle de différenciation in vitro des LB, ils ont pu mettre en évidence une down-régulation de certains gènes impliqués dans la différenciation tardive des LB chez les TOL et une capacité des plasmocytes des TOL à rentrer plus vite et plus fortement en apoptose. Nous avons également évoqué précédemment que l'immunisation post-greffe par les DSA, qui sont produit par les plasmocytes, semble moins importante chez les patients TOL [32].

Ainsi, nous nous sommes intéressés de plus près aux lymphocytes T folliculaires helper (TFH) chez les patients TOL, connus comme étant des cellules indispensables à la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

7) Les lymphocytes T folliculaires helper (TFH)

a) Origine et différenciation des TFH

Les TFH ont été décrit initialement dans les amygdales, avec la mise en évidence d'une population de LT CD4$^+$ exprimant fortement le récepteur de chimiokine CXCR5 [46,47]. La différenciation de certains LT CD4$^+$ naïfs en TFH est un processus complexe qui présente des différences notables entre l'Homme et les modèles murins [48].

Au cours d'une réponse immune, les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes vont pouvoir rencontrer des LT CD4$^+$ naïfs dans la zone T des organes lymphoïdes. Cette interaction induit une augmentation d'expression du récepteur CXCR5 et une diminution d'expression du récepteur CCR7 sur les LT CD4$^+$, qui reconnaissent respectivement la chimiokine CXCL13 et les chimiokines CCL19 et CCL20. Ces gradients de chimiokines permettent aux LT CD4$^+$ de migrer vers la zone T-B des organes lymphoïdes, devenant ainsi des pré-TFH. Le facteur de transcription Bcl-6 est indispensable dans cette première étape de différenciation des LT CD4$^+$ [49-51], mais d'autres semblent nécessaires, tels que Maf, IRF4, AP-1, Batf, STAT3, STAT4 et Ascl2 [48]. Aussi, le microenvironnement est capital pour la différenciation en TFH, avec plusieurs cytokines impliquées chez l'Homme comme l'IL-21, le TGF-β, l'IL-12 et l'IL-23 [48,52] (Figure 4).

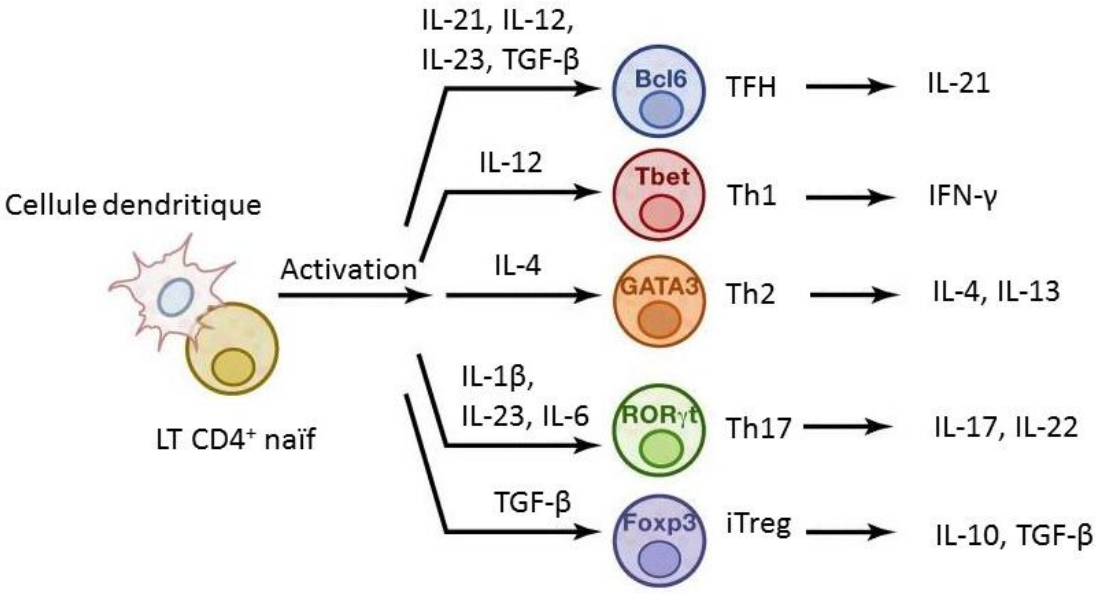


Figure 4: Différentes voies de différenciation des LT CD4⁺ naïfs.

Après le premier contact antigénique via la cellule dendritique et selon le microenvironnement cytokinique, les LT CD4⁺ naïfs peuvent se différencier en plusieurs lymphocytes T auxiliaires caractérisés par leur facteur de transcription et leur production de cytokines. Adapté de [48].

b) Fonction « B helper » des TFH

Les pré-TFH peuvent interagir avec les LB au niveau de la frontière T-B des organes lymphoïdes. Certains pré-TFH aident les LB à se différencier en plasmocytes de courte durée de vie produisant la première vague d'anticorps spécifiques, d'autres en revanche migrent dans la zone B du follicule pour former le centre germinatif, devenant à ce moment des TFH. Les TFH sont donc indispensables pour la formation des centres germinatifs des organes lymphoïdes. C'est à ce niveau que se produit les processus de maturation d'affinité, de

commutation de classe, de différenciation des LB en plasmocytes de longue durée de vie ou LB mémoires, permettant le développement d'une mémoire immunologique [53].

Cette coopération TFH-LB est dépendante des molécules CD40L, ICOS, PD-1, SLAMF (CD84) présentes à la surface des TFH, qui jouent un rôle clé dans la réponse immune comme nous pourrons le voir plus en détail en pathologie humaine. Enfin, cette interaction TFH-LB dans le centre germinatif induit la sécrétion d'IL-21 par les TFH qui est une cytokine indispensable pour la prolifération, la survie et la différenciation des LB [54] (Figure 5). En résumé, les TFH sont caractérisés par une expression forte de molécules incluant l'IL-21, CXCL13, CXCR5, CD40L, ICOS, SLAMF, IL-4, associées à des molécules inhibitrices limitant leur prolifération excessive (PD-1, BTLA).

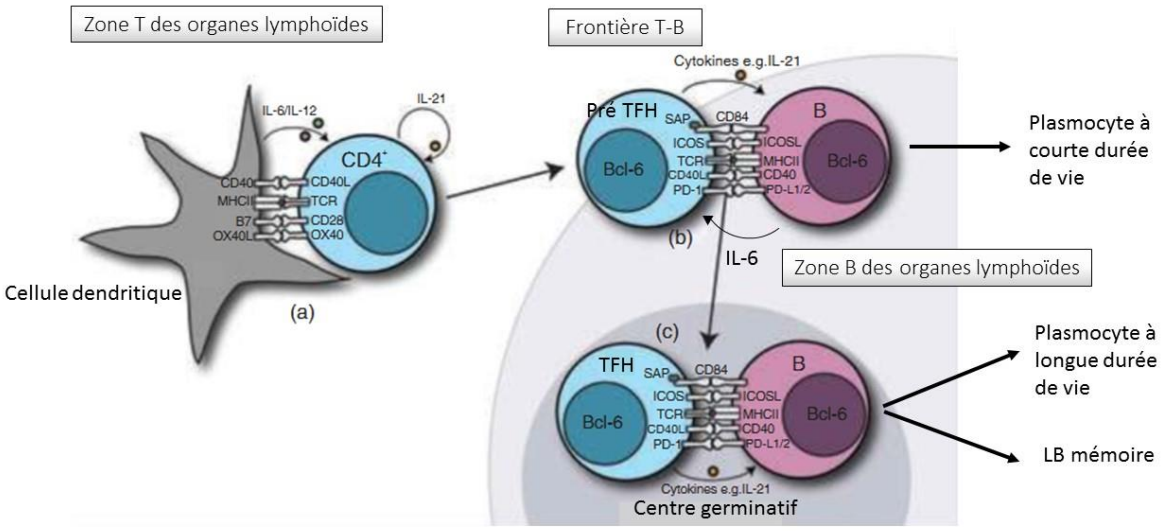


Figure 5: Coopération TFH-B permettant la différenciation des LB. D'après [55]

c) Mécanisme de régulation dans les centres germinatifs : rôle des LT folliculaires régulateurs (TFR)

La régulation dans le centre germinatif est primordiale pour éviter la production anarchique d'auto-anticorps et le développement de maladies auto-immunes ou de lymphoprolifération B excessive. Outre l'importance du microenvironnement cytokinique et des molécules inhibitrices telles que PD-1 ou BTLA, une nouvelle population de LT régulateurs a été découverte récemment : les LT folliculaires régulateurs (TFR) [56]. Tout comme les TFH, les TFR expriment CXCR5, ICOS, PD-1, ainsi que le facteur de transcription Bcl-6 ; mais, contrairement aux TFH, ils expriment aussi FoxP3 et Blimp-1. Les TFR peuvent migrer dans le centre germinatif et inhiber l'activation des LB médiée par les TFH et la production d'anticorps. La fonction suppressive des TFR dans les centres germinatifs est bien détaillée dans une revue récente de Sage et al. [57].

d) TFH circulants

Après avoir interagit avec les LB, les TFH peuvent sortir du centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires pour devenir des TFH circulants (TFHc). Ces TFHc, considérés comme des cellules mémoires quiescentes, expriment de la même façon le CXCR5, sécrètent de l'IL-21 et sont capables d'induire la différenciation des LB *in vitro.* Cependant, contrairement aux TFH du centre germinatif, les TFHc n'expriment pas le facteur de transcription Bcl-6 et ont une expression moindre d'ICOS et de PD-1 [58,59]. Chez l'individu sain, les TFHc représentent environ 15 à 25% des LT $CD4^+$, avec différents sous-populations définies par le niveau d'expression de certaines molécules, ICOS, CXCR3, CCR6, PD-1 et CCR7

[52]. Dans une étude publiée en 2012, Morita et al. ont défini parmi les TFHc les TFH1 ($CXCR3^+$ $CCR6^-$), les TFH2 ($CXCR3^-$ $CCR6^-$) et les TFH17 ($CXCR3^-$ $CCR6^+$), qui se distinguent par leur phénotype (CXCR3 et CCR6), leurs facteurs de transcription, leur sécrétion cytokinique, et aussi par leur capacité à induire la différenciation des LB *in vitro* (TFH2, TFH17 >> TFH1) [59]. Aussi, deux ans plus tard, Locci et al. ont décrit chez des individus sains une sous-population de TFHc possédant des caractéristiques cytokiniques, transcriptomiques et fonctionnelles très similaires à celles des TFH du centre germinatif [60].

e) Rôle des TFH en pathologie humaine

L'accès aux organes lymphoïdes reste limité en pathologie humaine. L'identification des TFHc, qui possèdent des caractéristiques fonctionnelles identiques aux TFH du centre germinatif, a permis d'approfondir le rôle de ces cellules dans différentes pathologies.

- Déficits immunitaires primitifs

Des mutations concernant des gènes impliqués dans la différenciation des TFH ou dans la coopération TFH-B peuvent être à l'origine de déficits immunitaires responsables d'infections opportunistes graves chez les patients. On peut citer 3 exemples de déficits immunitaires : le premier est le déficit immunitaire commun variable (DICV) qui regroupe plusieurs maladies caractérisées par une hypogammaglobulinémie et un déficit de production d'anticorps spécifiques après immunisation, provoquant des infections bactériennes récidivantes. Même si le gène en cause n'est pas toujours retrouvé, il a été décrit des mutations codant pour ICOS chez certains patients avec ce déficit immunitaire, qui

présentent dans ces cas-là une diminution notable des TFHc [61,62]. Le deuxième déficit est le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (ou syndrome de Purtillio). Ce déficit est lié à une mutation du gène *SH2D1A*, qui code pour la protéine SAP dont la fonction première est de réguler l'interaction TFH-B. Dans ce cas, la réponse humorale T-dépendante est altérée avec une diminution des LB mémoires, un défaut de formation des centres germinatifs et une hypogammaglobulinémie. Même si les patients ont un taux normal de TFHc, leur fonction est altérée *in vitro* avec un défaut de production d'Ig par les LB [63]. Enfin, il existe un déficit immunitaire secondaire à une mutation du gène codant pour la protéine CD40L appelé syndrome d'hyperIgM lié à l'X [64]. Les patients porteurs de cette mutation ne produisent pas d'immunoglobulines G, A et E, mais ont en revanche un taux normal ou élevé d'IgM, ce qui traduit l'importance de l'interaction CD40-CD40L pour le switch isotopique des LB. D'autre part, le taux de TFHc est considérablement effondré chez ces patients [61].

- Infection par le VIH

Les TFH jouent un rôle dans la réponse humorale T-dépendante avec la production d'anticorps spécifiques neutralisant anti-VIH. Les patients infectés ont plus de TFH dans les ganglions que les patients non infectés, ce qui peut être expliqué par une stimulation permanente par le virus du VIH. En revanche, leurs TFH présentent un défaut fonctionnel *in vitro* avec une diminution de la sécrétion d'Ig par les LB en coculture. Ce défaut fonctionnel est secondaire à une surexpression de PDL1 sur les LB des centres germinatifs, qui inhibe la fonction TFH via l'interaction PD-1-PDL1 [65]. Par ailleurs, il a été démontré que le taux de TFHc $CD4^+$ $CXCR5^+$ $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$, définis comme étant très fonctionnels, est positivement corrélé à l'apparition des anticorps spécifiques neutralisant anti-VIH [60].

- Maladies auto-immunes

De façon générale, la fréquence des TFHc est augmentée chez les patients atteints de maladies auto-immunes (lupus, polyarthrite rhumatoïde, dermatomyosite, myasthénie, thyroïdite, Goujerot-Sjögren, …). De nombreuses équipes ont également retrouvé une corrélation entre la fréquence des TFHc et le taux d'auto-anticorps et l'activité et/ou la sévérité de la maladie. Aussi, l'homéostasie entre les différentes populations de TFHc (TFH1, TFH2 et TFH17) semble altérée chez les patients ayant une maladie auto-immune [66].

- Cancers

Les TFH ont été décrit dans plusieurs types de cancers, avec un rôle délétère, ou au contraire un rôle protecteur. Dans le lymphome T angio-immunoblastique, les TFH sont à l'origine d'un envahissement cellulaire malin ganglionnaire et médullaire notamment, avec un pronostic très sombre malgré des traitements agressifs [67]. A l'inverse, dans les cancers du sein, les TFH présents dans l'infiltrat inflammatoire semblent avoir un rôle protecteur en attirant des cellules ayant une fonction anti-tumorale [68].

f) TFH et pathologie : qu'en est-il en transplantation ?

La littérature en transplantation reste moins fournie (Tableau 2). Les principaux travaux réalisés chez l'animal ont pour but d'étudier différentes stratégies thérapeutiques anti-rejet et suggèrent un effet bénéfique du blocage de la différenciation des TFH dans la prévention du rejet [69-73]. Chez l'Homme, l'implication des TFH reste extrêmement peu étudiée puisque

seules 2 études ont été réalisées à notre connaissance en transplantation rénale [74,75]. De Graav et al. ont montré que le nombre et la fonction des TFHc étaient conservés après une greffe rénale, que les patients avec des DSA préexistants à la greffe avaient plus de TFHc que les patients sans DSA préexistants, et aussi que les TFHc étaient présents dans des structures pseudo-folliculaires du greffon en cas de rejet aigu cellulaire [75]. Concernant l'étude de Shi et al., les auteurs ont mis en évidence une augmentation du taux de TFHc chez des patients avec un rejet humoral comparés à des patients transplantés stables, possiblement en lien avec une diminution d'expression de PD-1 [74].

Type de greffe	Modèle	Résultats principaux	Référence
Rein	Macaque	Le blocage de la co-stimulation par Belatacept ou par un anticorps anti-CD40 supprime la différenciation des TFH et réduit la formation des DSA.	Kim et al., 2014
Cœur	Souris	Seule la reconnaissance indirecte des allo-antigènes entraine la différenciation des TFH capable de former des plasmocytes à longue durée de vie.	Conlon et al., 2012
Cœur	Souris	La déplétion des LB ou des LB IL10^{+} entraine une diminution d'expression de CXCR5 par les TFH qui migrent vers la zone T du follicule et qui vont induire la différenciation en TH17, favorisant le rejet de greffe.	Lal et al., 2016
Peau	Souris	Le blocage de la voie CD40/CD40L inhibe l'expansion des TFH et prévient le rejet humoral, contrairement au blocage de la voie HVEM/BTLA.	Rodriguez-Barbosa et al., 2016
Rein	Babouin	Le blocage sélectif par un anticorps anti-CD28 diminue la réponse TFH plus fortement comparé au Belatacept, et diminue le risque de rejet aigu.	Ville et al., 2016
Rein	Homme	La fonction des TFHc est conservée *in vitro* après transplantation. Les patients immunisés en pré-greffe avec des anticorps DSA ont plus de TFHc 3 mois après la greffe que les patients non immunisés. Présence de TFH dans l'infiltrat cellulaire des biopsies de patients présentant un rejet aigu cellulaire.	De Graav et al., 2015
Rein	Homme	Les patients transplantés avec un rejet humoral ont un taux plus important de TFHc, avec une diminution d'expression de PD-1, comparé à des patients transplantés stables.	Shi, BMC Nephrol, 2015

Tableau 2: Principales études concernant les TFHc en transplantation chez l'animal et chez l'Homme.

PARTIE 1

1) Objectifs et présentation du travail

Comme énoncé dans l'introduction, l'étude de Chesneau et al. publiée en 2013 a été le point de départ de notre travail. Dans cette étude, les auteurs ont rapportés un défaut de différenciation *in vitro* des LB chez les patients TOL comparés aux patients ayant une fonction stable de leur greffon sous immunosuppresseurs [44]. Connaissant le rôle primordial des TFH dans la différenciation des LB, nous avons émis l'hypothèse que le défaut de différenciation des LB observé chez les patients TOL pouvait être en lien avec un défaut quantitatif et/ou qualitatif de leurs TFHc. Ainsi, notre objectif était de caractériser les TFHc chez les patients TOL afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations phénotypiques et/ou fonctionnelles responsables du défaut de différenciation des LB.

Nous avons utilisé la cohorte de patients tolérants recensés dans plusieurs centres en Europe qui sont suivis en consultation de façon occasionnelle par les équipes de transplantation. Etant donné que nous voulions réaliser des tests fonctionnels, nous avons sélectionné les patients pour lesquels nous pouvions avoir du matériel issu de sang fais, ce qui entrainait une contrainte importante puisque nous n'avons pu recueillir le matériel de seulement 8 patients TOL sur la période de l'étude. Dans le même temps, nous avons obtenus des prélèvements de sang frais de patients transplantés STA suivis en consultation au CHU de Nantes.

Nous avons d'abord caractérisé les TFHc en réalisant un phénotype complet des sous-populations décrites dans la littérature, en réalisant une analyse du transcriptome des TFHc

purifiés, et en réalisant une analyse de leur répertoire TCR. Nous avons par la suite utilisé un modèle de coculture avec les LB pour étudier la fonction de ces TFHc chez les patients TOL, notamment en mesurant la production d'immunoglobulines sécrétée par les LB.

2) Article 1 : en cours de révision dans *American Journal of Transplantation*

Résumé

La tolérance opérationnelle est définie par l'acceptation d'un greffon sans immunosuppresseurs chez un sujet immunocompétent. Il a été démontré *in vitro* un défaut de différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps chez les patients TOL. Connaissant le rôle des TFH dans la différenciation des LB, nous avons analysé cette population cellulaire sanguine chez des patients TOL et des patients STA. Nous avons observé dans un premier temps une diminution du taux de TFHc chez les TOL, incluant des sous-populations actives et fonctionnelles, associée à une signature transcriptomique TFHc moins marquée. Aussi, les TFHc des patients TOL présentent un défaut fonctionnel, qui se traduit par une diminution de la sécrétion d'IgG par les LB autologues en coculture associé à une sécrétion plus faible d'IL-21. Nous suggérons que ce défaut quantitatif et qualitatif des TFHc soit associé à la faible incidence d'immunisation post-greffe par des DSA, responsable d'un environnement pro-tolérogène. Enfin, l'augmentation du taux de TFHc à 1 an post-greffe chez des patients STA est associée à l'apparition d'anticorps DSA, suggérant un rôle prédictif des TFHc dans l'apparition des DSA.

American Journal of Transplantation

Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help

Journal:	*American Journal of Transplantation*
Manuscript ID	AJT-O-16-00963
Wiley - Manuscript type:	O - Original Article
Date Submitted by the Author:	12-Jul-2016
Complete List of Authors:	Chenouard, Alexis; Centre de recherche en transplantation et immunologie, Chesneau, Mélanie; INSERM UMR 1064, Bui Nguyen, Linh; Centre de recherche en transplantation et immunologie Cadoux, Marion; Centre de recherche en transplantation et immunologie DUGAST, Emilie; Centre de recherche en transplantation et immunologie, Paul, Chloe; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie-ITUN INSERM U1064 castagnet, stephanie; Etablissement Francais du Sang, HLA laboratory Ville, Simon; Centre de recherche en transplantation et immunologie Guerif, Pierrick; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie-ITUN INSERM U1064; CIC Biotherapie Soulillou, Jean-Paul; INSERM, UMR 643; Degauque, Nicolas; ITUN, INSERM UMR1064 Danger, Richard; INSERM U1064-ITUN, Giral, Magali; CHU Nantes, Institut de Transplantation Uro-Nephrologie ITUN; INSERM UMR 1064 Brouard, Sophie; INSERM, UMR 1064
Keywords - Scope:	translational research / science, basic (laboratory) research / science
Keywords - Discipline:	kidney transplantation / nephrology
Keywords - Focus:	tolerance: clinical, tolerance: mechanisms

SCHOLARONE™
Manuscripts

Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help

Alexis Chenouard[1, 2, 3], Mélanie Chesneau[1, 2], Linh Bui Nguyen[1, 2], Marion Cadoux[1, 3], Emilie Dugast[1, 2], Chloé Paul[1, 3], Stéphanie Malard-Castagnet[3, 4], Simon Ville[1, 2, 3], Pierrick Guérif[1, 3, 4], Jean-Paul Soulillou[7, 8], Nicolas Degauque [1, 3, 9], Richard Danger[1, 2], Magali Giral[1, 2, 3, 4, 7, 8] and, Sophie Brouard[1, 3, 4, 6, 7, 8, 9]

[1] INSERM, UMR 1064, Nantes, F-44093, France

[2] Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035, France

[3] CHU de Nantes, ITUN, Nantes, F-44093, France

[4] CIC biothérapie, Nantes, F-44035, France

[5] Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, Laboratoire HLA, Nantes, F-44035, France

[6] LabEx IGO "Immunotherapy Graft Oncology" Nantes, F-44035, France

[7] LabEx Transplantex, Nantes, F-44035, France

[8] EU consortium BIO-DrIM (www.biodrim.eu)

[9] EU consortium VISICORT (www. visicort.eu)

Corresponding author

Sophie Brouard, Joint Research Unit 1064, Institute of Transplantation Urology and Nephrology, Nantes University Hospital, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. Email: sophie.brouard@univ-nantes.fr

Running title: Blood Tfh cells and operational tolerance

CONFIDENTIAL

Abbreviations

CD: Cluster of Differentiation

CyA: Cyclosporin

DIVAT: Données Informatisées et Validées en Transplantation

dnDSA: de novo Donor Specific Antibody

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FK: Tacrolimus

FPKM: Fragments Per Kilobase Million

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

HV: Healthy volunteers

IFN-γ: Interferon gamma

Ig: Immunoglobulin

IL: Interleukin

MPA: Mycophenolic Acid

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PMA: Phorbol Myristate Acetate

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SEB: endotoxin-reduced Staphylococcal Enterotoxin B

STA: renal transplant recipients with stable graft function under immunosuppression regimen

Tfh: T follicular helper cells

TOL: operationally tolerant recipents

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

amjtransplant@duke.edu

ABSTRACT

Renal operationally tolerant patients (TOL) display a defect in B cell differentiation, with a deficiency in plasma cells. Recently described, T follicular helper cells (Tfh) play a critical role in B cell differentiation. We analyzed blood Tfh subsets in TOL and transplanted patients with stable graft function under immunosuppression (STA). We observed a reduced proportion of blood Tfh in TOL, mainly affecting activated and highly functional Tfh subsets. Functionally, Tfh from TOL displayed a modified gene expression profile, failed to produce IL-21 and were unable to induce IgG production by naive B cells. This Tfh defect is linked to a low incidence of post graft *de novo* DSA (dnDSA) immunization, suggesting that the lack of blood Tfh in TOL may induce a pro-tolerogenic environment with reduced risk of developing dnDSA. Finally, we showed that in stable recipients, despite immunosuppression, elevated blood Tfh cells precedes the occurrence of dnDSA during an alloresponse. These data provide new insights into the mechanisms of antibody response in operational tolerance. Disrupted homeostasis and impaired Tfh function in TOL could lead to a reduced risk of developing dnDSA and suggest a predictive role of blood Tfh on the occurrence of dnDSA in transplant recipients.

CONFIDENTIAL

INTRODUCTION

Whereas the need to maintain transplanted patients on immunosuppression is universally recognized, long-term renal graft outcome is limited by the side effects of immunosuppressive drugs themselves (1-6). Although recent advances have been described that favor tolerance induction in renal transplantation (7), to date, no immunosuppression minimization protocol has been established or validated. Interestingly, the long-term acceptance of a mismatched kidney allograft after immunosuppressive drug withdrawal, defined as operational tolerance in humans, can occasionally be observed, and is principally as a result of patient non-compliance (8-11). Identifying stable transplanted patients under immunosuppression who could benefit from drug minimization remains a real challenge. Comprehensive immune characterization of patients defined as operationally tolerant (TOL) should help us to reach this challenge. Analyses of TOL blood indicates B cells are important in the development and/or maintenance of tolerance (12-19). We reported that B cells from TOL did not fully differentiate into plasma cells whereas STA did, which could contribute to a pro-tolerogeneic environment (13). However, the precise mechanisms involved in this B cell differentiation defect in TOL remain to be fully characterized.

Follicular helper T cells (Tfh) localize in the lymphoid organs and are crucial for supporting B cell differentiation (20). Obtaining lymph node samples from patients is extremely challenging, therefore several studies have focused on studying blood $CD4^+$ T cells expressing the CXCR5 chemokine receptor, which share functional properties with Tfh localized in lymphoid tissues (21, 22). The phenotype and function of blood Tfh have been principally analyzed in autoimmunity and infectious diseases (23, 24). In the field of organ transplantation, Tfh are involved in humoral alloreactivity (25-27), but their possible role in TOL has not been described. In the current study, we measured the frequency and function

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

of blood Tfh in TOL compared to STA patients, and identified a decreased proportion of blood Tfh in TOL, particularly the activated and highly functional subsets. Moreover, we showed that they were functionally impaired when cocultured with naive B cells, and lacked IL-21 production. Finally, we suggest that blood Tfh characterisation can be potentially used to predict the occurrence of *de novo* DSA (dnDSA) in transplant recipients.

CONFIDENTIAL

MATERIALS AND METHODS

Patients

Two groups of kidney transplant recipients were included in the study: (1) Operationally tolerant patients (TOL) with stable kidney graft function (creatinemia < 150 µmol/L and proteinuria < 1g/24h) in the absence of immunosuppressive treatment for at least one year (n=8); (2) Kidney recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA) with proteinuria < 0.5 g/24h and stable creatinemia for at least 1 year (creatinemia < 150 µmol/L or < 200 µmol/L with a variation < 20% of the mean value of creatinemia in the year preceding inclusion) (n=14) (Table 1). For the retrospective analysis, we selected 60 patients from the multicentric DIVAT (Données Informatisées et Validées en Transplantation) database with stable graft function (creatinemia < 150 µmol/L and proteinuria < 0.5 g/24h at 3, 6 and 12 months post transplantation) and without *de novo* DSA (dnDSA) at one year post transplantation. Among them, seven patients developed dnDSA and 53 patients had no dnDSA during the follow-up (Table 2).

Immunophenotyping of blood Tfh

Tfh were characterized from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) by flow cytometry (BD LSRII) with the following anti-human monoclonal antibodies: anti-CD4 PerCP Cy5.5 (clone RPA-T4), anti-CXCR5 Alexa 488 (clone RF8B2), anti-CXCR3 BV421 (clone 1C6/CXCR3), anti-ICOS BV421 (clone 2D3/B7-H2) (BD Biosciences), anti-CD45RA APC Vio770 (clone T6D11), anti-CCR7 PE Vio770 (clone REA108) (Miltenyi) and anti-PD1 PE (clone J105) (eBioscience). Dead cells were excluded from the analysis using a LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies). Marker expression of live stained cells was detected by flow cytometry (BD LSRII).

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

Effect of immunosuppressive drugs on Tfh proliferation

PBMCs labelled with Cell Proliferation Dye eFluor® 450 (ebiosciences) were cultured in 96-well U-bottom plates in complete RPMI at $2x10^5$ cells/200 µl in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 dynabeads ($5x10^4$ dynabeads/well) (Invitrogen, Oslo, Norway) to facilitate Tfh proliferation. Immunosuppressive drugs were added at 48 hours: tacrolimus (FK) (1 ng/ml), cyclosporin (CyA) (100 ng/ml) and mycophenolic acid (MPA) (100 ng/ml).

RNA sequencing of purified blood Tfh

Blood Tfh cells ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$) and non-Tfh cells ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^-$) were sorted using a BD FACSAria (BD Biosciences). Purity was always > 95%. Total RNA from sorted blood Tfh cells was extracted using the TRIzol procedure (according to manufacturer's protocol). Transcriptome analysis was performed according to the SmartSeq2 protocol (28, 29) with some modifications (30). Expression values are expressed in FPKM (Fragments Per Kilobase Million).

TCR Vβ repertoire analysis of purified blood Tfh

After reverse transcription using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), 17 TCR Vβ transcripts were quantified by qRT-PCR (7900 Real-time PCR; Applied Biosystem). The CDR3 length distribution of each individual Vβ family was obtained using a capillary sequencer (3730 Applied Biosystem). Additionally, qualitative analysis was measured for an additional 13 TCR Vβ families. Reproducibility and accuracy were assessed at each step of the TCR Vβ repertoire analysis. A software developed to automatically describe individual TCR Vβ profiles was used (31).

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

Cytokine and Ig production in Tfh-B cell coculture assays

PBMCs were stained with anti-CD4 PerCP Cy5.5, anti-CXCR5 BV421 (clone RF8B2), anti-CD45RA APC (clone HI100), anti-CD19 PC7 (clone SJ25C1), anti-CD27 PE (clone LG.3A10)(BD Bioscience) and Yellow Live Dead Cells (Life Technologies). Blood Tfh ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$) and naive B cells ($CD19^+$ $CD27^-$) were sorted using a BD FACSAria (BD Biosciences) with a purity > 95%. Naive B cells (5×10^4) were cocultured with blood Tfh at a 1:1 ratio in complete RPMI with endotoxin-reduced staphylococcal enterotoxin B (SEB) (100 ng/ml; Sigma). Apoptosis and B cell proliferation were analyzed at day 4 using Annexin V (BD Bioscience) and CellTrace Violet staining (Invitrogen) following the manufacturer's protocol, and as previoulsy described (13). Cells were stained at day 7 with anti-CD4 BV241 (clone RPA-T4), anti-CD20 FITC (clone 2H7) and anti-CD38 APC-H7 (clone 2H7). Counting beads (BD Bioscience) were used to calculate the absolute number of B cells based on the obtained cell percentages. Immunoglobulin (Merck Millipore) and cytokine concentrations (ProcartaPlex Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine Panel, eBiosciences, eBiosciences) in the culture supernatants were measured by Luminex following the manufacturer's protocol.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. TOL and STA recipent groups were compared using the non parametric Mann Withney test or Khi2 test for quantitative or qualitative parameters respectively. Significance was defined as a *p*-value less than 0.05 (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$). Spearman correlation coefficient and two-tailed *p*-values were determined in the analysis of correlations. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test for significance.

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

RESULTS

Clinical characteristics of kidney recipients

Table 1 lists the baseline characteristics of the operationally tolerant patients (TOL, n=8) and the patients with stable graft function under immunosuppression (STA, n=14) for which we performed immunophenotyping, RNA sequencing and T cell receptor (TCR) Vβ repertoire analysis. As previously described (8, 10), and inherent to the status of operationally tolerant recipients, a lower proportion of TOL received induction therapy (57% vs 100%, p=0.03) and had a longer time of transplantation compared to STA (20.7 vs 6.8 years, $p < 0.001$).

TOL recipients harbor a quantitative Tfh defect which affects activated and highly functional Tfh subsets

We first determined the frequency of $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ in TOL compared to STA. As shown in Figure 1A, TOL displayed a significantly lower frequency of blood Tfh cells ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$) compared to STA (11.7% ± 0.8 vs 18.4% ± 1.6, Figure 1A, p=0.003). We next determined $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ cell surface expression of PD-1 and ICOS, two markers of activation of blood Tfh (21-23). The frequency of $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ $PD\text{-}1^+$ and $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ $ICOS^+$ $PD\text{-}1^+$ were 56% and 47% lower repectively in TOL compared to STA samples (Figure 1B, $p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively). Finally, TOL displayed a lower proportion of $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$ T cells (Figure 1B, 63% reduction, $p < 0.001$) recognized as a highly functional blood Tfh subset (21).

Because the TOL group had a longer time of transplantation compared to STA (20.7 vs 6.8 years, $p < 0.001$), we next investigated whether the frequency of blood Tfh was influenced by time post transplantation. As shown in Figure 1C, no correlation was found between time after transplantation and the percentage of Tfh in both groups of patients. Finally, because

amjtransplant@duke.edu

STA are under classical immunosuppressive drug treatment and TOL recipients no longer receive immunosuppression (Table 1), we tested whether immunosuppression could have a paradoxical effect on Tfh proliferation *in vitro*. The proliferation of Tfh after anti-CD3/anti-CD28 activation was significantly decreased by cyclosporin (36%, $p < 0.05$) and mycophenolic acid (87%, $p < 0.001$), suggesting, as expected, that the difference observed between TOL and STA *in vivo* was not due to an effect of immunosuppressive drugs (Figure 1D). Altogether, these results highlight a quantitative defect of Tfh that particulary affects activated and highly functional Tfh subsets in the blood from TOL compared to STA recipients.

Blood Tfh from TOL exhibit a modified gene expression profile

We next compared purified blood Tfh cell gene expression by RNA-seq for the 2 groups of patients. Overall, 16,273 transcripts were expressed in blood Tfh from both groups. To compare the Tfh gene expression profile between TOL and STA, we used the top-100 gene signature of blood Tfh published by Locci et al (21). Among these 100 genes differentially expressed between Tfh and non Tfh from healthy volunteers, 77 were expressed in our samples. Among them, 17 genes were differentially expressed between TOL and STA ($p < 0.05$) and were hierarchically clustered. Among these, 6 genes upregulated in Tfh from healthy volunteers in Locci's study were downregulated in TOL and, inversely, 11 genes downregulated in Tfh from healthy volunteers were upregulated in TOL (Figure 2A). Moreover, expression of *BCL6*, the master regulator of Tfh differentiation, as well as other transcription factors associated with T cell differentiation (including *TBX21*, *GATA3*, *RORC* and *FOXP3*) were not different between the 2 groups of transplant patients (Figure 2B). Finally, using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), and particularly focusing on

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

immunological signatures, we identified 21 and 26 genesets associated with TOL and STA respectively (FDR < 5%), with 2 main biological functions: 1) genes associated with Th2 differentiation (up-regulated in TOL and down-regulated in STA) (32), and 2) genes up-regulated following *in vitro* $CD4^+$ T cell activation (33, 34) (up-regulated in TOL and down-regulated in STA) (Supplementary Tables 1A and 1B). Collectively, the transcript data indicate that Tfh from TOL exhibit a modified Tfh gene expression profile, which is more polarized toward a Th2 transcript profile.

TOL Tfh cells exhibit a Gaussian usage of their TCR Vβ repertoire

Antigen-driven T cell expansion results in the accumulation of specific TCR Vβ families and the selection of a specific CDR3 length distribution (35-37). To explore antigen-driven selection of Tfh on the basis of a preferential TCR usage, the TCR Vβ repertoire of purified Tfh from TOL and STA was analyzed. Quantitatively, the frequency of each Vβ family (17 families) was similar regardless of the TOL and STA groups (minimal frequency=5.12; maximal frequency=8.45; Supplementary Figure 1A). No increase in one or several Vβ families was observed, thereby demonstrating the absence of selection and clonal expansion of a specific Vβ family in Tfh purified from TOL and STA. This was confirmed by the polyclonal CDR3 pattern of the TCR Vβ families in Tfh purified from TOL or STA (Supplementary Figure 1B). Altogether, the TCR Vβ repertoire of both groups remained Gaussian, suggesting no antigen-selection of Tfh.

TOL blood Tfh cocultured with B cells express reduced IL-21 and are not able to induce B cell IgG production

amjtransplant@duke.edu

To determine whether Tfh can provide B cell help, we co-cultured autologous blood Tfh and naive B cells *in vitro*. We first assessed B cell proliferation in the presence of Tfh (1/1 ratio) at day 4 by flow cytometry. As shown in Figure 3A, the number of proliferative B cells was similar between TOL and STA. Similarly, no difference in the number of plasmablasts ($CD4^-$ $CD20^-$ $CD38^+$ cells) or viable B cells was detected on day 7 (Figure 3B). Nonetheless, on day 7, blood Tfh from TOL were significantly less potent at inducing naive B cell IgG production compared to STA (Figure 3C, $p < 0.05$). The failure of Tfh from TOL to provide help to naive B cells was not due to reduced numbers of Tfh, given that Tfh from STA and TOL survived similarly in coculture (Figure 3D). Interestingly, the defective IgG production in TOL was associated with a significant decrease in the level of Tfh IL-21 secretion in cocultures compared to STA (Figure 3E, $p=0.03$). Altogether, these data suggest that Tfh from TOL produce less IL-21 and do not induce B cell IgG production.

Post-graft DSA immunization is rare and delayed in TOL

The altered function of blood Tfh from TOL *in vitro* raises the question whether such a defect may have consequences *in vivo*, by decreasing the incidence of dnDSA production. We have previously described a cohort of 27 TOL, focusing on their clinical characteristics (10). Based on this initial report, we updated the data with respect to the occurrence of dnDSA and graft dysfunction, as defined by a creatinine clearance < 30 ml/min/1.73m^2. Among the 27 TOL patients, 5 (19%) developed dnDSA at a median time of 15 years (extreme values: 2-21) after transplantation, with only 1 patient (4%) immunized within the first decade post transplantation (Figure 4A). Graft failure occurred in 3 of 5 patients, within 2 years (extreme values: 0-4) years after dnDSA appearance. Among the 22 TOL dnDSA negative patients, 6 lost their graft. Graft failure occurred within 11 years (extreme values: 13-38) after

amjtransplant@duke.edu

immunosuppression withdrawal and 21 years (extreme values: 13-38) after transplantation (Figure 4B). Figure 4C shows the Kaplan Meier kidney-allograft survival curve according to dnDSA status. Median graft survival for patients with dnDSA was significantly lower than the no dnDSA group (21 versus 39 years, p=0.003), which is consistent with other studies in stable patients under immunosuppression, even when considering the low number of such rare patients, (38-40). Collectively, this data shows that only a few TOL developed dnDSA, and that the post graft immunization in TOL occurs late after transplantation with a negative impact on their graft function.

Blood Tfh are higher at 1 year post transplantation in stable transplant patients who subsequently developed dnDSA

We propose that the blood Tfh defect in TOL recipients could drive a pro-tolerogenic environment that results in reduced post graft dnDSA immunization. We subsequently hypothezised that highly functional blood Tfh in stable transplant recipents could be more potent at inducing dnDSA and that the occurrence of dnDSA may be preceded by an increased proportion of blood Tfh in order to support B cell differentiation toward plasma cell secreting dnDSA. To test this, we compared the proportion of blood Tfh from 60 stable transplant recipents with no dnDSA at 1 year post transplantation, and who developed dnDSA (dnDSA+, n=7) or not (dnDSA-, n=53) during the follow-up (Figure 5A). In accordance with the literature (38), the 10-year graft survival for dnDSA+ patients was lower than that of the dnDSA- group (54% vs 91%, p=0.001, Figure 5B). Comparisons between the 2 groups are summarized in Table 2. As noted in Figure 5C and in accordance with our hypothesis, the proportion of Tfh was higher in the dnDSA+ group compared to the dnDSA- group (Figure 5C, p=0.03). Altogether these data show that blood Tfh quantification in patients with stable

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

graft function is of interest for following post graft dnDSA immunization over time, which is correlated with worse graft outcome.

CONFIDENTIAL

DISCUSSION

Operational tolerance is a rare phenomenon in kidney transplantation (10, 11). Several studies, including ours, have highlighted an important B cell signature (12, 14-19), with a notable defect in terminal B cell differentiation (13). We focused on Tfh which express surface molecules favoring cognate B cell interactions and are specialized in providing B cell help (20, 41). We identified and characterized blood Tfh from TOL recipients in order to decipher their potential role in B cell-mediated immune responses compared to stable transplant recipients under immunosuppression.

We firstly observed a lower proportion of $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ blood Tfh cells in TOL compared to STA patients. In contrast to germinal center Tfh cells, a very small population of $CXCR5^+$ cells in the blood were $ICOS^+$ and highly expressed PD-1, defining a subset of activated Tfh (21-23). Interestingly, these cells were lower in blood from TOL. Moreover, Locci et al. also identified another subset of blood Tfh, defined as $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$ cells, which share the same transcriptional signature with Tfh in germinal centers (21). Compared to conventional Tfh subsets, blood $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$ Tfh cells appear to be the subset with a phenotypic and functional profile most similar to germinal center Tfh, which possess the highest memory and B cell helper functions. Interestingly, the lack of activated and functional Tfh observed by immunophenotyping in tolerant recipients is correlated with a less pronounced and modified Tfh gene expression profile compared to stable patients, according to Locci's classification based on blood Tfh profiles from healthy individuals (21). This TOL profile is not associated with the longer time of transplantation within this group, as shown by the lack of correlation between the two parameters, nor to immunosuppressive drugs as suggested by the inhibition of *in vitro* Tfh proliferation induced by immunosuppressive drugs. These data further suggest a potential and strong disruption of

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

Tfh homeostasis in tolerant patients. It has been described in the literature, particularly in HIV patients, that expansion of Tfh was not necessarily correlated with an increase in their B cell help capacity (42). In this particular situation of tolerance to an allogeneic transplant, this defect in the number of circulating Tfh was also associated with a "qualitative" defect with a significant failure to induce IgG production by naive B cells compared with Tfh from STA. We showed that this "qualitative" defect is not due to a Tfh switch toward peptide-specific responses since the TCR repertoire remains polyclonal in both groups. This is in agreement with data from Leddon et al. showing that in response to immunization with different unrelated protein antigens, the Tfh TCR repertoire remains unbiased (43). Transcriptional analysis of resting Tfh using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) also confirmed this observation by identifying genes associated with Th2 differentiation upregulated in TOL. Interestingly, and corroborating with this data, we observed a decrease in IL-21 secretion following Tfh coculture with B cells from TOL but not STA patients. This is consistent with the fact that blocking IL-21 during Tfh-B coculture results in an inhibition of Ig secretion (22, 27). IL-21 is one of the most important cytokines secreted by Tfh, as it initiates and promotes B cell differentiation and proliferation, and triggers B cell apoptosis in humans (44). The similar B cell proliferation and apoptosis observed on day 4, and plasmablast differentiation on day 7 in TOL and STA-cocultures does not support such a mechanism of action, but alternatively suggests an intrinsic and instrumental role of the B cell itself. Interestingly, the IL-21 production defect of Tfh when cocultured with B cells *in vitro* was reversed after PMA/ionomycine stimulation (*data not shown*), suggesting that TOL Tfh may be rendered anergic following autologous B cell interaction. This suggests that while Tfh control B cell responses, B cells are reciprocally instrumental for Tfh. From mouse model studies, development and/or maintenance of Tfh is dependent on appropriate interaction

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

with B cells in germinal centers (45, 46). Whilst little is known about the role B cells play in Tfh functions in humans, recent data by Chavele et al. showed that circulating plasmablasts induce Tfh differentiation, highlighting the reciprocal interaction between B cells and Tfh (47). The same authors reported that this reciprocal interaction is dependent on plasmablast IL-6 production, in both humans and mouse models (47). Our results do not support this last hypothesis, as no difference in the number of plasmablasts on day 0 and the level of IL-6 on day 7 between TOL and STA in the cocultures was observed (*data not shown*). Alternatively, this data suggests a possible positive feedback mechanism, whereby plasmablasts may interfere in with Tfh at different sites.

To glean insight into the *in vivo* relevance of our *in vitro* findings in such a specific and unique situation of tolerance, we rather consider to investigate the role of Tfh-B cell interactions and their time relationship with humoral alloreactivity in transplanted patients with stable graft function. Tfh have been reported to be involved in humoral alloreactivity in animal models (25, 26) and in renal transplant patients (27). Whether early quantitative and/or qualitative blood Tfh defects may directly impact on the incidence of specific dnDSA in transplant recipients *in vivo* has never been explored. Only 19% of TOL from the cohort previously described by Brouard et al. (10), developed dnDSA at a median time of 15 years after transplantation. Moreover, only 1 TOL (4%) developed dnDSA within 10 years post transplantation, whereas 25% of patients with stable graft function have been described to do so (39). These observations suggest that the defect in blood Tfh observed in blood from tolerant patients may lead to a pro-tolerogenic environment with minimal post graft DSA immunization levels in these patients. Conversely, these new data also reveal the negative impact of dnDSA on TOL graft function following the loss of operational tolerance. Our data fits with numerous studies over the last decade reporting on the negative impact of dnDSA

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

on allograft outcomes (38, 40, 48-50). These show that tolerant patients do not discredit the rule that the control of the mechanisms leading to DSA production could be the central event of the operational tolerance status.

Interestingly, it has been reported that patients with preexisting dnDSA displayed elevated peripheral Tfh after transplantation compared to patients with no dnDSA (27). But, to our knowledge, no study reported on the risk to produce dnDSA according to proportion of Tfh. Based on our observations, we hypothesize that the highly functional blood Tfh in some stable transplant patients could be more potent at inducing dnDSA. We very carefully selected a cohort of stable transplant patients with or without dnDSA and in this context, we reported that stable transplant patients who will develop dnDSA in the years following transplantation (extreme values: 2-7 years) display a higher proportion of Tfh at one year post transpantation and worse graft outcome compared to those who will not develop dnDSA. These data should be treated cautiously considering the small number of patients with dnDSA, but they suggest that quantifying blood Tfh during post-transplantion follow-up could assist the clinician in predicting dnDSA immunization and graft outcome.

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

amjtransplant@duke.edu

Acknowledgments

We thank the participating patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We thank Pr G. Blancho, Dr D. Cantarovitch, Pr J. Dantal, Dr S. Ferrari-Lacraz, Pr K.Hadaya, Pr M. Hourmant, Dr B. Hurault de Ligny, Dr G. Lefrancois, Pr C. Legendre, Dr B. Le Mauff, Dr H. Le Monies De Sagazan, Dr A. Meurette, Dr M. Rabant, Pr J.F. Subra, Dr J. Sayegh, Dr A. Testa, Dr F. Villemain and Dr J. Zuber for their help in this study, Dr C. Braudeau for technical assistance (Luminex), I. Guihard and B. Moulin-Guérin for blood samples of healthy volunteers, and the biological resource centre for biobanking (CHU Nantes, Hôtel Dieu, Centre de ressources biologiques (CRB), Nantes, F-44093, France (BRIF : BB-0033-00040). Finally, we thank M. Locci and S. Crotty for access to their blood Tfh transcriptional data.

This work was supported by grants from the Centaure Foundation, the Labex Transplantex and by a University Hospital Institute (IHU)-European Center for Transplantation and Immunotherapy Services (CESTI) project. The IHU-Cesti project is supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This work was also realized in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. A. Chenouard is a recipient of a poste d'accueil INSERM.

Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

CONFIDENTIAL

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Immunophenotyping of kidney recipent blood Tfh cells. (A and B) Quantification of blood Tfh subsets from STA (n=14) and TOL (n=8). Of note, quantification of blood $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ $PD\text{-}1^+$ $ICOS^+$ cells was only performed on 8 STA and 5 TOL patients. The dotted line indicates the median HV value (n=7) *p < 0.05; **p < 0.01; Mann-Withney test. (C) Correlation between the percentage of blood Tfh and time after transplantation (Spearman correlation). (D) Percentage of blood Tfh proliferation after stimulation of PBMCs with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours with or without immunosuppressive drugs (FK=Tacrolimus; CyA=Cyclosporin A; MPA=Mycophenolic acid) (mean +/- SEM, n=7 experiments performed on HV) *p < 0.05; ***p < 0.01; Friedman test.

Figure 2. Tfh from TOL exhibit a suppressed Tfh-gene expression profile. Tfh were sorted from STA (n=7) and TOL (n=7) and total RNA was extracted for RNA sequencing. (A) Among the top 100 genes differentially expressed by blood Tfh ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^+PD1^+$ $CXCR3^-$) versus memory CD4 ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^-$) T cells (21), 17 (6 upregulated in Tfh and 11 downregulated) were differentially expressed between TOL and STA (p < 0.05) and were hierarchically clustered. Each cell in the matrix corresponds to the expression level of a gene in a sample, with red for over-expression, green for under-expression and black for gene expression close to the median (see color scale). (B) Expression of *BCL6*, *TBX21*, *GATA3*, *RORC* and *FOXP3* in blood Tfh from the STA and TOL groups. Bars represent median value for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7).

Figure 3. TOL blood Tfh cells display altered *in vitro* function. Purified blood Tfh were cocultured with naive B cells in the presence of the superantigen SEB for 7 days (STA=11,

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

TOL=5). (A) B cell proliferation and B cell apoptosis were analyzed by flow cytometry and plots represent the number of proliferative B cells and the number of apoptotic B cells on day 4. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (B) Plasmablast ($CD4^-$ $CD20^-$ $CD38^+$) differentiation was analyzed on day 7 by flow cytometry using the gating strategy indicated. Plots represent the number of plasmablasts in STA and TOL. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (C) IgG, IgA and IgM production in the T-B cocultures (mean +/- SEM) with the dotted line indicating the mean HV value (n=7). (D) Number of viable Tfh and B cells in cocultures on day 7. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (E) Plots depict the amount of IL-21 produced (pg/ml) in the supernatant from cocultures on day 7. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). *$p < 0.05$; Mann-Withney test.

Figure 4. Natural history of TOL according to post graft DSA immunization. (A) Kaplan-Meyer plot of dnDSA-free survival over time post transplantation. (B) Median times with extreme values (years) between transplantation, immunosuppression withdrawal, occurrence of dnDSA and graft failure in TOL. (C) Graft survival probability according to post graft DSA immunization in 27 TOL patients using the Kaplan-Meier method and log-rank test (p=0.003).

Figure 5. Association between blood Tfh and occurrence of dnDSA in stable transplant patients. (A) Flow chart of patient selection. (B) Graft survival probability according to post graft DSA immunization using the Kaplan-Meier method and the log-rank test (p=0.001). (C)

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

Proportion of blood Tfh at one year post transplantation in stable transplant patients according to post graft DSA immunization. Bars represent median values for each group. *p < 0.05; Mann-Withney test.

Supplementary Figure 1. Absence of clonal selection in blood Tfh from TOL and STA. Blood Tfh were purified from TOL (n=8) and STA (n=7). TCR Vβ usage was assessed by (A) the quantification of 17 Vβ families by qRT-PCR and (B) the analysis of the CDR3 length distribution of 30 Vβ families. Transcript expression of each individual Vβ family was normalized to the expression of a reference gene. The pie chart represents the relative abundance of each Vβ family within each individual. The CDR3 length distribution of each Vβ family was classified in a non-biased manner as either polyclonal or oligoclonal. Each point represents the frequency of the typology of each Vβ family of each individual and the dotted line indicates the median HV value (n=9).

CONFIDENTIAL

REFERENCES

1. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med. 2004 Dec 23;351(26):2715-29.

2. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. Am J Transplant. 2004 Jun;4(6):905-13.

3. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. Lancet. 1998 Feb 28;351(9103):623-8.

4. Soulillou JP, Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. Transplantation. 2001 Dec 27;72(12 Suppl):S89-93.

5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. N Engl J Med. 2003 Dec 11;349(24):2326-33.

6. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. N Engl J Med. 2007 Dec 20;357(25):2601-14.

7. Elias N, Cosimi AB, Kawai T. Clinical trials for induction of renal allograft tolerance. Curr Opin Organ Transplant. 2015 Aug;20(4):406-11.

8. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noel C, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. Am J Transplant. 2006 Apr;6(4):736-46.

9. Orlando G, Hematti P, Stratta RJ, Burke GW, 3rd, Di Cocco P, Pisani F, et al. Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges. Ann Surg. 2010 Dec;252(6):915-28.

10. 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 Dec;12(12):3296-307.

11. Massart A, Pallier A, Pascual J, Viklicky O, Budde K, Spasovski G, et al. The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. Nephrol Dial Transplant. 2016 Jan 12.

12. 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 Oct;26(10):2588-98.

13. 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.

amjtransplant@duke.edu

CONFIDENTIAL

14. Newell KA, Asare A, Sanz I, Wei C, Rosenberg A, Gao Z, et al. Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. Am J Transplant. 2015 Nov;15(11):2908-20.

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. 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.

17. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 25;104(39):15448-53.

18. 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.

19. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. Transplantation. 2006 Feb 15;81(3):398-407.

20. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. Nat Rev Immunol. 2015 Mar;15(3):185-9.

21. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. Immunity. 2013 Oct 17;39(4):758-69.

22. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity. 2011 Jan 28;34(1):108-21.

23. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends Immunol. 2014 Sep;35(9):436-42.

24. Ma CS, Deenick EK. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. Immunol Cell Biol. 2014 Jan;92(1):64-71.

25. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, Hong JJ, Farris AB, 3rd, Iwakoshi NN, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2014 Jan;14(1):59-69.

26. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. J Immunol. 2012 Mar 15;188(6):2643-52.

CONFIDENTIAL

27. de Graav GN, Dieterich M, Hesselink DA, Boer K, Clahsen-van Groningen MC, Kraaijeveld R, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. Clin Exp Immunol. 2015 May;180(2):329-40.

28. Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc. 2014 Jan;9(1):171-81.

29. Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. Nat Methods. 2013 Nov;10(11):1096-8.

30. Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, Satija R, Shalek AK, Regev A. Preparation of Single-Cell RNA-Seq Libraries for Next Generation Sequencing. Curr Protoc Mol Biol. 2014;107:4 22 1-4 17.

31. Salou M, Garcia A, Michel L, Gainche-Salmon A, Loussouarn D, Nicol B, et al. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. Ann Clin Transl Neurol. 2015 Jun;2(6):609-22.

32. Elo LL, Jarvenpaa H, Tuomela S, Raghav S, Ahlfors H, Laurila K, et al. Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. Immunity. 2010 Jun 25;32(6):852-62.

33. Abbas AR, Baldwin D, Ma Y, Ouyang W, Gurney A, Martin F, et al. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. Genes Immun. 2005 Jun;6(4):319-31.

34. Yu M, Li G, Lee WW, Yuan M, Cui D, Weyand CM, et al. Signal inhibition by the dual-specific phosphatase 4 impairs T cell-dependent B-cell responses with age. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 10;109(15):E879-88.

35. Sebille F, Gagne K, Guillet M, Degauque N, Pallier A, Brouard S, et al. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. J Immunol. 2001 Sep 15;167(6):3082-8.

36. Gagne K, Brouard S, Giral M, Sebille F, Moreau A, Guillet M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. J Immunol. 2000 Feb 1;164(3):1553-63.

37. Guillet M, Brouard S, Gagne K, Sebille F, Cuturi MC, Delsuc MA, et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. J Immunol. 2002 May 15;168(10):5088-95.

38. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. Am J Transplant. 2012 May;12(5):1157-67.

39. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. Transplantation. 2013 Feb 15;95(3):410-7.

CONFIDENTIAL

40. Cooper JE, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. Transplantation. 2011 May 27;91(10):1103-9.

41. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. Immunity. 2014 Oct 16;41(4):529-42.

42. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Grevenynghe J, Metcalf T, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. Nat Med. 2013 Apr;19(4):494-9.

43. Leddon SA, Sant AJ. The peptide specificity of the endogenous T follicular helper cell repertoire generated after protein immunization. PLoS One. 2012;7(10):e46952.

44. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. J Immunol. 2009 Feb 15;182(4):1781-7.

45. Lal G, Kulkarni N, Nakayama Y, Singh AK, Sethi A, Burrell BE, et al. IL-10 from marginal zone precursor B cells controls the differentiation of Th17, Tfh and Tfr cells in transplantation tolerance. Immunol Lett. 2016 Jan 6;170:52-63.

46. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. J Immunol. 2007 Oct 15;179(8):5099-108.

47. Chavele KM, Merry E, Ehrenstein MR. Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. J Immunol. 2015 Mar 15;194(6):2482-5.

48. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. Transplantation. 2008 Aug 15;86(3):377-83.

49. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. Transplantation. 2009 May 27;87(10):1505-13.

50. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. Am J Transplant. 2009 Nov;9(11):2520-31.

CONFIDENTIAL

Table 1. Demographics and clinical characteristics of the transplant patients

Demographic and transplant characteristics	STA (n=14)	TOL (n=8)	*p*-value
Age, years	58 (40-76)	59 (46-69)	0.97
Sex, n			0.91
Men	10 (71)	5 (63)	
Women	4 (29)	3 (37)	
Time after transplantation, years	6.8 (2.6-6.2)	20.7 (13.2-32.5)	< 0.001
Exposure time to immunosuppressive drugs, years	6.8 (2.6-16.2)	10.7 (1.2-16.9)	0.56
First graft, n	11 (79)	7 (88)	1.00
Type of graft, n			1.00
Kidney	13 (93)	8 (100)	
Kidney and pancreas	1 (7)	0 (0)	
Donor type, n			0.12
Cadaveric	13 (93)	5 (63)	
Living	1 (7)	3 (37)	
HLA A-B-DR incompatibilities	4 (0-5)	2 (0-4)	0.13
Primary renal disease, n			0.61
Immunological	4 (29)	1 (13)	
Non immunological	10 (71)	7 (87)	
Cancer, n	1 (7)	1 (13)	1.00
Post graft HLA non DSA immunization, n/n total (%)	3/14 (21)	2/7 (29)	1.00
Post graft DSA immunization, n	0 (0)	0 (0)	1.00
MDRD, ml/mn/1,73m^2	65 (39-94)	60 (24-95)	0.91
Episode of biopsy proven acute rejection, n	0 (0)	0 (0)	1.00
Induction therapy, n/n total (%)	13/13 (100)	4/7 (57)	0.03
T-cell depletion therapy, n	4 (31)	3 (75)	0.25
Basiliximab, n	9 (69)	1 (25)	0.25
Type of immunosuppressive drugs, n			
Tacrolimus,	12 (86)	-	-
Cyclosporine A	2 (14)	-	-
Mycophenolate mofetil	12 (86)	-	-
Azathioprine	0 (0)	-	-
Corticosteroids	2 (14)	-	-
Inhibitor of mTor	0 (0)	-	-
Belatacept	0 (0)	-	-

Data are presented as the median (range) or n (%), unless otherwise indicated.
Immunological renal diseases include Wegener granulomatosis, IgA nephropathy and membranoproliferative glomerulonephritis.
Non immunological diseases include uropathy, nephroangiosclerosis, autosomal dominant polycystic kidney disease, diabetic nephropathy, glomerulonephritis and tubulointerstitial disease.
P values were determined by two-tailed Mann-Whitney test.

CONFIDENTIAL

Table 2. Characteristics of the stable transplant patients according to the post graft DSA immunization

Characteristics	DSA- (n=53)	DSA+ (n=7)	*p*-value
Age, years	51 [33-85]	52 [46-67]	0.55
Male, n	27 (51)	6 (86)	0.12
Deceased donor transplantation, n	53 (100)	6 (86)	0.12
Young age at transplantation (18-35 years), n	14 (26)	0 (0)	0.18
Retransplantation, n	3 (6)	0 (0)	1.00
HLA antibodies non DSA before transplantation, n	15 (28)	2 (29)	1.00
DR-locus mismatches > 0, n	43 (81)	6 (86)	1.00
DQ-locus mismatches > 0, n	39 (74)	6 (86)	0.67
Biopsy proven T-cell mediated rejection, n	6 (11)	1 (14)	1.00
Time of follow-up, years	7.0 [2.0-10.0]	7.7 [3.5-9.4]	0.22

Data are presented as the median (range) or n (%).
P values were determined by two-tailed Mann-Whitney test.

CONFIDENTIAL

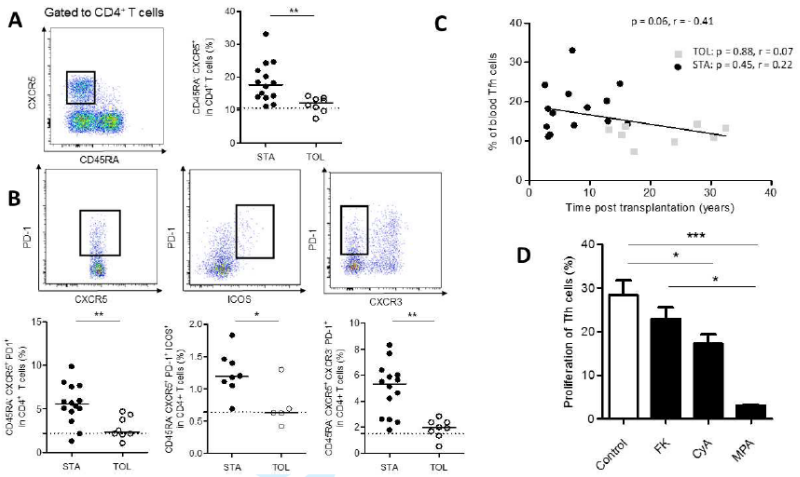


Figure 1. Immunophenotyping of kidney recipient blood Tfh cells. (A and B) Quantification of blood Tfh subsets from STA (n=14) and TOL (n=8). Of note, quantification of blood $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CXCR5^+$ $PD\text{-}1^+$ $ICOS^+$ cells was only performed on 8 STA and 5 TOL patients. The dotted line indicates the median HV value (n=7) *p < 0.05; **p < 0.01; Mann-Withney test. (C) Correlation between the percentage of blood Tfh and time after transplantation (Spearman correlation). (D) Percentage of blood Tfh proliferation after stimulation of PBMCs with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours with or without immunosuppressive drugs (FK=Tacrolimus; CyA=Cyclosporin A; MPA=Mycophenolic acid) (mean +/- SEM, n=7 experiments performed on HV) *p < 0.05; ***p < 0.01; Friedman test.

CONFIDENTIAL

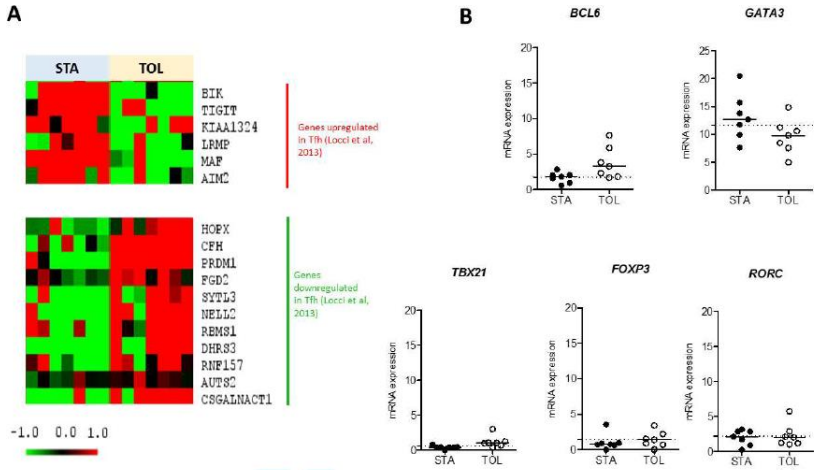


Figure 2. Tfh from TOL exhibit a suppressed Tfh-gene expression profile. Tfh were sorted from STA (n=7) and TOL (n=7) and total RNA was extracted for RNA sequencing. (A) Among the top 100 genes differentially expressed by blood Tfh ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^+PD1^+$ $CXCR3^-$) versus memory CD4 ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^-$) T cells [21], 17 (6 upregulated in Tfh and 11 downregulated) were differentially expressed between TOL and STA ($p < 0.05$) and were hierarchically clustered. Each cell in the matrix corresponds to the expression level of a gene in a sample, with red for over-expression, green for under-expression and black for gene expression close to the median (see color scale). (B) Expression of *BCL6*, *TBX21*, *GATA3*, *RORC* and *FOXP3* in blood Tfh from the STA and TOL groups. Bars represent median value for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7).

CONFIDENTIAL

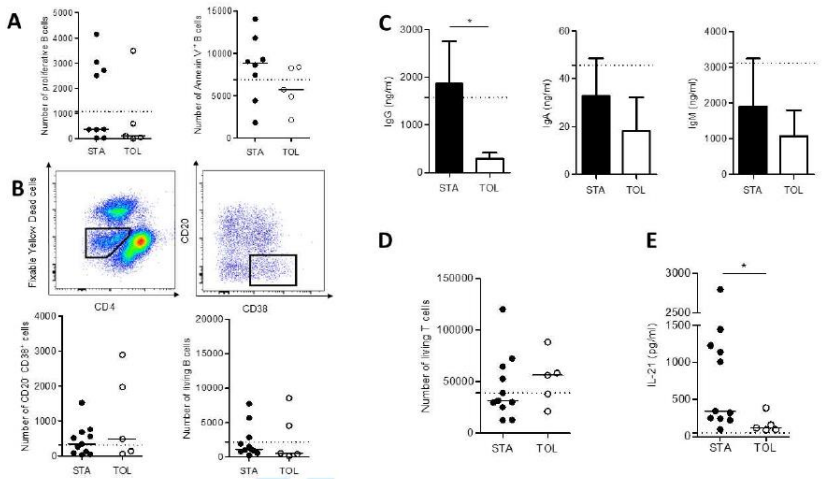


Figure 3. TOL blood Tfh cells display altered *in vitro* function. Purified blood Tfh were cocultured with naive B cells in the presence of the superantigen SEB for 7 days (STA=11, TOL=5). (A) B cell proliferation and B cell apoptosis were analyzed by flow cytometry and plots represent the number of proliferative B cells and the number of apoptotic B cells on day 4. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (B) Plasmablast ($CD4^-$ $CD20^-$ $CD38^+$) differentiation was analyzed on day 7 by flow cytometry using the gating strategy indicated. Plots represent the number of plasmablasts in STA and TOL. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (C) IgG, IgA and IgM production in the T-B cocultures (mean +/- SEM) with the dotted line indicating the mean HV value (n=7). (D) Number of viable Tfh and B cells in cocultures on day 7. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). (E) Plots depict the amount of IL-21 produced (pg/ml) in the supernatant from cocultures on day 7. Bars represent median values for each group and the dotted line indicates the median HV value (n=7). *$p < 0.05$; Mann-Withney test.

CONFIDENTIAL

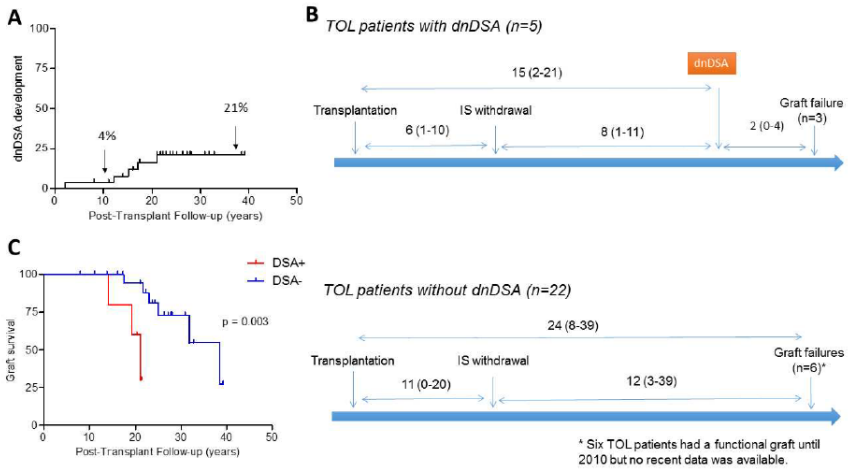


Figure 4. Natural history of TOL according to post graft DSA immunization. (A) Kaplan-Meyer plot of dnDSA-free survival over time post transplantation. (B) Median times with extreme values (years) between transplantation, immunosuppression withdrawal, occurrence of dnDSA and graft failure in TOL. (C) Graft survival probability according to post graft DSA immunization in 27 TOL patients using the Kaplan-Meier method and log-rank test (p=0.003).

CONFIDENTIAL

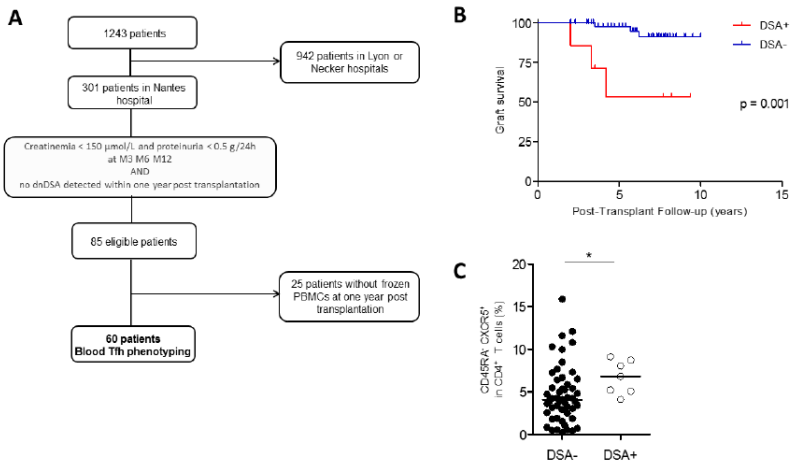


Figure 5. Association between blood Tfh and occurrence of dnDSA in stable transplant patients. (A) Flow chart of patient selection. (B) Graft survival probability according to post graft DSA immunization using the Kaplan-Meier method and the log-rank test (p=0.001). (C) Proportion of blood Tfh at one year post transplantation in stable transplant patients according to post graft DSA immunization. Bars represent median values for each group. *p < 0.05; Mann-Withney test.

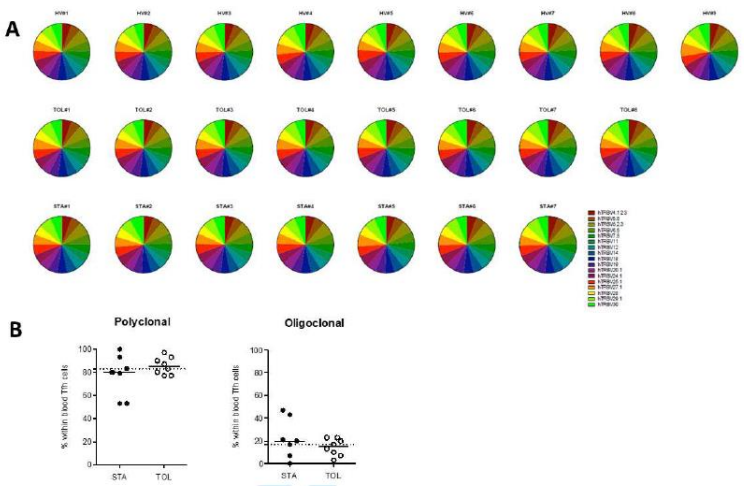
CONFIDENTIAL

Supplementary Table. Significantly enriched genesets (FDR<5%) associated with TOL and STA, respectively, according to GSEA analysis.

	Geneset ID	Geneset description	Size	Normalized Enrichment Score	FDR	
1	GSE36476	CTRL VS TSST ACT 72H MEMORY CD4 TCELL OLD UP	163	2,03	0,003	T cell activation
2	GSE29617	CTRL VS TIV FLU VACCINE PBMC 2008 UP	160	1,94	0,014	
3	GSE29617	CTRL VS DAY3 TIV FLU VACCINE PBMC 2008 UP	168	1,96	0,015	
4	GSE36476	CTRL VS TSST ACT 40H MEMORY CD4 TCELL OLD UP	173	1,84	0,034	T cell activation
5	GSE14769	UNSTIM VS 40MIN LPS BMDM DN	177	1,88	0,036	
6	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 48H CD4 TCELL UP	176	1,85	0,038	Th2 differentiation
7	GSE14769	UNSTIM VS 60MIN LPS BMDM DN	179	1,79	0,042	
8	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 72H CD4 TCELL UP	182	1,79	0,043	Th2 differentiation
9	GSE29617	CTRL VS DAY7 TIV FLU VACCINE PBMC 2008 UP	168	1,82	0,043	
10	GSE17974	0H VS 12H IN VITRO ACT CD4 TCELL UP	183	1,80	0,044	T cell activation
11	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 6H CD4 TCELL UP	182	1,85	0,044	Th2 differentiation
12	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 12H CD4 TCELL UP	183	1,77	0,045	Th2 differentiation
13	GSE18791	CTRL VS NEWCASTLE VIRUS DC 1H DN	132	1,78	0,046	
14	GSE17974	0H VS 48H IN VITRO ACT CD4 TCELL UP	179	1,81	0,046	T cell activation
15	GSE9988	LPS VS VEHICLE TREATED MONOCYTE UP	159	1,77	0,047	
16	GSE36476	CTRL VS TSST ACT 40H MEMORY CD4 TCELL YOUNG UP	191	1,80	0,047	T cell activation
17	GSE36476	CTRL VS TSST ACT 72H MEMORY CD4 TCELL YOUNG UP	196	1,81	0,047	T cell activation
18	GSE17974	0H VS 24H IN VITRO ACT CD4 TCELL UP	177	1,85	0,047	T cell activation
19	GSE9988	LOW LPS VS VEHICLE TREATED MONOCYTE UP	163	1,78	0,047	
20	GSE24081	CONTROLLER VS PROGRESSOR HIV SPECIFIC CD8 TCELL UP	163	1,76	0,047	
21	GSE14769	UNSTIM VS 80MIN LPS BMDM DN	170	1,80	0,049	

	Geneset ID	Geneset description	Size	Normalized Enrichment Score	FDR	
1	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 4H CD4 TCELL DN	184	1,93	0,047	Th2 differentiation
2	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 2H CD4 TCELL DN	189	1,92	0,029	Th2 differentiation
3	GSE29617	CTRL VS TIV FLU VACCINE PBMC 2008 DN	185	1,88	0,050	
4	GSE17974	0H VS 2H IN VITRO ACT CD4 TCELL DN	183	1,86	0,048	T cell activation
5	GSE22886	NAIVE CD4 TCELL VS 12H ACT TH2 DN	197	1,86	0,042	Th2 differentiation
6	GSE22886	NAIVE CD4 TCELL VS MEMORY TCELL DN	191	1,86	0,037	T cell activation
7	GSE24634	NAIVE CD4 TCELL VS DAY10 IL4 CONV TREG DN	198	1,85	0,037	
8	GSE22886	NAIVE CD4 TCELL VS 12H ACT TH1 DN	191	1,83	0,043	T cell activation
9	GSE22886	NAIVE CD4 TCELL VS 48H ACT TH2 DN	187	1,82	0,044	Th2 differentiation
10	GSE37416	0H VS 3H F TULARENSIS LVS NEUTROPHIL UP	191	1,82	0,044	
11	GSE29617	CTRL VS DAY3 TIV FLU VACCINE PBMC 2008 DN	182	1,81	0,044	
12	GSE13485	DAY1 VS DAY21 YF17D VACCINE PBMC DN	176	1,81	0,045	
13	GSE22886	CD8 VS CD4 NAIVE TCELL UP	194	1,81	0,042	
14	GSE15930	NAIVE VS 48H IN VITRO STIM IFNAB CD8 TCELL DN	195	1,80	0,042	
15	GSE17974	0H VS 4H IN VITRO ACT CD4 TCELL DN	182	1,80	0,040	T cell activation
16	GSE17974	1H VS 72H UNTREATED IN VITRO CD4 TCELL DN	191	1,79	0,040	T cell activation
17	GSE22886	UNSTIM VS STIM MEMORY TCELL DN	195	1,79	0,042	T cell activation
18	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 6H CD4 TCELL DN	180	1,79	0,038	Th2 differentiation
19	GSE17974	0H VS 72H IN VITRO ACT CD4 TCELL DN	191	1,79	0,038	T cell activation
20	GSE24634	NAIVE CD4 TCELL VS DAY5 IL4 CONV TREG DN	197	1,79	0,037	
21	GSE22886	NAIVE CD4 TCELL VS 48H ACT TH1 DN	196	1,78	0,041	T cell activation
22	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 1H CD4 TCELL DN	176	1,77	0,043	Th2 differentiation
23	GSE22886	IGM MEMORY BCELL VS BLOOD PLASMA CELL DN	197	1,76	0,046	
24	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 24H CD4 TCELL DN	188	1,76	0,045	Th2 differentiation
25	GSE17974	CTRL VS ACT IL4 AND ANTI IL12 12H CD4 TCELL DN	186	1,76	0,047	Th2 differentiation
26	GSE17974	0.5H VS 72H IL4 AND ANTI IL12 ACT CD4 TCELL DN	178	1,75	0,047	Th2 differentiation

CONFIDENTIAL



Supplementary Figure 1. Absence of clonal selection in blood Tfh from TOL and STA. Blood Tfh were purified from TOL (n=8) and STA (n=7). TCR Vβ usage was assessed by (A) the quantification of 17 Vβ families by qRT-PCR and (B) the analysis of the CDR3 length distribution of 30 Vβ families. Transcript expression of each individual Vβ family was normalized to the expression of a reference gene. The pie chart represents the relative abundance of each Vβ family within each individual. The CDR3 length distribution of each Vβ family was classified in a non-biased manner as either polyclonal or oligoclonal. Each point represents the frequency of the typology of each Vβ family of each individual and the dotted line indicates the median HV value (n=9).

CONFIDENTIAL

3) Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence un défaut quantitatif et qualitatif des TFHc chez les patients TOL comparés aux patients STA, qui pourrait être à l'origine du défaut de différenciation des LB de ces mêmes patients décrit dans l'étude de Chesneau et al. [44]. A notre connaissance, aucune autre équipe ne s'était intéressée aux TFHc chez les patients opérationnellement tolérants. Pour cette étude, nous avons comparé les TOL uniquement à des patients ayant une fonction stable sous immunosuppresseurs. Ce choix du groupe contrôle s'est basé sur le fait que les STA représentent une population d'intérêt dans la perspective d'une potentielle stratégie de minimisation des immunosuppresseurs, contrairement aux patients avec un rejet aigu ou chronique qui nécessitent au contraire une majoration de leurs traitements immunosuppresseurs. Nous avons également étudié un groupe d'individus sains sans immunosuppresseurs, puisque plusieurs études ont montré que les patients TOL présentent des similitudes avec les volontaires sains [33,34,42,43,76]. Deux notions importantes sont à mettre en avant dans cette première partie: le défaut quantitatif et qualitatif des TFHc chez les patients TOL, avec une potentielle implication dans la balance tolérogène, et le rôle prédictif des TFHc dans l'immunisation post-greffe.

a) Défaut quantitatif et qualitatif des TFHc chez les patients tolérants

Nous avons observé dans un premier temps une réduction du taux de TFHc chez les TOL comparés aux patients STA, avec une diminution des TFHc exprimant les marqueurs ICOS et PD-1 qui sont définis comme une sous-population de TFH activés [52,59,60], mais aussi une diminution des TFHc $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$. Cette sous-population $CXCR3^-$ $PD\text{-}1^+$ possède le même

profil phénotypique et fonctionnel que les TFH du centre germinatif, et est décrite comme étant la population de TFHc la plus fonctionnelle [60]. L'analyse transcriptomique réalisée va dans le même sens que cette analyse phénotypique puisque nous observons une signature TFH moins marquée chez les TOL, en accord avec la diminution du taux de TFHc. Pour définir la signature TFH, nous avons utilisé la liste des 100 gènes les plus différentiellement exprimés entre les TFHc et les non TFH chez des volontaires sains publiée par Locci et al. [60].

De façon intéressante, le défaut quantitatif des TFHc chez les TOL est également associé à un défaut fonctionnel *in vitro*. Pour tester la fonction des TFHc, nous avons tout d'abord regardé la polarisation des TFHc. Morita et al. ont décrit des TFHc type TH1, TH2 et TH17 selon leur expression de CXCR3 et CCR6, leur expression de facteurs de transcription et leur sécrétion cytokinique après stimulation polyclonale. Ainsi, les TFHc type TH2 ($CXCR3^-$ $CCR6^-$) et TH17 ($CXCR3^-$ $CCR6^+$) ont une capacité plus importante à induire la différenciation des LB *in vitro* que les TFHc type TFH1 [59]. Dans notre étude, nous n'avons pas pu réaliser l'immunomarquage avec l'anticorps anti-CCR6 pour des raisons techniques. Aussi, l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription correspondant aux différentes sous-populations TH1, TH2 et TH17 (*Tbet*, *GATA3* et *RORγt* respectivement) n'est pas différente dans les TFHc des TOL comparés aux STA. Nous avons également réalisé une analyse type GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) qui permet d'interpréter les résultats d'analyse différentielle à l'aide de différentes sources d'informations biologiques [77]. Cette analyse a mis en évidence un profil TH2 des TFHc des TOL, ce qui a été confirmé par une sécrétion de cytokines TH2 (IL-4, IL-5 et IL-13) plus importante chez les TOL après une stimulation polyclonale par PMA/ionomycine (résultat non présenté). Ainsi, nous pouvons conclure que les TFHc des TOL ont un profil TH2 et sont donc fonctionnelles

intrinsèquement. Nous avons poursuivi notre analyse fonctionnelle des TFHc en utilisant un modèle de coculture TFHc/LB bien défini dans la littérature, avec une activation par un superantigène staphylococcique SEB (endotoxin-reduced Staphylococcal Enterotoxin B) qui permet de mettre en contact le CMH du LB avec le TCR des TFHc [59,60]. Nous avons observé chez les TOL une diminution de la sécrétion d'immunoglobulines G (IgG) par les LB en coculture avec les TFHc, suggérant un défaut fonctionnel des TFHc en présence des LB. Il est clairement établi chez l'animal que le développement et le maintien des TFH sont dépendants d'une interaction avec les LB [73,78]. En revanche, cette interaction est moins bien connue chez l'Homme. Chavele et al. ont récemment décrit un effet des plasmablastes sur la différenciation des TFH, avec un mécanisme dépendant de l'IL-6 [79]. Cependant, nos résultats ne vont pas dans ce sens étant donné l'absence de différence retrouvée dans nos cocultures en terme de nombre de plasmablastes et de sécrétion d'IL-6 (résultats non présentés).

Ce défaut fonctionnel est associé à une sécrétion moindre d'IL-21 par les TFHc, qui est une cytokine indispensable pour la prolifération, la survie et la différenciation des LB [54]. Ce résultat corrobore les études rapportant un défaut de production d'Ig par les LB en coculture avec les TFHc après blocage de l'IL-21 [59,75]. De façon intéressante, les TFHc des patients TOL secrètent l'IL-21 de façon similaire aux TFHc des STA après une stimulation polyclonale par PMA/ionomycine en l'absence d'interaction avec les LB (résultat non présenté), ce qui suggère un possible mécanisme d'anergie des TFHc en présence des LB autologues. L'anergie correspond à une inactivation fonctionnelle des LT les rendant incapables d'induire une réponse immune après contact avec un antigène. Dans un modèle d'induction de tolérance chez des patients recevant une greffe rénale combinée à une greffe de moelle osseuse, les auteurs ont décrit une absence complète de réponse anti-donneur spécifique à 3 ans et ont

suggéré que le maintien de la tolérance était secondaire à un mécanisme d'anergie des LT [80]. D'autres explorations sont néanmoins nécessaires pour mieux appréhender ce mécanisme spécifiquement dans les TFH. Aussi, la sécrétion moindre d'IL-21 par les TFHc des TOL renforce l'intérêt potentiel du blocage de l'IL-21 en transplantation. Plusieurs études se sont intéressées à l'efficacité du blocage de l'IL-21 dans les maladies auto-immunes [81], mais le rôle de ce blocage en transplantation reste à élucider [82,83]. Petrelli et al. ont démontré dans un modèle murin de greffe d'ilots pancréatiques que le traitement associant CTLA4-Ig et l'anticorps anti-IL-21 aboutissait à un état de tolérance stable du greffon [84].

Afin d'approfondir la caractérisation des TFHc chez les TOL, nous avons analysé leur répertoire du TCR. L'analyse du répertoire TCR apporte des informations importantes sur les mécanismes de la réponse immune et possède de nombreuses implications en transplantation [85]. Une altération du répertoire TCR a ainsi été démontrée chez des patients avec un rejet humoral, ce qui était de façon intéressante corrélée aux lésions histologiques du greffon [86]. A l'inverse, les LT des patients TOL présentent un répertoire TCR Vβ polyclonal [86], ce qui va dans le sens de nos résultats obtenus sur une sous-population effectrice de LT. D'autre part, cette méthode d'analyse du répertoire TCR a été utilisée pour détecter les clones de LT allo-réactifs dans un modèle de tolérance induite chez l'Homme. Les auteurs ont observé une diminution des clones LT allo-réactifs en post-greffe chez les patients tolérants, alors qu'aucune diminution n'était observée chez les patients non-tolérants. Ainsi, l'identification avant la greffe de clones LT allo-réactifs présente un intérêt pour détecter une réponse allo-immune en post-greffe [87]. Cependant, concernant les patients opérationnellement tolérants, la spécificité allogénique reste difficile à étudier étant donné l'absence de cellules du donneur disponibles.

Une des limites de ce travail concerne la différence de temps post-transplantation entre les TOL et les STA (20.7 vs 6.8 ans), qui pourrait potentiellement biaiser le taux de TFHc. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le temps post-greffe et le taux de TFHc dans notre étude. Aussi, en utilisant une cohorte indépendante issue de la base de données DIVAT, nous n'avons pas observé de différence en terme de pourcentage de TFHc chez des patients STA avec un temps post-transplantation de 5 ans vs 15 ans (résultat non présenté). Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec une étude portant sur les Treg chez les TOL qui ne retrouvait la non plus aucune association entre le temps post-transplantation et le taux de Treg [88].

b) Rôle des TFHc dans le processus de tolérance opérationnelle : une autre pierre à l'édifice dans la balance tolérogène

Nous suggérons ici que le maintien du processus de tolérance opérationnelle est un mécanisme actif qui met en jeu différentes populations cellulaires et où la balance pro-tolérogène en faveur de populations régulatrices et au détriment de populations effectrices pourrait jouer un rôle. Ainsi, on observe chez les patients TOL d'un côté un défaut quantitatif et fonctionnel de la population effectrice T $CD8^+$ $CD28^-$ cytotoxique [76] associé à une diminution du taux de plasmocytes effecteurs capable de sécréter des anticorps potentiellement délétères [44] ; et d'un autre côté, on observe une augmentation du taux de LB régulateurs (LB reg) [45] et LT régulateurs (LT reg) [41,88]. La balance LB reg/LB effecteurs semble d'ailleurs capitale dans le mécanisme de tolérance, et est bien détaillée dans une revue publiée par Coelho et al. [89]. Concernant le compartiment des LT $CD4^+$, le défaut des

TFHc observé dans ce travail pourrait s'intégrer dans une balance tolérogène, étant donnée l'augmentation des LT reg observée chez ces même patients tolérants [88]. Il est à l'heure actuelle difficile de savoir si la balance tolérogène est une cause ou un effet de la tolérance opérationnelle. Il s'agit en tout cas d'un équilibre fragile, pouvant être rompu à tout moment, comme le témoigne le nombre non négligeable de patients TOL qui dégradent leur fonction rénale [32,35]. Il est à l'heure actuelle capitale de prendre en compte cette homéostasie cellulaire dans les traitements immunosuppresseurs utilisés. En effet, alors que les traitements conventionnels ciblent de façon non spécifique les LT effecteurs et les LT reg, de nouvelles stratégies visant à préserver les LT reg ouvriraient de nouvelles perspectives dans le domaine de la transplantation [90]. Enfin, il est évident que des études fonctionnelles sont primordiales pour définir précisément le rôle de chacune de ces populations dans la balance tolérogène.

c) Les TFHc : rôle prédictif dans l'apparition des DSA ?

L'impact délétère des DSA sur la fonction du greffon est clairement démontré depuis plusieurs années en transplantation rénale, que ce soit pour des DSA présents avant la greffe [91,92], ou apparus en post-greffe [93-98]. Près d'un quart des patients transplantés vont développer des DSA dans les 10 post-greffe [99]. Ces observations justifient une technique de détection hautement sensible et spécifique, avec à l'heure actuelle la technique Luminex Haute Définition qui est la technique de référence largement répandue dans tous les laboratoires d'histocompatibilité modernes. Plus récemment, certaines équipes se sont intéressées aux DSA qui fixent le complément C1q, et donc qui ont une action cytotoxique [100]. Loupy et al. ont rapporté dans une large cohorte de 1016 patients, que ceux avec des

DSA fixant le C1q dans la première année post-transplantation avaient une moins bonne survie du greffon à 5 ans et un taux de rejet humoral plus élevé comparés aux patients sans DSA [101].

Par ailleurs, Wiebe et al. ont proposé un modèle d'histoire naturelle des DSA avec initialement des événements inflammatoires secondaires à la transplantation, puis l'apparition des DSA sans lésions histologiques, puis le stade infra-clinique avec des lésions de la microcirculation, et enfin un retentissement clinique avec une dysfonction du greffon [93] (Figure 6). Concernant la période précédant l'apparition des DSA, il a été suggéré que des évènements inflammatoires tels que des épisodes de rejet ou des infections induisaient une production d'IFN-γ, responsable d'une surexpression d'HLA sur les cellules endothéliales et d'une stimulation de la reconnaissance par les LB avec la formation de plasmocytes sécréteurs de DSA [93,102,103].

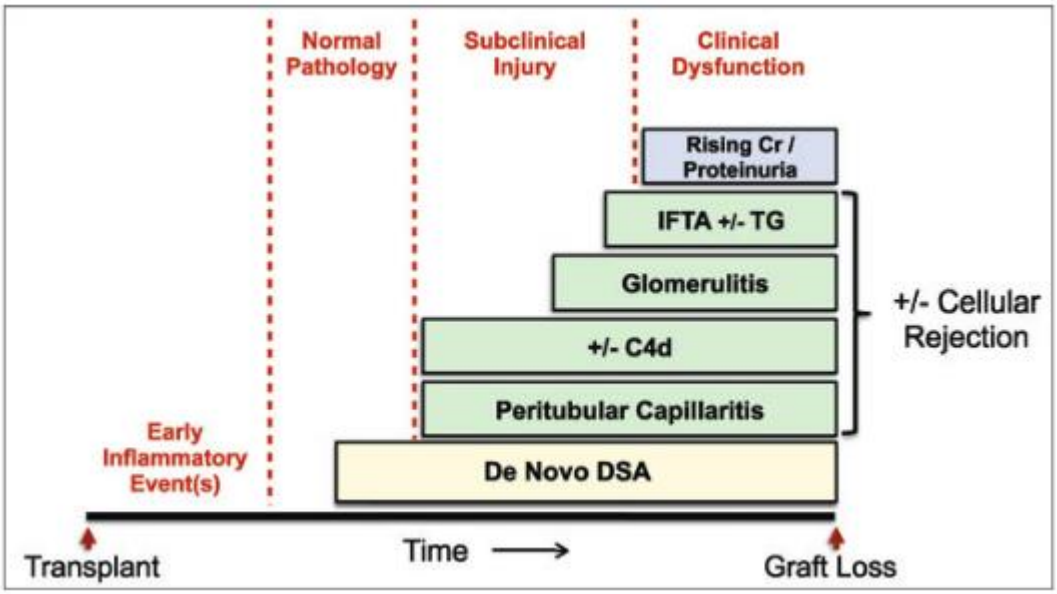


Figure 6: Histoire naturelle de l'apparition des DSA *de novo* aboutissant à la perte du greffon.

DSA: anticorps anti-HLA spécifiques contre le donneur. IFTA : interstitial fibrosis and tubular atropy. TG : transplant glomerulopathy. Adapté selon [93]

Concernant les patients TOL, nous avons mis à jour l'étude descriptive de 2012 [32], en focalisant sur les DSA et sur la survie du greffon. Seuls 5 TOL sur 27 (19%) ont développé des DSA dans un délai médian post-greffe de 15 ans, et 1 seul dans les 10 premières années post-greffe. A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir mis en évidence un impact délétère des DSA sur la survie du greffon chez les patients TOL. Nous suggérons donc un lien entre le défaut quantitatif et qualitatif des TFHc et la faible incidence d'immunisation post-greffe retrouvée chez les TOL. Ce lien est cependant difficile à confirmer du fait du nombre très limité de patients TOL avec des DSA. C'est pour cette raison que nous avons étudié cette question sur une cohorte de patients STA immunisés et non immunisés. Notre hypothèse était que si la diminution des TFHc était associée à une faible incidence

d'immunisation post-greffe, alors à l'inverse, une augmentation des TFHc (activés par les évènements inflammatoires décrits ci-dessus ?) pourrait être associée à l'apparition des DSA. Nous avons ainsi observé une augmentation du taux de TFHc à 1 an post-greffe chez les patients qui vont développer ultérieurement des DSA, suggérant une potentielle implication des TFHc dans l'immunisation post-greffe.

Cependant, il convient de rappeler que le rejet humoral chronique est un processus continu et dynamique. Il existe ainsi une fluctuation du taux de DSA dans le temps, qui s'accompagne d'une détection fluctuante du C4d et du score de glomérulite et/ou capillarite entre différentes biopsies successives [98]. Même si les TFHc pourraient intervenir à un stade plus précoce, il est indispensable de pouvoir monitorer de façon plus étroite la cinétique du taux de TFHc à différents temps post-transplantation afin d'ajuster avec un modèle utilisant une covariable temps-dépendant. Cette démarche a d'ailleurs été utilisée de façon intéressante par Shabir et al. qui ont mis en évidence un rôle protecteur des LB transitionnels dans l'apparition du rejet aigu en utilisant un modèle ajusté avec une covariable temps-dépendant [104].

4) Perspectives

Ce travail concernant l'analyse des TFHc chez les patients opérationnellement tolérants constitue une avancée dans la compréhension des mécanismes de tolérance. Plusieurs perspectives de travail débouchent de cette analyse.

a) Analyser l'interaction entre les différentes populations cellulaires

La mise en évidence d'un défaut des TFHc chez les TOL pose la question de l'interaction entre les différents types cellulaires. Certaines études suggèrent par exemple une coopération étroite entre LB reg et LT reg [105], entre LB reg et TFH [73], ou encore ente LT reg et TFH [106], permettant de réguler les réponses immunes. Mais cette coopération chez les patients TOL n'a pour le moment jamais été décrite. En utilisant des modèles de coculture *in vitro* avec ces 3 populations cellulaires, nous analyserons l'impact d'une des populations sur la fonction des 2 autres chez les patients TOL. Aussi, nous réaliserons un modèle *in vitro* d'induction des TFHc en présence ou non de LB reg et/ou LT reg, et enfin nous étudierons l'impact de la déplétion des TFHc *in vitro* sur la fonction régulatrice des LB (sécrétion d'IL-10, granzyme B, …) et/ou des LT.

b) Identifier les TFH dans le greffon

Seule la population TFH circulante est étudiée dans ce travail, ce qui représente une image partielle de ce qui se passe notamment dans les ganglions, ou encore dans le greffon. Dans l'étude de De Graav et al., les TFH sont retrouvés dans le greffon des patients avec un rejet

cellulaire et forment avec les LB une structure pseudo-folliculaire [75]. Après avoir mis au point le marquage cellulaire permettant de mettre en évidence en immunofluorescence les TFH dans les biopsies de patient avec un rejet humoral (Figure 7), nous comparerons les biopsies de patient TOL ayant dégradé leur fonction rénal du fait d'un rejet immunologique avec des biopsies de TOL dégradant leur fonction sans cause immunologique retrouvée. L'objectif est de mettre en évidence la présence de TFH intra-greffon en quantité plus importante chez les TOL dégradant leur fonction pour cause immunologique.

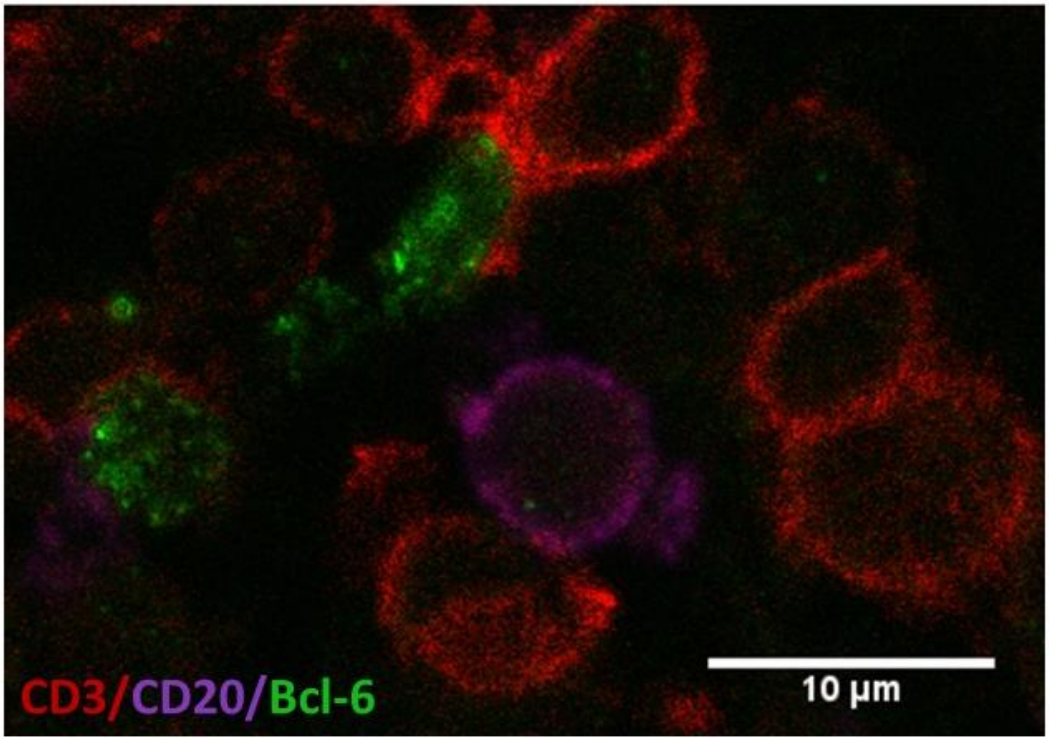


Figure 7: Mise en évidence des TFH par immunofluorescence dans une biopsie de patient transplanté rénal présentant un rejet humoral.

Les TFH, définis ici par les marquages $CD3^+$ (rouge) et $Bcl\text{-}6^+$ (vert), se retrouvent à proximité des LB $CD20^+$ (violet).

c) Confirmer le rôle prédictif des TFHc dans l'apparition des DSA

Bien que très intéressante et originale, notre observation concernant le lien entre l'augmentation des TFHc à 1 an de la greffe et l'apparition des DSA est à pondérer du fait du nombre limité de patients inclus (60 dont 7 qui ont développé des dnDSA) et de l'absence d'ajustement statistique sur des paramètres pouvant influencer ce résultat. Ainsi, notre objectif est de confirmer ce résultat sur une cohorte plus importante avec une méthode statistique plus robuste.

Nous avons donc utilisé la base de données DIVAT (Données Informatisées et Validées en Transplantation) pour obtenir notre cohorte de patients. Les critères d'inclusion étaient :

- greffe rénale réalisée à Nantes ;
- pas de DSA retrouvé avant ni pendant la première année de greffe ;
- sérum et PBMC disponibles à J0 et 1 an de greffe.

Nous avons recensé 272 patients, greffés entre mars 2004 et décembre 2011, pour qui nous avons obtenus les données démographiques, cliniques et les paramètres de survie (fonction du greffon, survie du patient). Parmi ces patients, 63 (23%) ont développé des DSA dans un délai moyen de 6 ans post-greffe.

Pour chaque patient, nous avons déjà réalisé un immuno-phénotypage complet des TFHc et des sous-populations TFHc à J0 et 1 an post-greffe à partir de PBMC congelées, et nous sommes en attente de l'analyse statistique, réalisée en collaboration avec Matthieu Hanf (Chef de projet épidémiologiste, EC-CIC 1413, Nantes). Les objectifs de cette étude sont donc :

1) Rechercher les facteurs démographiques, cliniques et biologiques associés au risque d'immunisation post-greffe en se basant sur une analyse multivariée ;

2) Identifier une valeur seuil de TFHc capable de prédire l'apparition des DSA en utilisant une courbe ROC (receiver-operating characteristic curve) ;

3) Etablir un score clinico-biologique prédictif de l'apparition des DSA en post-greffe ;

4) Analyser l'association entre l'immunisation post-greffe et la fonction (rejet humoral, survie du patient).

Ainsi, nous espérons confirmer le rôle prédictif des TFHc dans l'apparition des DSA dans une plus large cohorte de patients, ce qui représenterait une donnée capitale en transplantation rénale. Cette observation pourrait permettre d'utiliser les TFHc comme biomarqueurs de l'apparition des DSA, et donc de mieux cibler les patients à risque de rejet humoral.

PARTIE 2

1) Objectifs et présentation du travail

Après avoir mis en évidence la présence de TFHc avec un profil particulier chez les patients TOL, la deuxième partie de cette thèse a consisté à étudier les interactions potentielles entre les TFHc et les LB chez ces patients. Nous avons réalisé une analyse transcriptomique des TFHc chez les patients TOL par séquençage à haut débit de l'ARN (RNA sequencing ou RNA-Seq) et les avons comparés aux patients STA et aux individus sains. Une partie de cette analyse a permis de mieux caractériser les TFHc des TOL et a été détaillée dans l'article exposée dans la première partie de la thèse. Dans cette deuxième partie, nous avons cherché à identifier des gènes différentiellement exprimés par les TFHc des patients TOL comparés aux TFHc des patients transplantés STA ou des volontaires sains, afin de mettre en évidence des molécules exprimées par les TFHc potentiellement intéressantes dans l'interaction avec les LB et qui pourraient être impliquées dans mes mécanismes de tolérance en transplantation.

2) Méthodes

a) RNA-Seq

L'isolement des TFHc ainsi que l'extraction de l'ARN ont été détaillés dans l'article en cours de révision présenté dans la première partie de la thèse. Pour l'analyse transcriptomique des TFHc, nous avons opté pour un séquençage haut débit par RNA-Seq. Cette analyse a été effectuée par la plate-forme transcriptomique du Broad Institute (Harvard, Boston, USA), à partir du protocole SmartSeq2 [107-109]. En résumé, après une étape de purification de l'ARN en utilisant la technique de bille paramagnétique SPRI® (Immobilisation réversible en phase solide), l'ARN poly-(A) est converti en ADNc qui est par la suite amplifié. L'ADNc est ensuite fragmenté en de nombreuses séquences génomiques appelées « reads », qui vont être « alignées » sur le génome humain pour rechercher dans le génome la position d'une séquence de gêne similaire à celle du « read ». Le nombre de « reads » est ainsi proportionnel à l'abondance des gènes dans la cellule. L'expression de chaque gène est exprimée en FPKM (Fragments Per Kilobase Million).

b) Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en collaboration avec Caroline Le Gall, société Methodomics (Toulouse). L'objectif premier de cette analyse était de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre les 3 groupes d'individus. Pour cela, deux méthodes descriptives ont été utilisées : l'analyse en composante principale (ACP) et la sparse PLS-DA (Partial-least-squares Discriminant Analysis). Le principe de l'ACP est d'étudier

un nombre important de variables (ici les gènes) pour en faire un graphique global, en 2 dimensions, en se basant sur la dispersion des données entre les groupes d'individus. La PLS-DA est autre méthode multidimensionnelle qui permet d'identifier les gènes contribuant le plus à la discrimination des groupes en prenant en compte la structure de corrélation entre les gènes. Cette approche est non-paramétrique dans le sens où elle ne s'appuie sur aucune loi statistique. La version sparse de la PLS-DA permet de se concentrer sur les gènes les plus importants dans l'explication de la variabilité entre les groupes. Pour la sparse PLS-DA, un nombre maximum de gènes à inclure est fixé pour minimiser le taux d'erreur grâce à des techniques de validation non détaillées ici.

Deux méthodes seront par la suite utilisées pour sélectionner certains gènes parmi ceux différentiellement exprimés : une méthode statistique avec un test de comparaison de moyenne (ANOVA ou Kruskall Wallis selon la normalité ou non des données) puis un ajustement des probabilités de significativité selon la méthode de Benjamini-Hochberg, et une méthode basée sur le serveur de recherche bibliographique Pubmed réalisée en collaboration avec le Dr Chaussabel (Benaroya Research Institute, Seattle, USA).

3) Résultats

a) Préparation des données

Nous avons obtenu l'expression de 21950 gènes dans les TFHc des patients TOL (n=7), patients transplantés stable sous immunosuppresseur STA (n=7), et des individus normaux HV (n=7). La première étape de l'analyse a consisté à préparer les données puisque plus de 3000 gènes n'étaient pas exprimés par les TFHc (Figure 8). Aussi, certains gènes présentaient des valeurs atypiques d'expression au sein d'un groupe d'échantillons. Au total, l'analyse a été effectuée sur 16273 gènes.

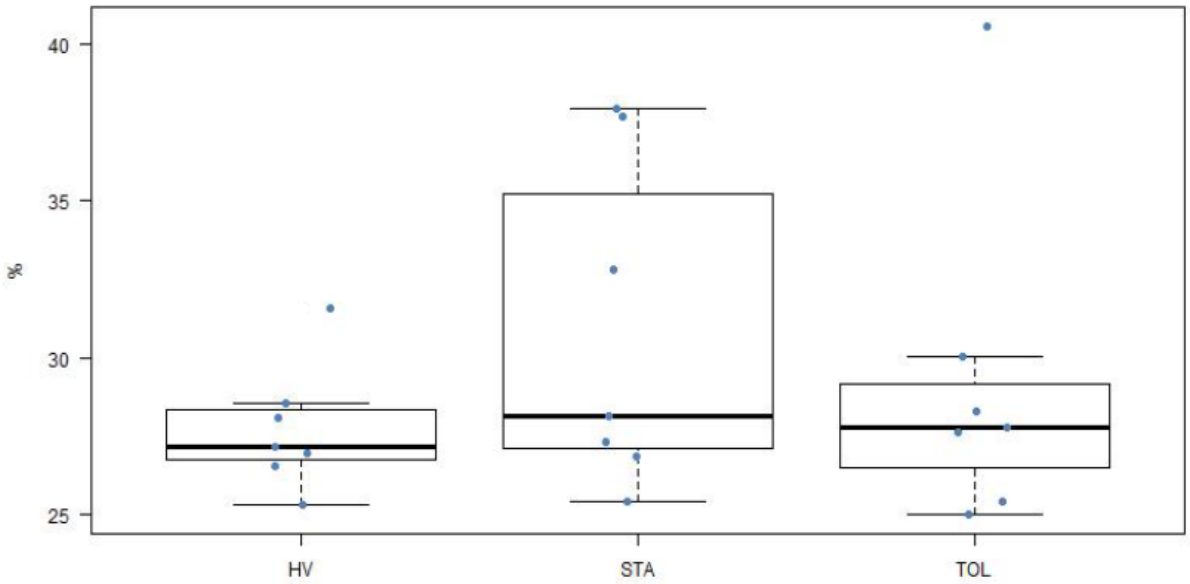


Figure 8: Pourcentage de valeurs nulles par groupe sur l'ensemble des gènes.

Chaque point bleu représente le taux de valeurs nulles d'un échantillon dans les 3 groupes.

b) Analyse multidimensionnelle

L'objectif premier de cette analyse était de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre les 3 groupes d'individus. Cependant, du fait du nombre important de gènes, l'ajustement des probabilités ne permettait pas de conclure de façon significative. Ainsi, 2 approches multidimensionnelles ont été utilisées : l'ACP et la sparse PLS-DA.

La figure 9 permet de visualiser les patients selon l'ACP (Figure 9). L'ACP, qui fonctionne sans connaissance à priori des 3 groupes cliniques, ne permettait pas de discriminer « en aveugle » les groupes. En effet, les groupes HV et TOL semblent s'opposer sur l'axe vertical, alors que l'axe horizontal a tendance à isoler 4 patients STA.

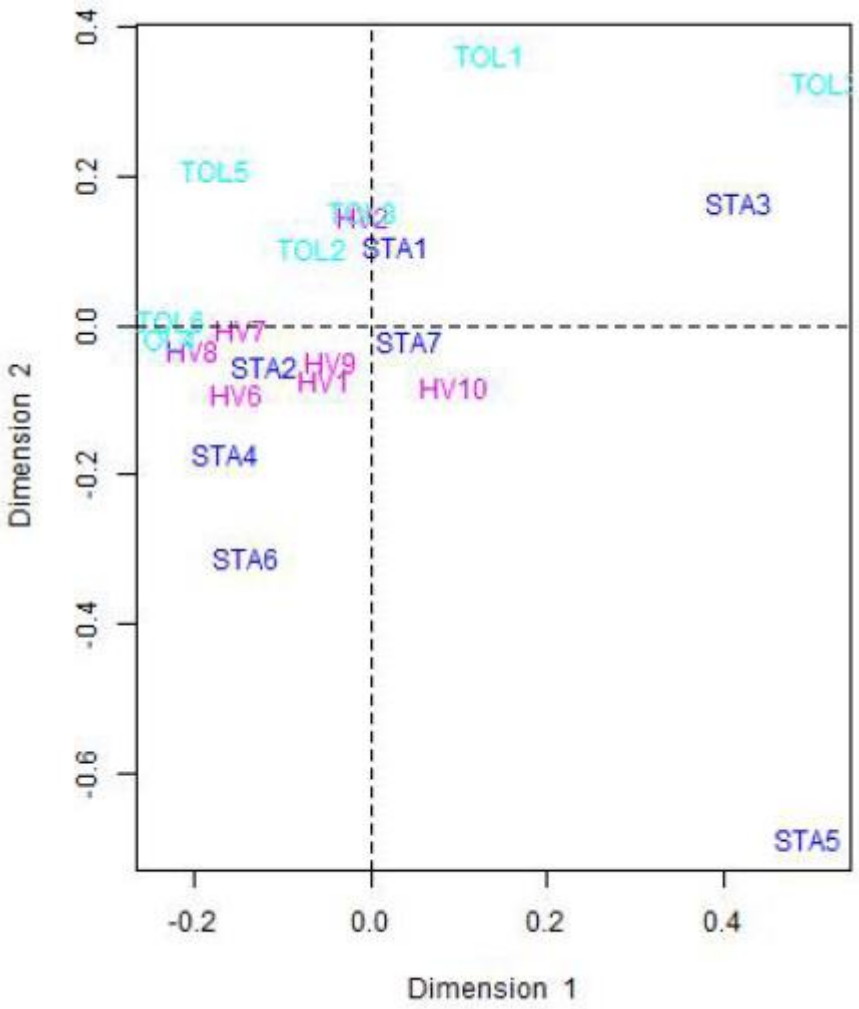


Figure 9: Représentation des patients dans l'ACP

Pour la méthode de la sparse PLS-DA, nous rappelons qu'un nombre maximal de gènes doit être fixé au préalable pour permettre d'optimiser au mieux la discrimination entre les groupes. Ce seuil, établi grâce à des algorithmes non détaillés ici, a été fixé à 400 gènes. Ainsi, la sparse PLS-DA a permis de sélectionner les 400 gènes les plus discriminants, avec une très belle discrimination, et sans procéder à des tests statistiques (Figure 10).

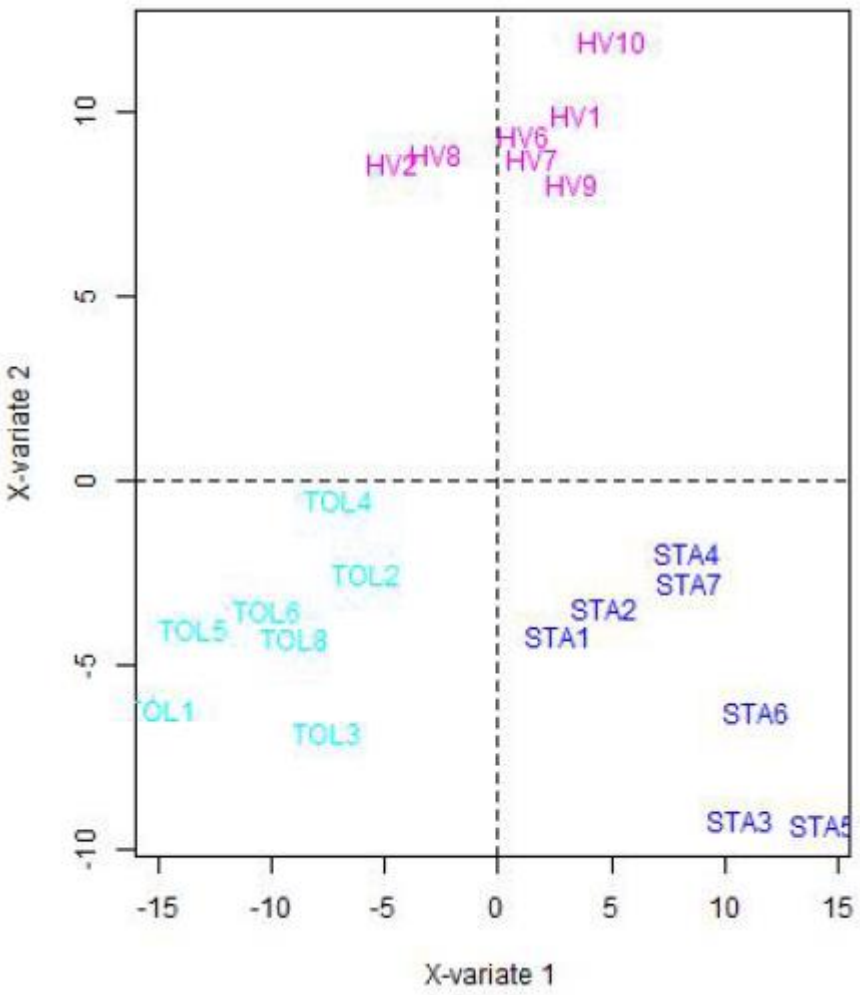


Figure 10: Représentation des patients dans la sparse PLS-DA.

Après cette pré-sélection des gènes via la sparse PLS-DA, l'analyse différentielle a pu être réalisée avec la comparaison des moyennes d'expression de ces 400 gènes dans les 3 groupes. Parmi ces gènes, 338 sont différentiellement exprimés entre les 3 groupes après ajustement.

c) Sélection des gènes d'intérêt

Pour restreindre le nombre de gènes, nous avons réalisé un diagramme de Venn qui nous a permis de sélectionner les 105 différentiellement exprimés entre les TOL et les HV et entre les TOL et STA, ce qui correspond à l'intersection des cercles HV-TOL et STA-TOL sur le diagramme de Venn ci-dessous (Figure 11).

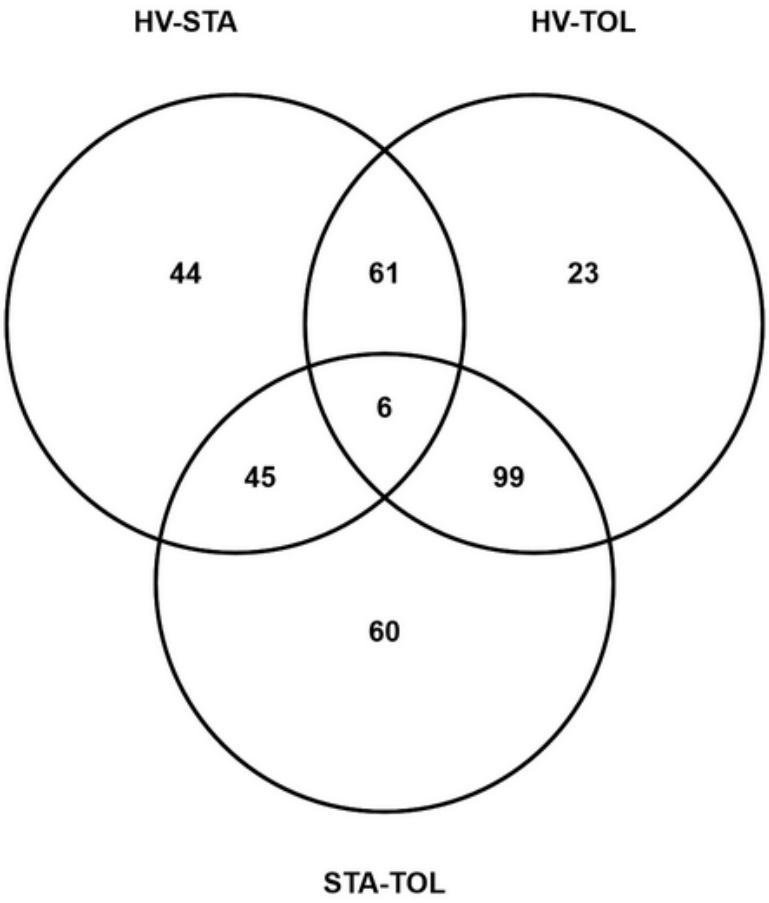


Figure 11: Diagramme de Venn illustrant les gènes différentiellement exprimés entre les 3 groupes issus de la sparse PLS-DA.

Les cercles HV-STA, HV-TOL et STA-TOL comprennent les gènes différentiellement exprimés entre HV et STA, entre HV et TOL, et entre STA et TOL respectivement.

Deux stratégies ont été utilisées par la suite pour finaliser la sélection des gènes d'intérêt. La première stratégie a consisté à choisir les gènes d'intérêt en fonction de leur niveau de significativité après ajustement avec un seuil fixé à priori à < 0.001. Seuls 6 gènes ont présenté ce critère de sélection (Tableau 3).

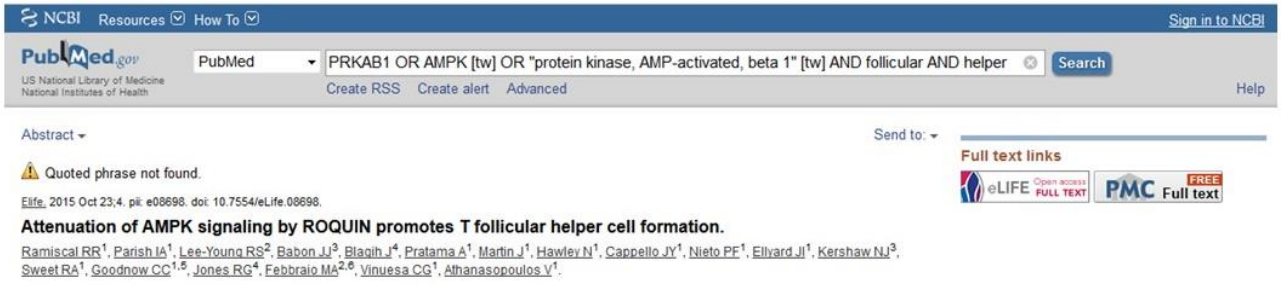
Gènes	p-value	Moyenne d'expression HV	Moyenne d'expression STA	Moyenne d'expression TOL
WHAMM	0,002	4,010	3,012	6,100
AXL	0,002	0,467	0,567	1,425
TANC2	0,002	1,812	0,897	2,491
NUP43	0,008	8,640	10,576	4,628
FCGBP	0,008	0,351	0,079	0,211
GTF2E1	0,009	12,868	13,506	6,533

Tableau 3: Gènes différentiellement exprimés entre les TOL et les HV mais aussi entre les TOL et STA avec une p-value < 0.001.

Les moyennes d'expression de chacun des 6 gènes sont indiquées pour les 3 groupes.

La deuxième stratégie, mise en place en collaboration avec le Dr Chaussabel (Benaroya Research Institute, Seattle, USA), s'est basée sur le serveur de recherche bibliographique Pubmed. Cette recherche bibliographique a été effectuée pour chacun des 105 gènes différentiellement exprimés dans les TFH des TOL en indiquant les différents noms du gène et les termes « follicular » et « helper » (Figure 12).

A



B

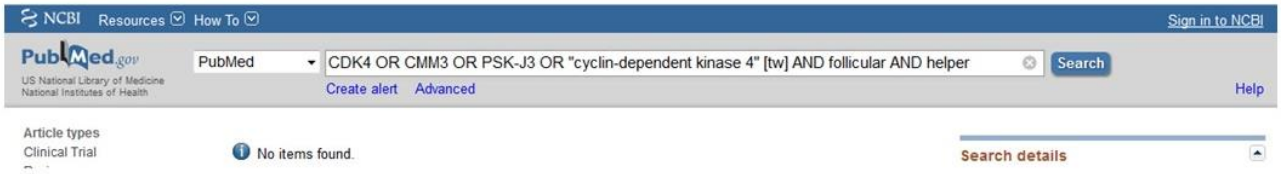


Figure 12: Stratégie de sélection des gènes d'intérêt basée sur une recherche bibliographique.

Pour le gène AMPK, la recherche sur Pubmed en utilisant les noms du gène (PRKAB1 OR AMPK [tw] OR « protein kinase, AMP-activated, beta 1 [tw]) et les TFH (follicular AND helper) a permis de mettre en évidence une référence, suggérant une association avec les TFH (A), contrairement au gène CDK4 pour qui aucune référence n'était retrouvée (B).

Tous les gènes présentant une ou plusieurs références bibliographiques ont été sélectionnés. Ainsi, 7 gènes étaient associés aux TFH, dont 1 (AXL) était déjà présent dans la première stratégie de sélection (Tableau 4).

Gènes	p-value	Moyenne d'expression HV	Moyenne d'expression STA	Moyenne d'expression TOL	Nombre de références Pubmed
PRKAB1	0,012	22,645	24,705	17,448	1
AXL	0,002	0,467	0,567	1,425	1
DDX58	0,015	21,034	22,530	16,173	5
CCNT1	0,019	10,990	9,135	16,712	1
ZBTB16	0,013	7,255	3,525	14,750	2
NFKBIZ	0,014	21,952	20,633	41,815	1
DUSP16	0,012	9,291	8,765	12,114	1

Tableau 4: Gènes associés aux TFH d'après une stratégie de sélection basée sur une recherche bibliographique.

Les moyennes d'expression de chacun des 7 gènes sont indiquées pour les 3 groupes, avec le nombre de références bibliographiques retrouvés pour chaque gène.

En résumé, à partir de cette analyse transcriptomique des TFHc purifiés des patients TOL, nous avons sélectionné 12 gènes différentiellement exprimés entre les TOL et les HV et entre les TOL et STA. Ces 12 gènes ont été sélectionnés de façon méthodique pour leur potentiel intérêt dans la compréhension des mécanismes de régulation des TFH dans le processus de tolérance opérationnelle. Le tableau ci-dessous résume les principales fonctions cellulaires de ces 12 gènes (Tableau 5).

Gènes	Expression chez les TOL vs STA et HV	Fonction
PRKAB1	Diminuée	Protéine : Protéine kinase, sous-unité régulatrice de l'AMPK Fonction : Régule positivement l'AMPK. Rôle clef dans la régulation du métabolisme énergétique de la cellule. A noter que l'enzyme AMPK est antagonisée par la protéine ROQUIN ce qui induit une réponse TFH chez la souris (Ramiscal, Elife, 2015)
AXL	Augmentée	Protéine : Récepteur tyrosine kinase ayant pour ligand GAS6 Fonction : Récepteur impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires incluant la croissance, la migration, l'aggrégation et l'anti-inflammation
DDX58	Diminuée	Protéine : RNA helicase contenant des motifs RNA-helicase Dead box et des domaines de recrutement de caspase (CARD) Fonction : Récepteur de l'immunité innée cytosolique (PRR) qui reconnait les ARN viraux double brin et entraine une réponse antivirale par la voie RIG-1. Dans un modèle murin, l'immunisation avec un vaccin contre la grippe co-administré avec un ligand de DDX58 augmente significativement la différenciation en TFH, la fréquence de LB-GC et la génération d'anticorps de haute affinité (Kulkarni, J Virol., 2014)
CCNT1	Augmentée	Protéine : Cycline T1 Fonction : Forme en association avec la kinase CDK9, le facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb. Les travaux de Chen suggèrent que CCNT1 soit impliqué dans la voie de différenciation Th1 au dépend de la différenciation TFH (Chen, Immunity, 2014)
ZBTB16	Augmentée	Protéine : Facteur de transcription PLZF de type Zinc Finger Fonction : Impliqué dans la progression du cycle cellulaire. Régulateur critique des lymphocytes NKT. Facteur de transcription important dans la différenciation et la maintenance des Th17 (Beaulieu, JI, 2011).
NFKBIZ	Augmentée	Protéine : Membre de la famille des IkB Fonction : Inhibiteur du complexe de transcription NF-kB. Son expression est nécessaire à la différenciation TH17. Rôle important dans l'expression des gènes induite par l'IL-17A (Jeltsch, Nat Immunol, 2014)
DUSP16	Augmentée	Protéine : Phosphatase à double spécificité Fonction : Régulateur inhibiteur de la voie des MAPK et de la c-Jun amino-terminal kinase (JNK). Les souris KO DUSP16 sont déficientes dans la formation des TFH et des Th17 in vivo (Zhang, JI, 2015)
WHAMM	Augmentée	Protéine: Facteurs promoteurs de nucléation d'actine (NPF) Fonction: Rôle dans la nucleation d' actine, dans la régulation du transport du reticulum endoplasmique jusqu'au complexe de Golgi et dans la structure du microtubule
TANC2	Augmentée	Protéine: Tétratricopeptide Fonction: Régulation des épines dendritiques et des synapses excitatrices
NUP43	Diminuée	Protéine: Nucléoporine 43 Fonction: Composant du complexe formant le pore nucléaire
FCGBP	Augmentée (vs STA) et diminuée (vs HV)	Protéine: Protéine fixant le fragment constant des Ig Fonction: Impliqué dans la maintenance des structures des muqueuses
GTF2E1	Diminuée	Protéine: Facteur de transcription tétramérique Fonction: Rôle dans l'activation d'une kinase (RNA polymerase II C-terminal domain kinase)

Tableau 5: Description des 12 gènes sélectionnés avec leur expression chez les TOL par rapport aux STA et aux HV.

4) Discussion et perspectives

Après avoir mis en évidence une diminution des TFHc avec un profil particulier chez les TOL, nous avons voulu étudier plus en détail les mécanismes mis en jeu. Pour cela, nous avons étudié le transcriptome des TFHc purifiés des patients TOL, comparés aux patients transplantés STA et aux volontaires sains. Il est important de rappeler que l'analyse du transcriptome chez l'individu sain a permis à l'équipe de S. Crotty de mettre en évidence une sous-population de TFHc avec un profil d'expression de gènes similaire à celui retrouvé dans les TFH du centre germinatif [60]. Nos objectifs étaient de mieux caractériser les TFHc des patients TOL et d'identifier des gènes susceptibles d'intervenir dans la régulation des TFH et dans l'interaction TFH-LB.

Pour réaliser cette analyse, nous avons utilisé la méthode de séquençage haut débit par RNA-Seq. Il est intéressant de souligner que la technique RNA Seq est supérieure à la technique de puces à ADN pour déterminer les gènes différentiellement exprimés, avec une meilleure sensibilité pour détecter les gènes faiblement exprimés. D'autre part, cette technique permet le séquençage de l'ARN sans phase d'hybridation et n'est donc pas limitée aux sondes disponibles [110]. Ainsi, nous avons pu comparer l'expression de plus de 16000 gènes exprimés par les TFHc des patients TOL, STA et des volontaires sains. Cette base de données est unique, puisqu'à notre connaissance, il s'agit de la première caractérisation transcriptomique des TFHc de patients TOL.

En utilisant initialement la sparse PLS-DA, nous avons pu obtenir un nombre restreint de gènes (400) qui permettait de discriminer au mieux les 3 groupes d'individus. La sparse PLS-DA est une méthode non statistique très utile et très performante dans la discrimination et

la classification, notamment pour les analyses transcriptomiques portant sur un grand nombre de gènes [111]. Nous avons d'ailleurs observé dans notre étude que cette méthode permettait une meilleure discrimination de nos groupes comparée à l'analyse en composante principale (ACP) qui est une technique plus traditionnelle.

Par la suite, nous avons utilisé une méthode statistique ainsi qu'une méthode basée sur une analyse bibliographique pour identifier des gènes potentiellement intéressants dans la régulation des TFH et dans l'interaction TFH-LB. Concernant l'analyse bibliographique, réalisée en collaboration avec le Dr Chaussabel (Benaroya Research Institute, Seattle, USA), une stratégie de recherche bibliographique exhaustive via Pubmed a été utilisée [112]. L'objectif était de mettre en évidence des gènes liés de façon plus ou moins directe aux TFH. Au total, nous avons donc sélectionné 12 gènes exprimés par les TFHc, différentiellement exprimé chez les TOL, et qui pour certains ont un lien connu avec les TFH.

L'étape suivante sera de valider la pertinence de ces gènes sur des échantillons sanguins différents, par une PCR quantitative mais aussi par cytométrie de flux. Nous avons mis au point à l'heure actuelle ces différents marquages cellulaires sur des volontaires sains (Figure 13). La suite va consister à comparer l'expression de ces molécules par les TFHc à partir de PBMC congelées de patients TOL, STA et HV afin de confirmer l'expression différentielle entre les groupes et de focaliser sur 1 ou 2 gènes cibles.

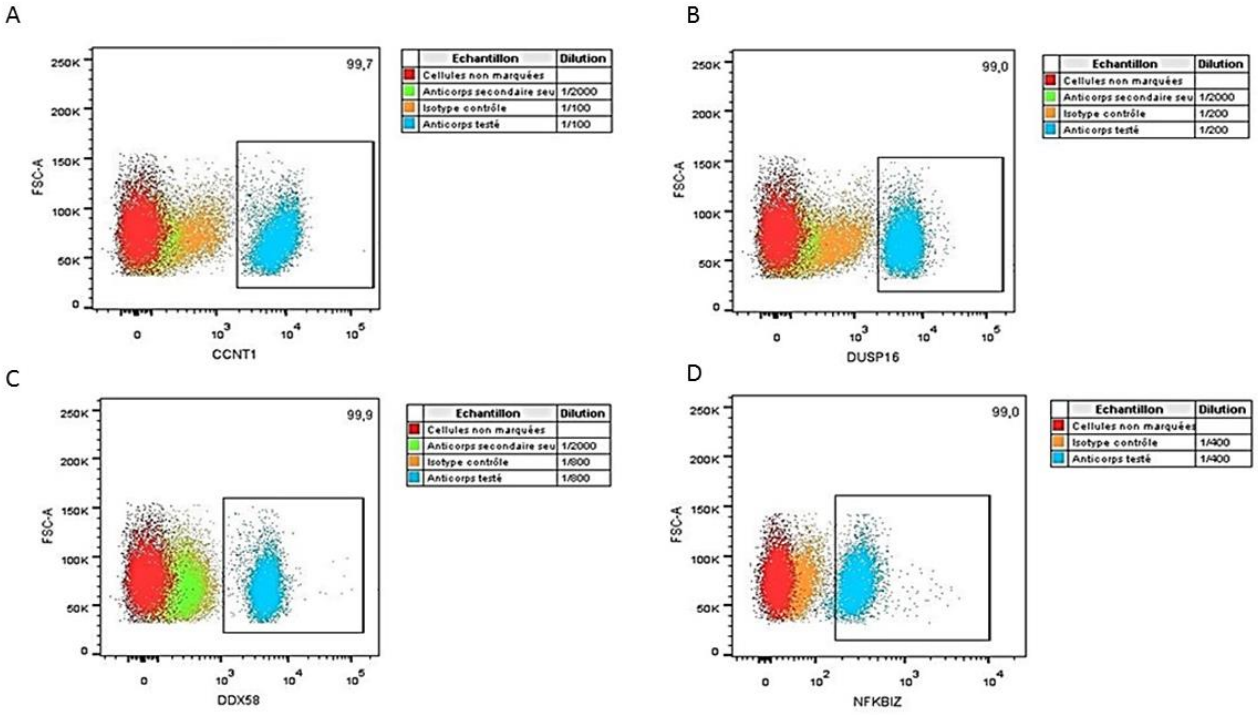


Figure 13: Expression de 4 molécules d'intérêt en cytométrie de flux par les LT CD4$^+$ de volontaires sains : CCNT1 (A), DUSP16 (B), DDX58 (C) et NFKBIZ (D).

En fonction des outils disponibles listés dans le tableau 6 et des gènes cibles sélectionnés, nous pourrons envisager de bloquer ou d'induire l'expression du gène afin d'étudier l'effet sur la différenciation des TFHc et sur la fonction « B helper » des TFHc dans notre modèle de coculture *in vitro*. Aussi, nous utiliserons un modèle murin de greffe de peau allogénique de souris donneuses KO pour le gène étudié (e.g. PRKAB1, AXL, NFKBIZ) chez des souris receveuses C57BL/6. L'hypothèse est qu'en l'absence du gène, la survie du greffon sera différente comparée aux souris contrôles. Nous espérons ainsi mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le défaut des TFHc observé chez les patients TOL.

Gènes	Biologie moléculaire	Modèles murins
PRKAB1	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Modèles murins KO pour PRKAB1
AXL	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Modèles murins KO pour AXL
DDX58	• Ligand activateur • si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Les souris KO pour DDX58 survivent rarement jusqu'à la naissance, et/ou meurent rapidement dans les 3 semaines (Kato et al., 2005).
CCNT1	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Aucun modèle disponible.
ZBTB16	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Expression conditionnelle de ZBTB16 par les lymphocytes T CD4+ (Savage AK et al., 2008).
NFKBIZ	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Modèles murins KO pour NFKBIZ.
DUSP16	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Modèles murins avec LT CD4+ KO pour le gène DUSP16 (Zhang et al., 2015).
WHAMM	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Aucun modèle disponible.
TANC2	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Les souris KO pour TANC2 meurent in utero (Han et al., 2010).
NUP43	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Aucun modèle disponible.
FCGBP	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Aucun modèle disponible.
GTF2E1	• si/shRNA • Plasmides d'expression • Primer	Aucun modèle disponible.

Tableau 6: Liste des outils disponibles pour chacune des molécules

REFERENCES

1. Rapport annuel Agence de la Biomédecine. 2014.
2. Combe C, Rigothier C, Vendrely B, Chauveau P, Rigalleau V, Lasseur C. [Strategies to slow the progression of chronic kidney disease]. *Presse Med* 2007;**36**(12 Pt 2)**:**1849-55.
3. Purnell TS, Auguste P, Crews DC, et al. Comparison of life participation activities among adults treated by hemodialysis, peritoneal dialysis, and kidney transplantation: a systematic review. *Am J Kidney Dis* 2013;**62**(5)**:**953-73.
4. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;**341**(23)**:**1725-30.
5. Solez K, Racusen LC. The Banff classification revisited. *Kidney Int* 2013;**83**(2)**:**201-6.
6. Mazzucchi E, Lucon AM, Nahas WC, et al. Histologic outcome of acute cellular rejection in kidney transplantation after treatment with methylprednisolone. *Transplant Proc* 2000;**32**(4)**:**784-5.
7. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;**280**(14)**:**735-9.
8. Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, et al. Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009;**9**(5)**:**1099-107.
9. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;**351**(26)**:**2715-29.
10. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004;**4**(6)**:**905-13.
11. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998;**351**(9103)**:**623-8.
12. Soulillou JP, Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001;**72**(12 Suppl)**:**S89-93.
13. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007;**357**(25)**:**2562-75.
14. Abramowicz D, Del Carmen Rial M, Vitko S, et al. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *J Am Soc Nephrol* 2005;**16**(7)**:**2234-40.
15. Schnuelle P, van der Heide JH, Tegzess A, et al. Open randomized trial comparing early withdrawal of either cyclosporine or mycophenolate mofetil in stable renal transplant recipients initially treated with a triple drug regimen. *J Am Soc Nephrol* 2002;**13**(2)**:**536-43.
16. Dugast E, Soulillou JP, Foucher Y, et al. Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2016.
17. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant* 2016;**16**(7)**:**2117-38.

18. Organ Procurement and Transplantation Network, Annual Report. 2010.
19. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, et al. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2016;**374**(4)**:**333-43.
20. Millan MT, Shizuru JA, Hoffmann P, et al. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 2002;**73**(9)**:**1386-91.
21. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008;**358**(4)**:**362-8.
22. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, et al. Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am J Transplant* 2012;**12**(5)**:**1133-45.
23. Scandling JD, Busque S, Shizuru JA, Engleman EG, Strober S. Induced immune tolerance for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2011;**365**(14)**:**1359-60.
24. Scandling JD, Busque S, Shizuru JA, et al. Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant* 2015;**15**(3)**:**695-704.
25. Yolcu ES, Leventhal JR, Ildstad ST. Facilitating cells in tolerance induction for kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2015;**20**(1)**:**57-63.
26. Leventhal J, Abecassis M, Miller J, et al. Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* 2012;**4**(124)**:**124ra28.
27. Leventhal J, Abecassis M, Miller J, et al. Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: durable chimerism predicts outcome. *Transplantation* 2013;**95**(1)**:**169-76.
28. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008;**358**(4)**:**353-61.
29. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2014;**14**(7)**:**1599-611.
30. Kawai T, Sachs DH, Sykes M, Cosimi AB. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2013;**368**(19)**:**1850-2.
31. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006;**6**(4)**:**736-46.
32. Brouard S, Pallier A, Renaudin K, et al. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012;**12**(12)**:**3296-307.
33. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010;**120**(6)**:**1848-61.
34. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010;**120**(6)**:**1836-47.
35. Massart A, Pallier A, Pascual J, et al. The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2016.

36. Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, et al. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 2006;**6**(11)**:**2796-801.
37. Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**(39)**:**15448-53.
38. Baron D, Ramstein G, Chesneau M, et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int* 2015;**87**(5)**:**984-95.
39. Dugast E, Chesneau M, Soulillou JP, Brouard S. Biomarkers and possible mechanisms of operational tolerance in kidney transplant patients. *Immunol Rev* 2014;**258**(1)**:**208-17.
40. Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;**5**(2)**:**330-40.
41. Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006;**81**(3)**:**398-407.
42. Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 2010;**78**(5)**:**503-13.
43. Danger R, Pallier A, Giral M, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol* 2012;**23**(4)**:**597-606.
44. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2014;**14**(1)**:**144-55.
45. Chesneau M, Michel L, Dugast E, et al. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J Am Soc Nephrol* 2015;**26**(10)**:**2588-98.
46. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000;**192**(11)**:**1545-52.
47. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med* 2001;**193**(12)**:**1373-81.
48. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014;**41**(4)**:**529-42.
49. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009;**325**(5943)**:**1001-5.
50. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009;**325**(5943)**:**1006-10.
51. Yu D, Rao S, Tsai LM, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 2009;**31**(3)**:**457-68.
52. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol* 2014;**35**(9)**:**436-42.
53. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 2015;**15**(3)**:**185-9.
54. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol* 2009;**182**(4)**:**1781-7.

55. Deenick EK, Ma CS. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* 2011;**134**(4)**:**361-7.
56. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011;**17**(8)**:**975-82.
57. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev* 2016;**271**(1)**:**246-59.
58. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* 2011;**186**(10)**:**5556-68.
59. Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011;**34**(1)**:**108-21.
60. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 2013;**39**(4)**:**758-69.
61. Bossaller L, Burger J, Draeger R, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol* 2006;**177**(7)**:**4927-32.
62. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;**4**(3)**:**261-8.
63. Ma CS, Hare NJ, Nichols KE, et al. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells. *J Clin Invest* 2005;**115**(4)**:**1049-59.
64. Al-Saud BK, Al-Sum Z, Alassiri H, et al. Clinical, immunological, and molecular characterization of hyper-IgM syndrome due to CD40 deficiency in eleven patients. *J Clin Immunol* 2013;**33**(8)**:**1325-35.
65. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 2013;**19**(4)**:**494-9.
66. Ueno H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J Clin Immunol* 2016;**36 Suppl 1:**34-9.
67. de Leval L, Gisselbrecht C, Gaulard P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2010;**148**(5)**:**673-89.
68. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* 2013;**123**(7)**:**2873-92.
69. Ville S, Poirier N, Branchereau J, et al. Anti-CD28 Antibody and Belatacept Exert Differential Effects on Mechanisms of Renal Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol* 2016.
70. Rodriguez-Barbosa JI, Fernandez-Renedo C, Moral AM, Buhler L, Del Rio ML. T follicular helper expansion and humoral-mediated rejection are independent of the HVEM/BTLA pathway. *Cell Mol Immunol* 2016.
71. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, et al. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J Immunol* 2012;**188**(6)**:**2643-52.
72. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2014;**14**(1)**:**59-69.
73. Lal G, Kulkarni N, Nakayama Y, et al. IL-10 from marginal zone precursor B cells controls the differentiation of Th17, Tfh and Tfr cells in transplantation tolerance. *Immunol Lett* 2016;**170:**52-63.

74. Shi J, Luo F, Shi Q, Xu X, He X, Xia Y. Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *BMC Nephrol* 2015;**16:**182.
75. de Graav GN, Dieterich M, Hesselink DA, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin Exp Immunol* 2015;**180**(2)**:**329-40.
76. Baeten D, Louis S, Braud C, et al. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006;**17**(1)**:**294-304.
77. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**(43)**:**15545-50.
78. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol* 2007;**179**(8)**:**5099-108.
79. Chavele KM, Merry E, Ehrenstein MR. Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J Immunol* 2015;**194**(6)**:**2482-5.
80. Andreola G, Chittenden M, Shaffer J, et al. Mechanisms of donor-specific tolerance in recipients of haploidentical combined bone marrow/kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011;**11**(6)**:**1236-47.
81. Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motallebnezhad M, Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* 2016;**221**(2)**:**357-67.
82. Baan CC, de Graav GN, Boer K. T Follicular Helper Cells in Transplantation: The Target to Attenuate Antibody-Mediated Allogeneic Responses? *Curr Transplant Rep* 2014;**1**(3)**:**166-172.
83. Shi X, Que R, Liu B, et al. Role of IL-21 signaling pathway in transplant-related biology. *Transplant Rev (Orlando)* 2016;**30**(1)**:**27-30.
84. Petrelli A, Carvello M, Vergani A, et al. IL-21 is an antitolerogenic cytokine of the late-phase alloimmune response. *Diabetes* 2011;**60**(12)**:**3223-34.
85. Degauque N, Brouard S, Soulillou JP. Cross-Reactivity of TCR Repertoire: Current Concepts, Challenges, and Implication for Allotransplantation. *Front Immunol* 2016;**7:**89.
86. Miqueu P, Degauque N, Guillet M, et al. Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur J Immunol* 2010;**40**(11)**:**3280-90.
87. Morris H, DeWolf S, Robins H, et al. Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Sci Transl Med* 2015;**7**(272)**:**272ra10.
88. Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2015;**26**(8)**:**1795-805.
89. Coelho V, Saitovitch D, Kalil J, Silva HM. Rethinking the multiple roles of B cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;**18**(1)**:**13-21.
90. Camirand G, Riella LV. Treg-Centric View of Immunosuppressive Drugs in Transplantation: A Balancing Act. *Am J Transplant* 2016.
91. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* 2012;**12**(6)**:**1618-23.

92. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;**21**(8)**:**1398-406.
93. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012;**12**(5)**:**1157-67.
94. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008;**86**(3)**:**377-83.
95. Cooper JE, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation* 2011;**91**(10)**:**1103-9.
96. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009;**87**(10)**:**1505-13.
97. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;**9**(11)**:**2520-31.
98. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012;**8**(6)**:**348-57.
99. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* 2013;**95**(3)**:**410-7.
100. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011;**72**(10)**:**849-58.
101. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013;**369**(13)**:**1215-26.
102. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant* 2009;**9**(9)**:**2136-9.
103. Bishop GA, Hall BM, Suranyi MG, Tiller DJ, Horvath JS, Duggin GG. Expression of HLA antigens on renal tubular cells in culture. I. Evidence that mixed lymphocyte culture supernatants and gamma interferon increase both class I and class II HLA antigens. *Transplantation* 1986;**42**(6)**:**671-9.
104. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant* 2015;**15**(5)**:**1384-91.
105. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* 2011;**36**(3-4)**:**228-38.
106. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* 2014;**41**(6)**:**1013-25.
107. Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 2013;**10**(11)**:**1096-8.
108. Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 2014;**9**(1)**:**171-81.
109. Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, Satija R, Shalek AK, Regev A. Preparation of Single-Cell RNA-Seq Libraries for Next Generation Sequencing. *Curr Protoc Mol Biol* 2014;**107:**4 22 1-4 22 17.

110. Perkins D, Verma M, Park KJ. Advances of genomic science and systems biology in renal transplantation: a review. *Semin Immunopathol* 2011;**33**(2)**:**211-8.
111. Le Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* 2011;**12:**253.
112. Chaussabel D. Biomedical literature mining: challenges and solutions in the 'omics' era. *Am J Pharmacogenomics* 2004;**4**(6)**:**383-93.

ANNEXE : article publié dans *Molecular Immunology*

Résumé

L'immunosuppression induite au décours d'un traumatisme crânien (TC) est un facteur de risque important de pneumopathies nosocomiales. Un défaut quantitatif et/ou qualitatif de certaines populations cellulaires immunes (e.g. cellules NK, LT, cellules dendritiques) a déjà été mis en évidence chez ces patients, tout comme la présence d'IL-10. Cependant, peu de données concernent les LB dans cette phase d'immunosuppression induite par le TC. Nous avons donc analysé le phénotype des LB et leur capacité de sécrétion d'IL-10 chez 14 patients, 1 jour et 7 jours après le TC, et chez 11 volontaires sains. Les patients avec TC ont un taux de LB plus important que les volontaires sains. D'autre part, les LB mémoires (CD27+), les LB mémoires switchés (CD27+ IgD-) et les taux d'IgA et d'IgM sont plus importants chez les patients à J7 comparé à J1, ce qui traduit un état d'activation des LB après le TC. Le taux de LB sécréteur d'IL-10 (LB IL-10+) est plus bas chez les patients avec TC comparé aux volontaires sains. Enfin, les patients avec un taux de LB IL-10+ élevé présentent tous une pneumopathie nosocomiale et ont une durée de ventilation mécanique et de séjour en réanimation plus importante comparés aux patients avec un faible taux. Cette étude pilote descriptive met en évidence la présence de LB activés dans cette phase d'immunosuppression induite par le TC, avec un potentiel rôle des LB IL-10+.

Molecular Immunology 68 (2015) 350–356

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Phenotype and functions of B cells in patients with acute brain injuries

Alexis Chenouard[a,b], Mélanie Chesneau[a,b], Faouzi Braza[a,b], Thomas Dejoie[d], Raphael Cinotti[e], Antoine Roquilly[e,f], Sophie Brouard[a,b,c,1], Karim Asehnoune[e,f,*,1]

[a] INSERM, UMR 1064, Nantes F-44093, France
[b] CHU de Nantes, ITUN, Nantes F-44093, France
[c] CIC biothérapie, Nantes F-44035, France
[d] Biochemistry Laboratory, Nantes University Hospital, Nantes, France
[e] Intensive Care Unit, Anesthesia and Critical Care Department, Nantes University Hospital, Nantes, France
[f] Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, EA 3826 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 July 2015
Received in revised form 29 August 2015
Accepted 1 September 2015
Available online 9 September 2015

Keywords:
Brain injury
B cells
IL-10
IL-10⁺ B cells
Immune suppression
Regulatory B cells

ABSTRACT

Background: Brain injuries (BI) induce a state of systemic immunosuppression, leading to a high risk of pneumonia. In this pilot study, we investigated the status of B cell compartment in BI patients.
Methods: A prospective observational study was performed in 2 intensive care units in a university hospital. Blood samples were collected in 14 patients at day 1 and day 7 after acute BI. The phenotype and the ability of B cells to secrete IL-10 were compared to 11 healthy volunteers (HV).
Results: Among the circulating lymphocytes, the frequency of B cells was significantly higher in BI patients compared to HV ($p < 0.001$). B cells from BI patients displayed an activated profil on day 7 after BI, reflected by a significantly higher proportion of $CD27^+$ memory ($p = 0.01$) and $CD27^+$ IgD^- switched memory B cells ($p = 0.02$), as well as a significantly higher blood level of IgA ($p = 0.001$) and IgM ($p < 0.001$) as compared to day 1. The frequency of IL-10 secreting B cells ($IL\text{-}10^+$ B cells) on day 1 and day 7 was significantly lower in BI patients compared to HV ($p < 0.05$). Interestingly, we observed that all BI patients with high frequency of $IL\text{-}10^+$ B cells on day 1 displayed an episode of pneumonia, and had a longer duration of mechanical ventilation and ICU stay compared to BI patients with low proportion of $IL\text{-}10^+$ B cells.
Conclusion: This study provides an extensive description of the phenotype and function of B cells in BI patients. Our results suggest that $IL\text{-}10^+$ B cells could play a major role in immunosuppression after BI.
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brain injury (BI) is associated with short-term and long-term morbidity and mortality (Brooks et al., 2015; Greenwald et al., 2015; Roquilly et al., 2013b). It has become clear that BI patients are prone to infection, particularly nosocomial pneumonia which develops in around 40% of patients (Asehnoune et al., 2014; Bronchard et al., 2004; Zygun et al., 2006). Although several risk factors for pneumonia have been identified (Bronchard et al., 2004; Cinotti et al., 2014; Lepelletier et al., 2010), a state of immunosuppression is critically involved in the occurrence of pneumonia (Meisel et al., 2005). We and others have demonstrated that secretion of anti-inflammatory cytokines (mainly IL-10) and a quantitative and functional impairment of immune cells (e.g., NK cells, T cells, dendritic cells) represent the major features of BI-induced immunosuppression (Das et al., 2012; Meisel et al., 2005; Roquilly et al., 2014, 2013a). To our knowledge, few data are available regarding the involvement of B cells in the so called BI-induced immunosupression.

B cells are a heterogeneous cell population representing around 10% of blood lymphocytes. They play a pivotal role in both adaptive and innate immune response, principally through antibodies production, but they are also able to present antigen and produce cytokines modifying the micro environnement (Shen and Fillatreau, 2015). Analysis of B cell compartment in BI-induced immunosuppression is particularly relevant considering the involvement of B cells in the immunosuppressive shift observed during septic shock (Monserrat et al., 2013). Moreover identification of IL-10 secreting regulatory B cells able to constrain inflammation could suggest a potent role of these cells in the immunosuppression event observed in BI patients (Hilgenberg et al., 2014; Mauri and Bosma, 2012; Rosser and Mauri, 2015).

* Corresponding author at: Intensive Care Unit, Anesthesia and Critical Care Department, Nantes University Hospital, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, EA 3826, Nantes, France.
E-mail address: karim.asehnoune@chu-nantes.fr (K. Asehnoune).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.001
0161-5890/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Consistently several studies highlighted the role of IL-10 in the BI-induced immunosuppression (Roquilly et al., 2014; Shimonkevitz et al., 1999; Woiciechowsky et al., 1998), however little is known regarding its origin. Consequently, we hypothesized that B cells can contribute to the BI-induced immunosuppression, with a pivotal role of B cells secreting IL-10. In this regard, we investigated the phenotype and the ability of B cells to secrete IL-10 in BI patients.

2. Material and methods

2.1. Patients and healthy volunteers

The brain-injured cohort was made up of traumatic or non-traumatic (subarachnoid hemorrhage) acute brain-injured patients hospitalized in intensive care unit (ICU) and requiring mechanical ventilation. Our institutional review board for human experimentation approved the protocol. Written informed consent from a next-of-kin was required for enrollment. Retrospective consent was obtained from patients, when possible. Patients were enrolled from January 2013 to November 2013 in two French surgical ICUs of one university hospital. Control samples were collected from healthy blood donors recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) after obtaining informed consent.

2.2. Follow-up

The following data were recorded: general characteristics including demographics, medical history, severity of brain injury assessed according to the Glasgow Coma Scale (GCS), nosocomial peumonia, durations of ventilatory support and ICU hospitalization and in-ICU mortality. Pneumonia was defined as the presence of at least two signs (body fever >38 °C; leukocytosis >12,000/mL or leukopenia <4000/mL; purulent pulmonary secretions) associated with the appearance of a new infiltrate or change in an existing infiltrate on chest X-ray (American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America, 2005). The diagnosis was in all cases confirmed by a positive result in quantitative culture for either lower respiratory tract sample, obtained by endotracheal aspirates, bronchoalveolar lavage, or with a blind-protected specimen catheter (significant thresholds: 10^6 colony-forming units/mL, 10^4 colony-forming units/mL, 10^3 colony-forming units/mL, respectively). Nosocomial pneumonia was defined as pneumonia occurring 48 h or more after admission and not incubating at the time of admission.

2.3. Sample collection

Blood samples were withdrawn after ICU admission (<48 h after BI, day 1) and on day 7 after BI and immediately sent to the laboratory. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum were isolated by centrifugation, frozen at −80 °C and stored until investigation.

2.4. Immunoglobulin measurements

Immunoglobulin levels were evaluated in serum by an immunoturbidimetric automated method on Cobas 8000 analyzer (Roche, Manheim, Germany).

2.5. Immunophenotyping of B cells

PBMCs were stained with these anti-human monoclonal antibodies: anti-CD19 V450, anti-CD5 APC, anti-CD24 PE, anti-CD38 APC H7, anti-IgD FITC and anti-CD27 APC (BD Bioscience). Dead cells were excluded from the analysis with LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies). Marker expression of live stained cells was detected by flow cytometry (BD LSRII) and analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Tree Star, Ashland, OR).

2.6. Isolation and culture of B cells

B cells were purified by negative selection using a Human B Cell Isolation Kit II and an autoMACSPRO Separator, with purity >95% (Miltenyi Biotech,Gladbach, Germany). Sorted $CD19^+$ B cells were stimulated at a concentration of 10^6 cells/ml for 48 h with CpGoligonucleotide (ODN2006, 0.5 μM; InvivoGen, SanDiego, CA) and recombinant human soluble CD40L (1 μg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) in complete RPMI 1640 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) containing L-glutamine, penicillin/streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA), and 10% fetal calf serum (Lonza, Verviers, Belgium) in 96-well plates (Nunc, Langenselbold, Germany) at 37 °C, 5% CO2.

2.7. Analysis of IL-10 production by stimulated B cells

Supernatants were collected after 48 h of culture and analyzed for the presence of IL-10 by ELISA following the manufacturer's protocol (BD Bioscience). For analysis of intracellular IL-10 secretion, B cells were stimulated for 5 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml), ionomycin (0.5 mg/ml), and brefeldin-A (10 mg/ml) (Sigma–Aldrich). Viability staining was performed using the LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) and cells were stained with anti–CD19-APC (BD Biosciences). For detection of intracellular IL-10, cells were fixed and permeabilized using the Permeabilization/Fixation Kit (BD Biosciences) and staining was performed using anti-IL-10 PE (BD Biosciences). Unstimulated B cells (without PMA/ionomycin stimulation) were stained and used as a control for the gating strategy.

2.8. Statistical analysis

Immunological analysis was conducted blind, and clinical data were not available to the immunology staff before the end of the study. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, La Jolla, CA). The Mann–Whitney test was used to compare 2 independant groups and the non parametric Wilcoxon matched pairs test was used to compare data on days 1 and 7. Significance was defined as p-value less than 0.05 ($^*p < .05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$). Pearson correlation coefficient and two-tailed p-value were determined in the analysis of correlations. Survival analysis was done by the Kaplan–Meier method using the log-rank test for significance.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of BI patients

Table 1 depicts the baseline characteristics of the 14 brain-injured patients (BI) (8 subarachnoid hemorrhage and 6 traumatic BI) and 11HV. Nine patients (64%) developed nosocomial pneumonia during ICU stay (10 episodes of nosocomial pneumonia). The median time between BI and pneumonia was 4 days [range: 2–15]. Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* was the main pathogen involved (Table 2).

3.2. BI patients display a higher proportion of B cells

We first determined the frequency of B cells in BI patients. Representative gating schemes are shown in Fig. 1A. The frequency of B cells determined as the percentage of $CD19^+$ cells in lymphocyte gate was significantly higher in BI patients at day 1 as compared

Table 1
Clinical characteristics of brain-injured patients and healthy volunteers.

Characteristics	Brain-injured patients	Healthy volunteers	*p*-Value
	(*n* = 14)	(*n* = 11)	
Age (years)	53 [22–69]	56 [26–63]	0.35
Male, *n*	10 (71%)	9 (82%)	0.66
Diagnosis at admission, *n*			
Traumatic bain injury	6 (43%)	–	
Subarachnoid hemorrhage	8 (57%)	–	
Initial GCS	11 [3–15]	–	
Low dose hydrocortisone, *n*	5 (36%)	–	
Barbiturates, *n*	4 (29%)	–	
Nosocomial pneumonia, *n*	9 (64%)	–	
Acute respiratory distress syndrome	2 (14%)	–	
Duration of mechanical ventilation (days)	13 [1–34]	–	
ICU lenght of stay (days)	19 [5–38]	–	
Death in ICU, *n*	2 (14%)	–	

Data are given as the median (range) or *n* (%).
BI: brain-injury; ICU: intensive care unit; GCS: Glasgow Coma Scale.

Table 2
Pathogens involved in nosocomial pneumonia.

Pathogens involved, *n* (%)	Nosocomial pneumonia (*n* = 10)
Number of pathogens	17
Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*	6 (35%)
Streptococcus pneumoniae	4 (23%)
Haemophius influenzae	2 (12%)
Escherichia coli	1 (6%)
Pseudomonas aeruginosa	1 (6%)
Moraxella catarrhalis	1 (6%)
Morganella morganii	1 (6%)

In the 14 brain-injured patients, there were 10 episodes of nosocomial pneumonia of which 5 were polymicrobial. One patient displayed 2 pneumonia during ICU.

to HV (19% [range: 6–36] vs 8% [range: 3–12], $p < 0.001$), with no recovery at day 7 (21% [range: 7–35] vs 8% [range: 3–12], $p < 0.001$) (Fig. 1B). Blood lymphocyte counts (available for only 9 BI patients on day 1 and 4HV) were used to calculate the absolute number of B cells based on the obtained cell percentages. B cell counts were 0.33 [0.07–0.64] Giga/L in BI patients on day 1, compared with 0.09 (0.05–0.14) Giga/L in HV ($p = 0.08$). Altogether these data show that a quantitative defect of B cells is not associated with the BI-induced immunosuppression.

3.3. B cells from BI patients display an activated profil on day 7

In the next step we studied the B cell phenotype profile of BI patients as previously described (Chesneau et al., 2014). From PBMCs of all patients we quantified the frequency of total CD19$^+$

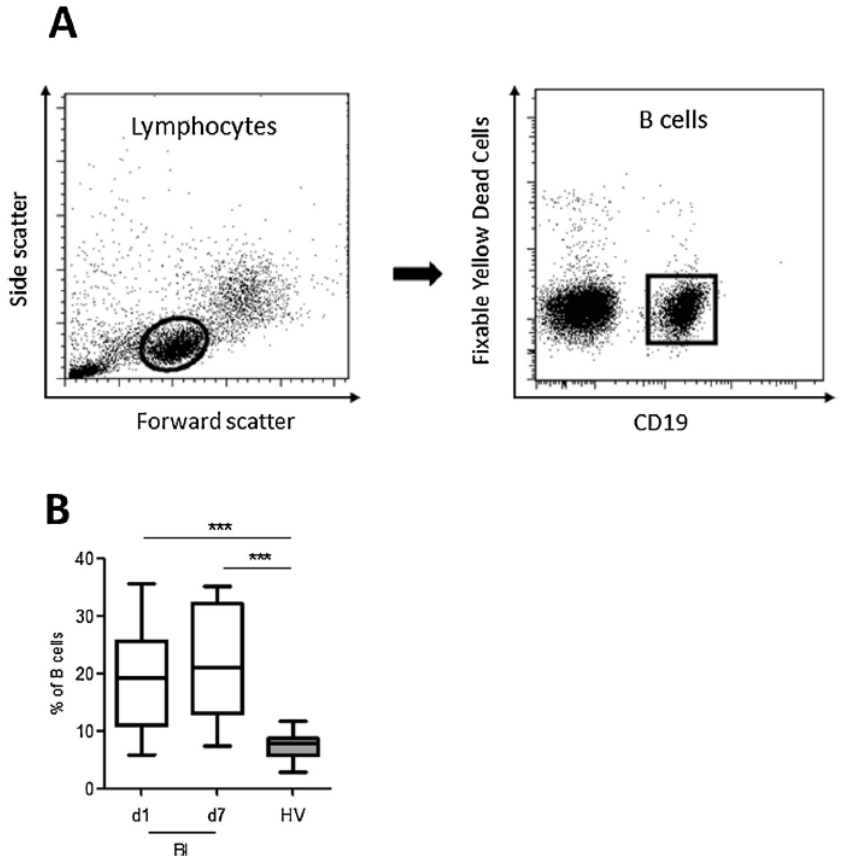


Fig. 1. Immunophenotyping of B cells from BI patients and HV. (A) Representative density plot illustrating CD19$^+$ lymphocytes within lymphocyte population gated following FSC/SSC characteristics. (B) Summary box and whisker plot summarizing the percentages of B lymphocytes in BI on days 1 and 7 ($n = 14$) and HV ($n = 11$). Top and bottom whiskers represent the extremes values; boxed area represent the 25th percentile, the median and the 75th percentile (***$p < 0.001$).

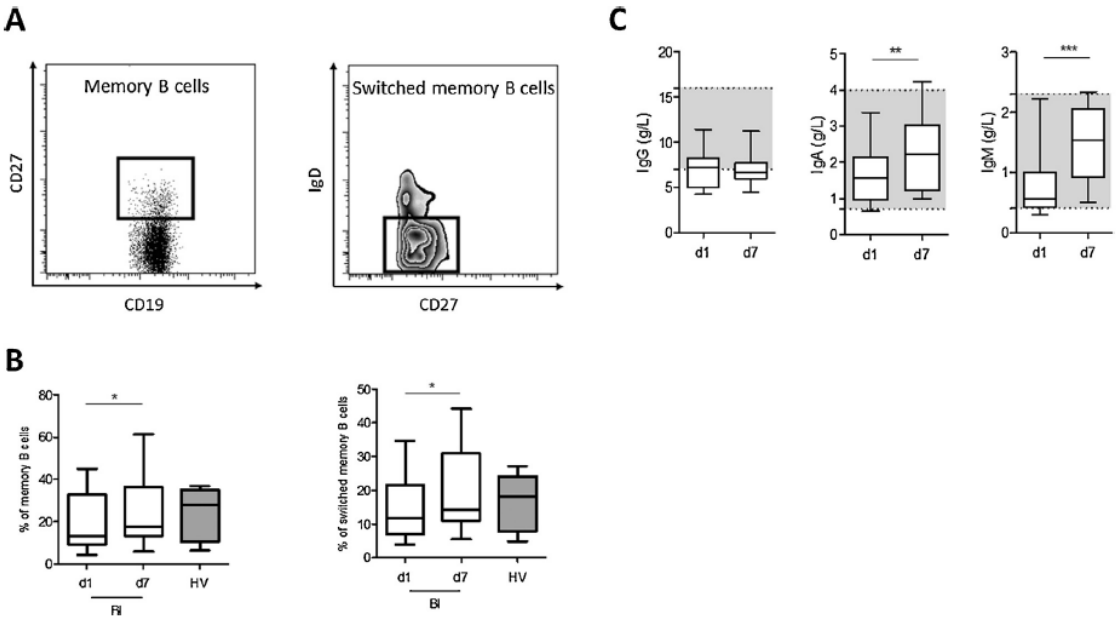


Fig. 2. B cells from BI patients display an activated profil on day 7. (A) Representative density plot illustrating both memory B cells (CD19⁺ CD27⁺) and switched memory B cells (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻). Summary box and whisker plot summarizing (B) the percentage of memory and switched memory B cells and (C) the serum concentration of IgG, IgA and IgM from BI on days 1 and 7 ($n = 14$) and HV ($n = 11$). Top and bottom whiskers represent the extremes values; boxed area represent the 25th percentile, the median and the 75th percentile. The grey area indicate the normal values for each Ig (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

CD27⁺ memory B cells and CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ switched memory B cells (Fig. 2A). No significant difference was observed concerning the frequency of total and switched memory B cells between BI patients and HV. However, we found a significant increase of the frequency of memory ($p = 0.01$) and switched memory B cells ($p = 0.02$) on day 7 when compared to day 1 (Fig. 2B). Additionaly serum concentration of IgA and IgM were increased on day 7 when compared to day 1 (2.2 g/L [1.0–4.2] vs 1.5 g/L [range: 0.7–3.4] and 1.5 g/L [0.5–2.3] vs 0.6 g/L [range: 0.3–2.2], respectively, $p < 0.01$) (Fig. 2C). To investigate whether severity of BI was involved in the current results, we compared the frequency of switched memory B cells and the levels of IgA and IgM in 2 groups of patients according to GCS (< or >8). No difference was observed between the 2 groups of patients (data not shown). Altogether these results support an ongoing activation and maturation of circulating B cells in BI patients.

3.4. Frequency of IL-10⁺ B cells patients is lower in BI patients

Studies have reported on an association between elevated IL-10 plasma levels and poor outcome in BI patients (Ferreira et al., 2014; Schneider Soares et al., 2012; Woiciechowsky et al., 1998). IL-10 is produced by various leucocytes, including B cells (Rosser and Mauri, 2015). Thus, using cytometry, we investigated the frequency of IL-10⁺ B cells in BI patients and HV after 48 h of stimulation with CD40L and ODN (with PMA/ionomycin/Brefeldin-A for the last 5 h) (Iwata et al., 2011). Representative gating strategy is shown in Fig. 3A. Interestingly, the frequency of IL-10⁺ B cells was significantly lower in BI patients on day 1 compared to HV (3.0% [range: 0.3–6.6] vs 6.6% [range: 1.8–15.7], $p = 0.04$), with no recovery at day 7 (3.1% [range: 0.2–9.3] vs 6.6% [range: 1.8–15.7], $p = 0.02$) (Fig. 3B). The same results were observed for IL-10 concentration in the culture supernatants of the 48 h stimulated B cells (Fig. 3C), with a strong and significant correlation between frequency of IL-10⁺ B cells and concentration of IL-10 secreted by B stimulated cells ($p < 0.001$, $r = 0.88$) (Fig. 3D). Collectively these data demonstrate an altered homeostasis of IL-10 secreting B cells.

3.5. BI patients with high frequency of IL-10⁺ B cells on day 1 develop pneumonia and had longer durations of mechanical ventilation and ICU stay

We then aimed to characterize patients according to their IL-10⁺ B cells frequency. We chose the median of IL-10⁺ B cells frequency in BI patients on day 1 (median = 3.1%) in order to discriminate 2 groups of patients: the group with lower frequency of IL-10⁺ B cells (<3.1%, lower group = LG, $n = 6$) and the group with higher frequency of IL-10⁺ B cells group (>3.1%, higher group = HG, $n = 6$) (Fig. 4A). Interestingly, all patients in the HG had ICU acquired pneumonia versus 2 patients in LG ($p = 0.06$) (Table 2). Fig. 4B and 4C display Kaplan–Meyer survival curves comparing the cumulative percentage of patients under mechanical ventilation and the percentage of patients hospitalized in ICU according to their frequency of IL-10⁺ B cells on day 1. Interestingly, time to weaning from mechanical ventilation and ICU length stay were longer in the HG versus the LG (= = 0.03 and $p = 0.04$, respectively) (Fig. 4B and C). Comparisons between the 2 groups are summarized in Table 3. These results demonstrate that high secretion of IL-10 by B cells on day 1 is associated with a poor outcome in BI patients.

4. Discussion

The present study demonstrates that BI patients had a higher frequency of B cells with a B cell activated phenotype after injury. However, secretion of IL-10 by B cells after *ex vivo* stimulation was reduced in BI patients compared to healthy volunteers. Interestingly, the increased IL-10⁺ B cells frequency on day 1 was strongly associated with poor outcome. Our results suggest a potential role of B cells in orchestrating the overall immune response after BI.

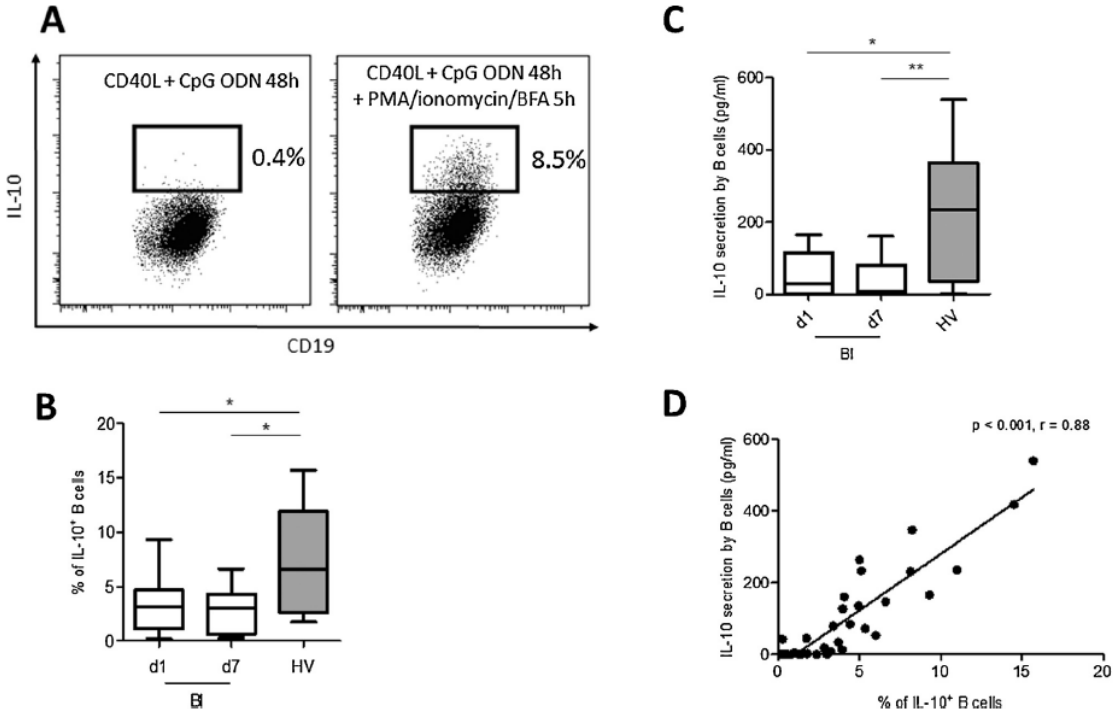


Fig. 3. IL-10⁺ B cells and IL-10 secretion in BI patients and HV. IL-10 expression was analyzed on sorted CD19⁺ B cells after 48 h stimulation with CD40L and ODN. PMA/ionomycin/Brefeldin-A were added for the last 5 h of culture. (A) Representative dot plot of IL-10 secretion in stimulated B cells. Summary box and whisker plot summarizing (B) the percentage of IL-10⁺ B cells and (C) the concentration of IL-10 in the supernatants of stimulated B cells in BI patients on days 1 and 7 ($n = 12$), and healthy volunteers ($n = 10$). Top and bottom whiskers represent the extremes values; boxed area represent the 25th percentile, the median and the 75th percentile. (D) Correlation between percentage of IL-10⁺ B cells and concentration of IL-10 (pg/mL) from BI patients on day 1 and 7 ($n = 14$) (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$).

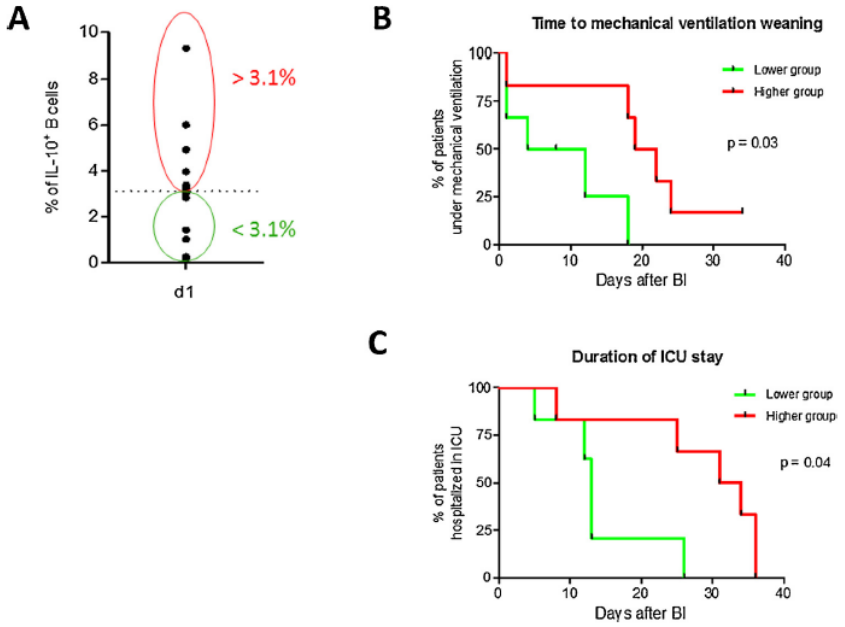


Fig. 4. BI patients with high frequency of IL-10⁺ B cells on day 1 develop pneumonia and had longer durations of mechanical ventilation and ICU stay. (A) Subgroup of patients based on the median of IL-10⁺ B cells frequency on day 1: 6 patients had a frequency of IL-10⁺ B cells >3.1 (higher group, HG) and 6 had a frequency <3.1 (lower group, LG). Kaplan–Meyer survival curves comparing the cumulative percentage of patients under mechanical ventilation (B) and the percentage of patients hospitalized in ICU (C) according to their percentage of IL-10⁺ B cells on day 1. Patients who died during ICU ($n = 2$) were censored in the analysis.

Table 3
BI patient characteristics according to percentage of IL-10⁺ B cells on day 1.

Characteristics	Lower group ($n = 6$)	Higher group ($n = 6$)	p-Value
Age (years)	49 [24–69]	49 [22–61]	0.75
Male, n	4 (67%)	4 (67%)	1.00
Traumatic bain injury	2 (33%)	1 (17%)	1.00
Initial GCS	11 [5–15]	9 [3–14]	0.69
Low dose hydrocortisone, n	2 (33%)	2 (33%)	1.00
Barbiturates, n	2 (33%)	2 (33%)	1.00
Nosocomial pneumonia, n	2 (33%)	6 (100%)	0.06
Acute respiratory distress syndrome	0 (0%)	2 (33%)	0.45
Duration of mechanical ventilation (days)	6 [1–18]	21 [1–34]	0.05
ICU lenght of stay (days)	13 [5–26]	33 [8–36]	0.05
Death in ICU, n	1 (17%)	1 (17%)	1.00

Data are given as the median (range) or n (%).
BI: brain-injury; ICU: intensive care unit; GCS: Glasgow Coma Scale.

Brain-injury induced immunosuppression has been reported as an important risk factor of pneumonia in BI patients, with impairment of both innate and adaptive immunity (Meisel et al., 2005). The primary injury initiates the secretion of pro- and anti-inflammatory mediators, inducing the recruitment of peripheral immune cells to the brain (Gyoneva and Ransohoff, 2015). A decrease in the number of circulating T cells participate to the immunosupression after BI (Mrakovcic-Sutic et al., 2010). Surprisingly, we found an increased B cell frequency and absolute number in the blood of BI patients compared to control group, suggesting that immune cells are not affected equally by injury, with a variation over time.

Emerging data indicate that B cells are activated by central nervous system antigens after BI (Ankeny and Popovich, 2010). In the present results, there is a higher proportion of memory and switched memory B cells on day 7, corresponding to activated B cells which are able to differentiate into antibody-producing plasma cells producing large amounts of antibodies. Accompanying these phenotyping changes, we found a higher serum concentration of IgA and IgM observed in BI patients on day 7, as previously reported in children after severe BI (Meert et al., 1995). Of note, no difference was observed in IgA and IgM levels between patients with or without ICU acquired pneumonia (data not shown). Most studies focused on auto-antibody production, which exacerbated tissue damage and impaired neurological recovery in spinal cord injury in mice (Ankeny et al., 2009). In humans, Skoda et al. reported on the dynamics of IgG and IgM antibody formation against endogenous β-tubulin class III, appearing at least one weeks after BI (Skoda et al., 2006). In our study, it will be interesting to determine the levels of auto-antibodies in the sera of BI patients in order to analyze the associaton between the presence of antibodies and the frequence of memory B cells. However, activation and maturation of circulating B cells reported here after BI is not in accordance with the brain-injury induced immunosuppression described in literature and additional functions of B cells should also be considered.

IL-10 secretion appears to be involved in brain-injury induced immunosuppression. Some studies have reported a secretion of IL-10 by monocytes or NK cells in vitro (Roquilly et al., 2014; Shimonkevitz et al., 1999; Woiciechowsky et al., 1998). It has recently emerged that specific subsets of B cells may have suppressive capacities through IL-10 secretion (Hilgenberg et al., 2014; Mauri and Bosma, 2012; Rosser and Mauri, 2015). Based on a B cell stimulation using CD40L and ODN (Iwata et al., 2011), we surprisingly observed a decrease frequency of IL-10⁺ B cells in BI patients compared to healthy volunteers, which is inconsistent with studies reporting a higher IL-10 concentration in plasma compared to control group (Ferreira et al., 2014; Maier et al., 2001). This result supports that B cells are not the main source of IL-10 after BI. However, the higher level of IL-10⁺ B cells in healthy volunteers is confusing since the% of IL-10 producing B cells is higher in healthy volunteers than in patients. We can speculate that B cells from healthy volunteers are more responsive to ex vivo stimulation compared to BI patients. Evaluating a positive control group (patients hospitalized in ICU without BI) would have been a valuable approach to test this hypothesis.

An association between elevated IL-10 plasma levels and poor outcome has been reported in BI patients (Ferreira et al., 2014; Schneider Soares et al., 2012) as well as in other ICU patients (Adib-Conquy et al., 2003; Fumeaux and Pugin, 2002). In our study, a subgroup analysis based on the median of IL-10⁺ B cells frequency revealed an association between higher frequency of IL-10⁺ B cells and BI outcome, including ICU acquired pneumonia, time to mechanical ventilation weaning and duration of ICU stay. A previous report showed that elevated levels of IL-10 in the serum after severe BI (median period of 10 h) were correlated with GCS severity at admission (Schneider Soares et al., 2012). In our study, we did not find any correlation between frequency of IL-10⁺ B cells and GCS (data not shown).

The main limit of this preliminary study concern the small number of patients included. No definitive conclusion can thus be drawn from these results. If confirmed in a larger cohort of patients, our findings could indicate that IL-10 secreted by B cells may be a useful biomarker of BI severity.

5. Conclusion

This study provides the first extensive description of B cells in BI patients. We found that BI patients display a significant higher frequency of B cells with an activated profil on day 7 after injury. Our results also suggest that IL-10⁺ B cells could play a role in immunosuppression after BI, and this subset should be evaluated as a marker of prognosis in BI patients during ICU stay.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

We thanks Delphine Flattres-Duchaussoy for her help with the study, the biological resource centre for biobanking (CHU Nantes, Hôtel Dieu, Centre de ressources biologiques (CRB), Nantes, F-44093, France (BRIF: BB-0033-00040)) and the nurses and medical team of the Surgical Intensive Care Unit of Nantes University Hospital for technical assistance.

This work was supported by grants from the Centaure Foundation, the Labex IGO (Immunotherapy Graft Oncology) and by a University Hospital Institute (IHU)-European Center for Transplantation and Immunotherapy Services (CESTI) project, which received French Government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment in the Future" program (ANR-10-IBHU-005). The IHU-CESTI project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. A. Chenouard is a recipient of a poste d'accueil INSERM.

References

Adib-Conquy, M., Moine, P., Asehnoune, K., Edouard, A., Espevik, T., Miyake, K., Werts, C., Cavaillon, J.-M., 2003. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168, 158–164, http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200209-1077OC.

American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America, 2005. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 171, 388–416, http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200405-644ST.

Ankeny, D.P., Guan, Z., Popovich, P.G., 2009. B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. J. Clin. Invest. 119, 2990–2999, http://dx.doi.org/10.1172/JCI39780.
Ankeny, D.P., Popovich, P.G., 2010. B cells and autoantibodies: complex roles in CNS injury. Trends Immunol. 31, 332–338, http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.06.006.
Asehnoune, K., Seguin, P., Allary, J., Feuillet, F., Lasocki, S., Cook, F., Floch, H., Chabanne, R., Geeraerts, T., Roger, C., Perrigault, P.F., Hanouz, J.L., Lukaszewicz, A.C., Biais, M., Boucheix, P., Dahyot-Fizelier, C., Capdevila, X., Mahe, P.J., Le Maguet, P., Paugam-Burtz, C., Gergaud, S., Plaud, B., Constantin, J.M., Malledant, Y., Flet, L., Sebille, V., Roquilly, A., Corti-TC Study Group, 2014. Hydrocortisone and fludrocortisone for prevention of hospital-acquired pneumonia in patients with severe traumatic brain injury (Corti-TC): a double-blind, multicentre phase 3, randomised placebo-controlled trial. Lancet Respir. Med. 2, 706–716, http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70,144-4.
Bronchard, R., Albaladejo, P., Brezac, G., Geffroy, A., Seince, P.-F., Morris, W., Branger, C., Marty, J., 2004. Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. Anesthesiology 100, 234–239.
Brooks, J.C., Shavelle, R.M., Strauss, D.J., Hammond, F.M., Harrison-Felix, C.L., 2015. Long-term survival after traumatic brain injury Part II: life expectancy. Arch. Phys. Med. Rehabil. 96, 1000–1005, http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2015.02.002.
Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D.-A., Degauque, N., Soulillou, J.-P., Tarte, K., Brouard, S., 2014. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. Am. J. Transplant. 14, 144–155, http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12508.
Cinotti, R., Dordonnat-Moynard, A., Feuillet, F., Roquilly, A., Rondeau, N., Lepelletier, D., Caillon, J., Asseray, N., Blanloeil, Y., Rozec, B., Asehnoune, K., 2014. Risk factors and pathogens involved in early ventilator-acquired pneumonia in patients with severe subarachnoid hemorrhage. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33, 823–830, http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-2020-8.
Das, M., Mohapatra, S., Mohapatra, S.S., 2012. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. J. Neuroinflammation 9, 236, http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-236.
Ferreira, L.C.B., Regner, A., Miotto, K.D.L., de, Ikuta, N., Vargas, A.E., Chies, J.A.B., Simon, D., 2014. Increased levels of interleukin-6, -8 and -10 are associated with fatal outcome following severe traumatic brain injury. Brain Inj. 28, 1311–1316, http://dx.doi.org/10.3109/02699052.2014.916818.
Fumeaux, T., Pugin, J., 2002. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, 1475–1482, http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200203-217OC.
Greenwald, B.D., Hammond, F.M., Harrison-Felix, C., Nakase-Richardson, R., Howe, L.L.S., Kreider, S., 2015. Mortality following traumatic brain injury among individuals unable to follow commands at the time of rehabilitation admission: a national institute on disability and rehabilitation research traumatic brain injury model systems study. J. Neurotrauma, http://dx.doi.org/10.1089/neu.2014.3454.
Gyoneva, S., Ransohoff, R.M., 2015. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell–cell communication by chemokines. Trends Pharmacol. Sci., http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.003.
Hilgenberg, E., Shen, P., Dang, V.D., Ries, S., Sakwa, I., Fillatreau, S., 2014. Interleukin-10-producing B cells and the regulation of immunity. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 380, 69–92, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_4.
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., Hall, R.P., St Clair, E.W., Tedder, T.F., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood 117, 530–541, http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249.
Lepelletier, D., Roquilly, A., Demeure dit latte, D., Mahe, P.J., Loutrel, O., Champin, P., Corvec, S., Naux, E., Pinaud, M., Lejus, C., Asehnoune, K., 2010. Retrospective analysis of the risk factors and pathogens associated with early-onset ventilator-associated pneumonia in surgical-ICU head-trauma patients. J. Neurosurg. Anesthesiol. 22, 32–37, http://dx.doi.org/10.1097/ANA.0b013e3181bdf52f.
Maier, B., Schwerdtfeger, K., Mautes, A., Holanda, M., Müller, M., Steudel, W.I., Marzi, I., 2001. Differential release of interleukines 6, 8, and 10 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury. Shock Augusta Ga 15, 421–426.
Mauri, C., Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. Annu. Rev. Immunol. 30, 221–241, http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
Meert, K.L., Long, M., Kaplan, J., Sarnaik, A.P., 1995. Alterations in immune function following head injury in children. Crit. Care Med. 23, 822–828.
Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A., Dirnagl, U., 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. Nat. Rev. Neurosci. 6, 775–786, http://dx.doi.org/10.1038/nrn1765.
Monserrat, J., de Pablo, R., Diaz-Martín, D., Rodríguez-Zapata, M., de la Hera, A., Prieto, A., Alvarez-Mon, M., 2013. Early alterations of B cells in patients with septic shock. Crit. Care Lond. Engl. 17, R105, http://dx.doi.org/10.1186/cc12750.
Mrakovcic-Sutic, I., Tokmadzic, V.S., Laskarin, G., Mahmutefendic, H., Lucin, P., Zupan, Z., Sustic, A., 2010. Early changes in frequency of peripheral blood lymphocyte subpopulations in severe traumatic brain-injured patients. Scand. J. Immunol. 72, 57–65, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02407.x.
Roquilly, A., Braudeau, C., Cinotti, R., Dumonte, E., Motreul, R., Josien, R., Asehnoune, K., 2013a. Impaired blood dendritic cell numbers and functions after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. PLoS One 8, e71639, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071639.
Roquilly, A., Broquet, A., Jacqueline, C., Masson, D., Segain, J.P., Braudeau, C., Vourc'h, M., Caillon, J., Altare, F., Josien, R., Retière, C., Villadangos, J., Asehnoune, K., 2014. Hydrocortisone prevents immunosuppression by interleukin-10+ natural killer cells after trauma-hemorrhage. Crit. Care Med. 42, e752–e761, http://dx.doi.org/10.1097/CCM.;1; 658.
Roquilly, A., Cinotti, R., Jaber, S., Vourc'h, M., Pengam, F., Mahe, P.J., Lakhal, K., Demeure Dit Latte, D., Rondeau, N., Loutrel, O., Paulus, J., Rozec, B., Blanloeil, Y., Vibet, M.-A., Sebille, V., Feuillet, F., Asehnoune, K., 2013b. Implementation of an evidence-based extubation readiness bundle in 499 brain-injured patients. a before-after evaluation of a quality improvement project. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 188, 958–966, http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201301-0116OC.
Rosser, E.C., Mauri, C., 2015. Regulatory B Cells: origin, phenotype, and function. Immunity 42, 607–612, http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005.
Schneider Soares, F.M., Menezes de Souza, N., Libório Schwarzbold, M., Paim Diaz, A., Costa Nunes, J., Hohl, A., Nunes Abreu da Silva, P., Vieira, J., Lisboa de Souza, R., Moré Bertotti, M., Schoder Prediger, R.D., Neves Linhares, M., Bafica, A., Walz, R., 2012. Interleukin-10 is an independent biomarker of severe traumatic brain injury prognosis. Neuroimmunomodulation 19, 377–385, http://dx.doi.org/10.1159/000342141.
Shen, P., Fillatreau, S., 2015. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. Nat. Rev. Immunol. 15, 441–451, http://dx.doi.org/10.1038/nri3857.
Shimonkevitz, R., Bar-Or, D., Harris, L., Dole, K., McLaughlin, L., Yukl, R., 1999. Transient monocyte release of interleukin-10 in response to traumatic brain injury. Shock Augusta Ga 12, 10–16.
Skoda, D., Kranda, K., Bojar, M., Glosová, L., Bäurle, J., Kenney, J., Romportl, D., Pelichovská, M., Cvachovec, K., 2006. Antibody formation against beta-tubulin class III in response to brain trauma. Brain Res. Bull. 68, 213–216, http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.05.032.
Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schöning, B., Glöckner, F., Lanksch, W.R., Volk, H.D., Döcke, W.D., 1998. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. Nat. Med. 4, 808–813.
Zygun, D.A., Zuege, D.J., Boiteau, P.J.E., Laupland, K.B., Henderson, E.A., Kortbeek, J.B., Doig, C.J., 2006. Ventilator-associated pneumonia in severe traumatic brain injury. Neurocrit. Care 5, 108–114.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Alexis CHENOUARD

Analyse des lymphocytes T folliculaires helper chez les patients tolérant leur greffon rénal

Analysis of blood T follicular helper cells in renal operationally tolerant patients

Résumé

Même si les traitements immunosuppresseurs ont grandement contribué à améliorer la survie du greffon en transplantation, ils comportent des effets secondaires potentiellement graves (cancer, néphrotoxicité, infections…). Certaines équipes de recherche se sont donc intéressées spécifiquement à de très rares patients transplantés rénaux, appelés patients tolérants, qui conservaient une bonne fonction de leur greffon durant des années et ce, en l'absence d'immunosuppresseurs. Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence le rôle primordial des lymphocytes B (LB), avec notamment un défaut de différenciation in vitro des LB en plasmocytes rapporté chez ces patients tolérants. C'est à partir de ce résultat que nous nous sommes intéressés aux lymphocytes T folliculaires helper (TFH), connus comme étant des cellules indispensables à la différenciation des LB. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un défaut quantitatif et qualitatif des TFH chez les patients tolérants comparé à des patients transplantés ayant une fonction stable sous immunosuppresseurs. Aussi, nous avons suggéré une implication des TFH dans l'apparition des anticorps anti-donneur (DSA), ce qui pourrait expliquer la faible proportion d'immunisation anti-donneur reportée chez les patients tolérants. Dans un deuxième temps, nous avons exploré les mécanismes moléculaires mis en jeu en réalisant une analyse transcriptomique haut débit par RNA Sequencing à partir de TFH purifiés. A partir de cette analyse, nous avons pu mettre en évidence plusieurs gènes potentiellement intéressants dans la régulation des TFH et dans l'interaction avec les LB chez les patients tolérants.

Mots clés

lymphocyte TFH, tolérance, transplantation rénale, immunisation post greffe, RNA Seq

Abstract

Immunosuppressive drugs largely contributed to a better graft survival over time in transplantation, but induced serious side effects (cancer, nephrotoxicity, infections…). In this context, some researchers focused on rare renal transplanted recipients, who maintain a good graft function without any immunosuppressive drugs during several years. These patients are named operationally tolerant patients and are of considerable interest to immunologists. Studies on these patients reveal a critical role of B cells, with particularly an in vitro B cell differentiation defect reported in tolerant patients. Based on this report, we focused on blood T follicular helper cells (TFH) which are known to be crucial for supporting B cell differentiation. At first, we reported a qualitative and quantitative TFH defect in tolerant patients compared to transplanted patients with stable graft function under immunosuppression. Moreover, we suggest a potential role of TFH in post graft immunization with donor-specific antibodies (DSA), which could explain the low incidence of post-graft DSA immunization reported in tolerant patients. Secondly, based on a transcriptomic analysis of purified TFH by RNA Sequencing, we have highlighted several TFH genes potentially interesting in tolerant patients, concerning the TFH regulation and the cooperation between TFH and B cells.

Key Words

TFH cells, tolerance, renal transplantation, post graft immunization, RNA Seq

L'Université Bretagne Loire