



**HAL**  
open science

**Caractérisation transcriptionnelle phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B GZMB+ dans le sang des volontaires sains : développement de tests immunologiques pour mesurer l'impact des voies JAK dans la dermatite atopique**

Nicolas Sailliet

► **To cite this version:**

Nicolas Sailliet. Caractérisation transcriptionnelle phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B GZMB+ dans le sang des volontaires sains : développement de tests immunologiques pour mesurer l'impact des voies JAK dans la dermatite atopique. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1009 . tel-04151076

**HAL Id: tel-04151076**

**<https://theses.hal.science/tel-04151076>**

Submitted on 4 Jul 2023

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

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

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie-Santé*

Spécialité : Immunologie

Par

**Nicolas SAILLIET**

**Caractérisation transcriptionnelle phénotypique et fonctionnelle  
des lymphocytes B GZMB+ dans le sang des volontaires sains /  
Développement de tests immunologiques pour mesurer l'impact  
des voies JAK dans la dermatite atopique**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 07 Avril 2023

Unité de recherche : CR2TI INSERM UMR1064 & IICiMED EA1155

## Rapporteurs avant soutenance :

Alberto Sanchez-Fueyo  
David Michonneau

Professor – King's College, London  
Maître de conférence des universités – praticien hospitalier, Université  
Paris-Cité

## Composition du Jury :

Président : Alberto Sanchez Fueyo  
Examineurs : Delphine Descamps  
David Michonneau

Professor – King's College, London  
Chargée de Recherche, VIM – UR892, Paris  
Maître de conférence des universités – praticien hospitalier, Université  
Paris-Cité

Dir. de thèse : Jean-Michel ROBERT  
Co-dir. de thèse : Sophie Brouard

Professeur des universités – Nantes Université, Nantes  
Directrice de Recherche, CR2TI – UMR1064, Nantes

## Invité(s)

Cécile Challier

Biotherapeutic Head, CEVA Santé Animale, Libourne

## Remerciements

*J'adresse tout d'abord mes plus sincères remerciements au Dr. Delphine Descamp pour avoir fait partie de ce jury et accepté d'évaluer ce travail, ainsi qu'aux docteurs David Michonneau et Alberto Sanchez Fueyo pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi les docteurs Béatrice Charreau et Sébastien Barbarot pour avoir été membres de mon comité de suivi de thèse et qui m'ont aidé à orienter les différents sujets pour suivre un chemin cohérent.*

*Je remercie également le Dr. Régis Josien, directeur du CR2TI pour son accueil dans l'unité.*

*Je souhaite principalement remercier (et de loin) Jean-Michel, directeur, et Sophie, co-directrice de ma thèse pour... tout. Vous avez été présents et disponibles à chaque instant pendant toutes ces années de master et de thèse. Vous avez été un conseil précieux et m'avez aidé à garder confiance quand rien ne fonctionnait.*

*Jean-Michel, je ne saurais compter le nombre d'heures que tu as passé à m'initier aux arcanes mystiques de la chimie organique. On ne s'improvise pas dans la modélisation moléculaire, et je suis bien heureux d'avoir tes compétences à mes côtés sur ce projet. Je ne me suis jamais lassé de nos réunions qui commençaient par des anecdotes sur tes voyages autour du monde, et finissaient en critique (toujours constructives et pleines d'empathie) de l'administration. Certes, ce n'étaient pas souvent les journées les plus constructives, mais ça fait du bien de souffler un peu.*

*Sophie, je ne te remercierai jamais assez. Tu as toujours été disponible alors que ton agenda débordait (littéralement). Tu as toujours su garder une vision globale pendant que j'avancais pas à pas sur ce sujet que tu m'as permis d'étudier. D'ailleurs je tiens aussi à te remercier pour la confiance (ou l'inconscience) que tu m'as apporté en me laissant faire les analyses des données de scRNAseq alors que je n'avais AUCUNE idée de ce que je faisais. Si aujourd'hui je maîtrise ces outils, c'est grâce à toi. Tu es responsable au moins autant que moi de tout ce que j'ai accompli ces 5 dernières années.*

*Pour rien au monde je n'aurais souhaité changer cet encadrement. Merci à tous les deux.*

*Je remercie aussi CEVA d'avoir financé cette thèse. Et particulièrement le Dr. Vassilios Kaltsatos pour nous avoir fait confiance sur le développement des molécules. Je remercie le Dr. Cécile Challier pour nous avoir aidé à cadrer le projet autour de la dermatite atopique et pour nos (trop peu nombreuses) discussions sur la place des anti-JAK dans les stratégies thérapeutiques. Je remercie également l'équipe open innovation pour avoir essayé de m'intégrer à leur équipe malgré la distance (350Km c'est un peu loin pour le déjeuner, par ailleurs, je vous remercie d'avoir renoncé à me faire badger tous les matins. Ça n'aurait vraiment pas facilité cette thèse).*

*Je remercie aussi Dr. Nicolas Degauque. Tu ne fais pas officiellement partie de l'encadrement de ma thèse, mais tu as énormément participé à chacun de mes projets tant sur l'élaboration des protocoles que sur les méthodes d'analyse. C'est aussi toi qui m'as ouvert les portes du laboratoire pour un stage de master 1. Tu as donc initié l'engrenage qui nous mène à ce manuscrit.*

*Je veux dire merci à tous les membres du CR2TI avec qui j'ai été amené à travailler, aux membres de la culture 3 (de loin la meilleure pièce de culture) et particulièrement à Gaëlle et Carole, qui m'ont appris à être efficace, à Richard et Jérémie qui ont été un soutien inconditionnel dans les analyses sur R, et à Amandine, Laura et François, parce qu'on est dans la même galère. C'est bientôt votre tour !*

*De manière beaucoup moins informelle, je tiens à remercier les gens qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse. À toute la bière consommée, aux 560 et autres ccbboooo, aux soirées JdR, jeux de plateau et autres jeux de... cartes. Merci Benoit, Clément, Emilien, Guillaume, Louise, Marine, Matthias, Pauline, PJ, Romain, Valériane. Votre amitié m'est devenue chère, je ne sais pourquoi mais ça doit probablement être à cause de la bière.*

*Tchou et Wouf, je vous remercie d'exister. Le monde serait beaucoup trop fade sans vous.*

*Et enfin, je terminerai par remercier ma famille. Papa, Maman, Gwen, vous avez toujours été là pour moi, merci de m'avoir soutenu, déchargé de bon nombre de tâches fastidieuses (quoi que je commence à faire mes déclarations d'impôts tout seul !). Et bien sûr, merci à ma mamie, pour avoir essayé de comprendre ce que je faisais, pour s'inquiéter de mon alimentation et de mon sommeil absolument TOUTES les semaines depuis que j'ai commencé à travailler. L'éternel « plus tard » arrive. Promis, je vais bientôt prendre un peu de repos.*

## Avant-propos

Avant de rentrer dans le cœur de ce manuscrit, je souhaite remettre le travail réalisé ici dans son contexte. Le sujet imaginé en 2018 et initié en septembre 2019 portait sur la caractérisation de molécules originales sur leur capacité inhibitrices des voies JAK, et sur les effets de cette inhibition dans le contexte de la dermatite atopique, notamment sur l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et leur sécrétion d'IL-13.

Nous avons donc commencé la mise au point de ces et commencé la caractérisation de 3 séries de molécules sur leur activité anti-JAK.

Cependant, 4 mois après le début de la thèse, un certain virus a décidé de se propager et de paralyser nos activités de recherche.

Pendant les 3 mois d'arrêt technique imposés, éloigné de ma pièce de culture préférée, j'ai eu l'occasion de jouer avec des données de scRNAseq qui avaient été produites dans notre équipe du CR2TI. Après la réouverture du laboratoire, pendant plus d'un an, nous n'avons pas pu resynthétiser de nouvelles molécules présentant une même activité et la reprise de l'activité clinique de dermatite atopique a été extrêmement perturbée rendant l'obtention de nouveaux échantillons quasiment impossible.

Après discussion avec mon directeur J-M. Robert, ma co-directrice S. Brouard et notre partenaire CIFRE, nous avons donc décidé de réorienter mon projet de thèse sur les travaux que j'avais initié pendant le confinement.

Fin 2021, nous avons pu de nouveau obtenir des échantillons DA. Mais il était utopique de penser pouvoir tenir les deux projets en parallèle, et de pouvoir tenir le calendrier initialement prévu sur le projet DA (reprise de la mise au point des modèles sur des échantillons de PBMC DA, développement et caractérisation des inhibiteurs de JAK) en parallèle de ce nouveau projet. Nous avons donc décidé d'utiliser les échantillons à notre disposition réaliser un

phénotypage des PBMC de patients DA modérée à sévère vs individus sains, pour servir de ligne de base pour caractériser les effets des inhibiteurs de JAK et de nous concentrer principalement sur la caractérisation transcriptionnelle, phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B régulateurs.

Ce manuscrit traite des travaux préliminaires sur la caractérisation des effets des inhibiteurs de JAK, puisqu'il s'agissait du sujet initial de la thèse, et des travaux réalisés sur la caractérisation de l'interaction entre le lymphocyte B régulateurs et son environnement qui a finalement été le sujet principal de cette thèse.

Avant d'orienter officiellement le sujet sur les interactions du lymphocyte B régulateur, nous avons aussi initié un sujet sur la sécrétion de vésicules extracellulaires par les lymphocytes B régulateurs dans la tolérance opérationnelle, aboutissant à l'écriture d'une revue de la littérature présentée en annexe 5.

# Sommaire

<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	- 10 -
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	- 11 -
<b>LISTE DES FIGURES</b>	- 12 -
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	- 14 -
<b>GENERALITES SUR LES INHIBITEURS DES VOIES JAK DANS LA DERMATITE ATOPIQUE</b>	- 17 -
<b>A. Généralités sur les voies JAK/STAT</b>	- 18 -
A.1. Les Janus kinases	- 18 -
A.1.1. Structure des JAK	- 19 -
A.1.1.1. Domaine kinase	- 20 -
A.1.1.2. Domaine pseudo kinase	- 20 -
A.1.1.3. Domaines de liaison	- 21 -
A.1.2. Voie de signalisation JAK/STAT	- 21 -
A.2. Les STATs	- 22 -
A.3. Spécificité des voies JAK/STATs	- 22 -
I.A.1. Régulation de la voie JAK/STAT	- 23 -
A.3.1. Les SOCS	- 24 -
A.3.2. Les PIAS	- 25 -
A.3.3. Les phosphatases	- 25 -
<b>B. Inhibition des voies JAK et intérêt thérapeutique</b>	- 25 -
B.1. Les anticorps monoclonaux	- 26 -
B.2. Les inhibiteurs de JAK/STAT	- 26 -
<b>C. La dermatite atopique</b>	- 28 -
C.1. Physiopathologie	- 30 -
C.1.1. Altération de la barrière cutanée	- 30 -
C.1.2. Inflammation cutanée	- 32 -
C.1.2.1. Cellules résidentes et alarmines	- 32 -
C.1.2.2. Phase aigüe	- 35 -
C.1.2.2.1. Recombinaison isotypique des IgE induit par l'IL-13 et le CD40	- 35 -
C.1.2.2.2. Induction du prurit par l'IL-31 et les alarmines	- 36 -
C.1.2.2.3. Activation des éosinophiles par l'IL-5	- 37 -



C.1.2.3. Phase chronique	- 37 -
C.1.3. Importance des différents acteurs de la réponse Th2 dans les phases aiguës de la DA	- 38 -
C.2. Traitements actuels de la dermatite atopique	- 39 -
C.2.1. Local vs systémique	- 39 -
C.2.2. Dermocorticoïdes et inhibiteurs de la calcineurine	- 40 -
C.2.3. Signaux cytokiniques	- 40 -
C.2.3.1. Biothérapies	- 40 -
C.2.3.2. JAKi	- 41 -
C.2.3.2.1. Olumiant – Baricitinib	- 41 -
C.2.3.2.2. Cibinqo – Abrocitinib	- 42 -
C.2.3.2.3. Rinvoq - Upadacitinib	- 42 -
C.2.3.2.4. Contre-indications des anti-JAK	- 43 -
<b>D. Objectifs du travail de thèse</b>	- 43 -
 RÉFÉRENCES	- 45 -
 <b>GENERALITES SUR LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS DANS LA TRANSPLANTATION RENALE</b>	- 57 -
<b>A. Généralités sur la transplantation rénale</b>	- 58 -
A.1. Le rejet :	- 60 -
A.2. Les traitements immunosuppresseurs :	- 62 -
A.2.1. Corticoïdes	- 63 -
A.2.2. Inhibiteurs de la calcineurine	- 64 -
A.2.3. Antimétabolites	- 64 -
A.2.4. Immunogénéisation des lymphocytes	- 65 -
A.2.5. Inhibiteurs de l'activation lymphocytaire	- 65 -
A.2.6. Inhibiteurs de la signalisation inter-cellulaire	- 65 -
A.3. Choix de la stratégie thérapeutique	- 66 -
<b>B. Mécanismes de tolérance</b>	- 68 -
B.1. La tolérance centrale	- 69 -
B.1.1. Sélection du TCR	- 70 -
B.1.2. Sélection du BCR	- 71 -
B.1.3. Limites des mécanismes de la tolérance centrale	- 72 -
B.2. La tolérance périphérique	- 73 -
B.2.1. Les mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique	- 73 -
B.2.2. Les mécanismes extrinsèques de la tolérance périphérique	- 75 -
B.2.2.1. Les lymphocytes T régulateurs	- 75 -
	- 7 -

B.2.2.2.	Cellules régulatrices non lymphocytaires	- 77 -
<b>C.</b>	<b>Les lymphocytes B régulateurs</b>	- 78 -
C.1.	Diversité phénotypique des lymphocytes B régulateurs	- 79 -
C.1.1.	Lymphocytes B transitionnels	- 79 -
C.1.2.	Lymphocytes B mémoire	- 80 -
C.1.3.	Plasmablastes	- 80 -
C.1.4.	CD1Dhi CD5+	- 81 -
C.2.	Mécanismes effecteurs du lymphocyte B régulateur	- 81 -
C.2.1.	Cytokines	- 82 -
C.2.2.	PDL-1	- 83 -
C.2.3.	TIGIT	- 83 -
C.2.4.	Granzyme B	- 83 -
<b>D.</b>	<b>Fonction et phénotype des lymphocytes B régulateurs exprimant le Granzyme B</b>	- 84 -
<b>E.</b>	<b>Apport des lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B dans la tolérance opérationnelle et objectifs du travail de thèse</b>	- 88 -
	RÉFÉRENCES	- 90 -
	<b>RÉSULTATS</b>	- 110 -
	<b>Caractérisation biologique de molécules originales sur leur activité inhibitrice des voies JAK</b>	- 111 -
	<b>Développement de méthodes permettant la visualisation des modifications immunitaires suite à un traitement anti-JAK chez les patients atteints de DA modérée à sévère</b>	- 122 -
	<b>Caractérisation transcriptomique, phénotypique et fonctionnelle du lymphocyte B régulateur exprimant le granzyme B</b>	- 136 -
	<b>PERSPECTIVES</b>	- 177 -
<b>A.</b>	<b>Perspectives du projet de caractérisation des lymphocytes B régulateurs GZMB+</b>	- 178 -
<b>B.</b>	<b>Perspectives du projet développement d'inhibiteurs de JAK et de la caractérisation de cette inhibition dans la DA</b>	- 183 -
	<b>ANNEXES</b>	- 187 -
	<b>ANNEXE 1 : TABLEAU DES ETAPES DE MARQUAGE POUR LE PANEL « T »</b>	- 188 -

ANNEXE 2 : TABLEAU DES ETAPES DE MARQUAGE POUR LE PANEL « B, NK, MONOCYTES, DC »	- 190 -
ANNEXE 3 : TABLEAU DES ETAPES DE MARQUAGE POUR LE PANEL « FONCTIONNEL »	- 192 -
ANNEXE 4: REVUE N°1 PUBLIÉE DANS CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS	- 194 -
ANNEXE 5 : REVUE N°2 PUBLIEE DANS FRONTIERS IN IMMUNOLOGY	- 206 -
ANNEXE 6 : RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE LA CARACTERISATION TRANSCRIPTOMIQUE, PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DU LYMPHOCYTE B REGULTEUR EXPRIMANT LE GRANZYME B	- 218 -

## Liste des publications et communications

### **Articles originaux**

Sailliet, N., Mai, H., Dupuy, A., Tilly, G., Fourgeux, C., Braud, M., Giral, M., Robert, JM., Degauque, N., Danger, R., Poschmann, J., Brouard, S., Human Regulatory B cells prevent CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism dependent from Granzyme B and Lymphotoxin- $\alpha$ . (soumis)

### **Revue générale (avec comité de lecture)**

Sailliet, N., Brosseau, C., Robert, J.-M., Brouard, S., 2019. Role of JAK inhibitors and immune cells in transplantation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 47, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.05.002>

Sailliet, N., Ullah, M., Dupuy, A., Silva, A.K.A., Gazeau, F., Le Mai, H., Brouard, S., 2022. Extracellular Vesicles in Transplantation. *Front. Immunol.* 13, 800018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.800018>

Liu, Q., Li, S., Dupuy, A., Mai, H. le, Sailliet, N., Logé, C., Robert, J.-M.H., Brouard, S., 2021. Exosomes as New Biomarkers and Drug Delivery Tools for the Prevention and Treatment of Various Diseases: Current Perspectives. *IJMS* 22, 7763. <https://doi.org/10.3390/ijms22157763>

Silva, A.K.A., Morille, M., Piffoux, M., Arumugam, S., Mauduit, P., Larghero, J., Bianchi, A., Aubertin, K., Blanc-Brude, O., Noël, D., Velot, E., Ravel, C., Elie-Caille, C., Sebbagh, A., Boulanger, C., Wilhelm, C., Rahmi, G., Raymond-Letron, I., Cherukula, K., Montier, T., Martinaud, C., Bach, J.-M., Favre-Bulle, O., Spadavecchia, J., Jorgensen, C., Menasché, P., Aussel, C., Chopineau, J., Mosser, M., Ullah, M., Sailliet, N., Luciani, N., Mathieu, N., Rautou, P.-E., Brouard, S., Boireau, W., Jauliac, S., Dedier, M., Trouvin, J.-H., Gazeau, F., Trouillas, M., Peltzer, J., Monsel, A., Banzet, S., 2021. Development of extracellular vesicle-based medicinal products: A position paper of the group “Extracellular Vesicle translatiOn to clinical perspectiVEs – EVOLVE France.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 179, 114001. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114001>

### **Communications orales et posters**

**Single cell analysis of GZMB+Bregs interactions with target cells** (Communication orale)  
2021 – European Society of Transplantation Congress – du 29 au 31 juin 2021

**Single cell analysis of GZMB+Bregs interactions with target cells** (poster) 2022 – American Transplant Congress – du 04 au 08 juin 2022

## Liste des Tableaux

### Introduction

Tableau 1 : Position des résidus tyrosine activateurs dans la boucle d'activation du domaine kinase des JAKs	- 20 -
Tableau 2 : Interconnexion entre JAKs, STATs et récepteurs.	- 23 -
Tableau 3 : Exemples de gènes ciblés par STAT3 et STAT5 impliqués dans des mécanismes de progression tumorale.	- 24 -
Tableau 4 : Voies de signalisations ciblées par les SOCS.	- 25 -
Tableau 5 : Inhibiteurs de JAK et leur effet sur la signalisation de différentes cytokines.	- 28 -
Tableau 6 : Mutations connues associées à la DA. D'après (Weidinger et al., 2018)	- 31 -
Tableau 7 : TLRs et leurs ligands connus, D'après (Takeda and Akira, 2015)	- 34 -

### Résultats

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des 30 populations analysées par cytométrie spectrale	- 125 -
Tableau 2 : Marqueurs phénotypiques des 5 populations analysées dans le panel fonctionnel	- 125 -
Tableau 3 : Marqueurs additionnels analysés dans les différents clusters de chaque population de lymphocytes T, B, NK, monocyte et DC	- 130 -

## Liste des figures

### Introduction

Figure 1 : Structure générale d'une JAK sur son récepteur	- 19 -
Figure 2 : Mécanismes et acteurs de l'inflammation dans la DA	- 38 -
Figure 3 : Causes d'insuffisance rénale aigüe.	- 60 -
Figure 4 : Rejet aigu médié par les cellules T.	- 61 -
Figure 5 : Rejet aigu médié par les anticorps.	- 61 -
Figure 6 : Frise chronologique du développement des drogues immunosuppressives utilisées en transplantation.	- 63 -
Figure 7 : Sites d'action de différentes drogues immunosuppressives.	- 68 -
Figure 8 : Survie globale du greffon rénal en France pour les patients greffés entre 2007 et 2020.	- 69 -
Figure 9 : Mécanismes de la tolérance centrale impliquant les lymphocytes T.	- 70 -
Figure 10 : Étapes de génération et sélection du BCR.	- 72 -
Figure 11 : Schéma des mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique.	- 75 -
Figure 12 : Schéma des mécanismes suppressifs du lymphocyte T régulateur.	- 76 -
Figure 13 : Marqueurs des populations de lymphocytes B.	- 81 -
Figure 14 : Représentation des mécanismes supresseurs du lymphocyte B régulateur.	- 82 -

### Résultats : Caractérisation biologique de molécules originales sur leur activité inhibitrice des voies JAK

Figure 1 : Schéma de la poche catalytique d'un domaine kinase (avec l'ATP) et sites d'interactions hydrogène.	- 113 -
Figure 2 : Inhibition des voies JAK1/JAK3 et JAK2/TYK2 dépendantes par les composés de 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> génération.	- 118 -

Figure 3 : Inhibition des voies JAK1/JAK3 et JAK2/TYK2 dépendantes par les composés de troisième génération. - 120 -

Figure 4 : Inhibition de la voie JAK1/JAK3 dépendante après 4 mois de conservation en DMSO à -20°C. - 120 -

### **Résultats : Développement de méthodes permettant la visualisation des modifications immunitaires suite à un traitement anti-JAK chez les patients atteints de DA modérée à sévère**

Figure 1 : Profil des principales populations présentes dans le sang des patients atteints de DA modérée à sévère. - 127 -

Figure 2 : Profils d'expression cytokinique visualisé par gradient de couleurs en tsne. - 129 -

Figure 3 : Profils d'expression des marqueurs exprimés par les lymphocytes T effecteurs mémoire CD4+ visualisé par gradient de couleur en tsne. - 130 -

Figure 4 : Profils d'expression des marqueurs exprimés par les monocytes conventionnels visualisé par gradient de couleur en tsne. - 131 -

Figure 5 : Profils d'expression des marqueurs exprimés par le lymphocyte B mémoire ayant effectué un switch de classe visualisé par gradient de couleur en tsne. - 131 -

Figure 6 : Profil d'expression des cellules dendritiques visualisé par gradient de couleur en tsne - 131 -

## Liste des abréviations

ABMR	Antibody Mediated Rejection
ADCT	Atopic Dermatitis Control Tool
AIRE	AutoImmune REgulator
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AP-1	Activating Protein 1 (Facteur de transcription)
ASMR	Amélioration du Service Médical Rendu
BID	BH3-interacting domain death agonist
Bregs	Regulatory B cells
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNI	Calcineurine inhibitors
CREB/CREM	c-AMP Responsive Element Binding /Modulator
CSR	Class Switch Recombination
DA	Dermatite Atopique
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DC	Cellules Dendritiques
DLQI	Dermatology Life Quality Index
EASI	Eczema Area and Severity Index
FERM	4.1 Ezrin Radixin Moesin
GAL3/LGALS3	Galectine 3 (protéine / gène)
GRE/nGRE	Glucocorticoïdes Response Element / negative Glucocorticoïdes Response Element
GZMB	Granzyme B
HAS	Haute Autorité de Santé
ICAD	inhibitor of caspase activated DNase
ICOS	Inducible COStimulation
IDO	Indoléamine 2-3, DiOxygénase
IFNAR	Récepteur aux interférons alpha
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukines
JAK	Janus kinase
JH	JAK Homology
KIR	Kinase Inhibitory Region
LB	Lymphocytes B
LC	Cellules de Langerhans
LTA/LTB	Lymphotoxine alpha/beta
LPS	LipoPolySaccharide
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T cells (Facteur de Transcription)



NF-kB	Nuclear Factor kB (Facteur de Transcription)
NK	Natural Killer
OLII	Organes Lymphoïdes secondaires
PAMP	Pathogen Associated Moléculaire Pattern
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PO-SCORAD	Patient Oriented SCORAD
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTPases	Protéines Tyrosine Phosphatases
SCORAD	Scoring Atopic Dermatitis
scRNAseq	Single Cell RNA sequencing
SH	Src Homology domain
SMR	Service Médical Rendu
SOCS	Suppressors Of Cell Signaling
STA	Patient with stable kidney functions
STATs	Signal Transducer and Activators of Transcription
TCMR	T Cell Mediated Rejection
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TdT	Terminal deoxynucléotidyl Transferas
TFH	Lymphocytes T folliculaire helper
Th	Lymphocytes T helper
TLR	Toll Like Receptor
TOL	Tolerant patients
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
TSLP	Thymic Stromal LymphoPoïétine
TYK	Tyrosine Kinase



# Chapitre I

---

## Généralités sur les inhibiteurs des voies JAK dans la Dermatite Atopique

## A. Généralités sur les voies JAK/STAT

Dès le début de son Histoire, le vivant s'est doté d'une formidable capacité à interagir avec son environnement. Cette communication bilatérale permet de rendre compte de son état, de ses besoins, et de ses capacités. Elle s'opère à différentes échelles : au niveau moléculaire, la communication se fait souvent soit par la présence ou l'absence d'une molécule, qui peut être séquestrée, migrer d'un compartiment cellulaire vers un autre ou être nouvellement produite, soit par modification post-traductionnelle de la molécule, telles que phosphorylations, glycosylations, méthylations ou par digestion enzymatique. À l'échelle de la cellule, ces mécanismes de communication ont permis l'avènement des organismes multicellulaires plus développés que de simples amas de cellules. Transport de nutriments, motilité, induction de l'apoptose ou de la prolifération, différentes fonctions cellulaires ne sont plus induites directement par une réponse à un stimulus, mais vont passer par un intermédiaire, une cellule (sensorielle) qui capte l'information extérieure et la transmet à une autre cellule (effectrice) qui va agir. Les signaux intercellulaires peuvent être de plusieurs natures, nécessitant un contact cellulaire (principalement des signaux électriques ou mécaniques) ou induit par la sécrétion de signaux chimiques. Parmi les nombreuses voies de signalisation permettant la communication cellulaire, les voies des Janus kinases (JAK) - Signal Transducer and Activators of Transcription (STATs) sont très largement utilisées par le système immunitaire.

### A.1. Les Janus kinases

Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, la découverte des Interférons par Isaacs et Lindenmann (Isaacs and Lindenmann, 1957) ouvre une nouvelle porte de l'immunologie : la communication intercellulaire médiée par les cytokines. Ces messagers extracellulaires, circulant librement à travers l'organisme dans le réseau sanguin permettent d'induire efficacement, et spécifiquement l'activation, la différenciation, la prolifération ou la migration de certaines cellules. On connaît aujourd'hui plus de cent cytokines regroupées suivant l'homologie de leurs structures en différentes familles : interleukines (IL-1 – IL-41), interférons (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$ ,  $\omega$ ,  $\tau$ ), deux facteurs de nécrose tumoraux (TNF $\alpha$ ,  $\beta$ ), des lymphotoxines (LT $\alpha$ , LT $\beta$ ) et deux facteurs de croissance transformants (TGF $\alpha$ ,  $\beta$ ) (Akdis et al., 2016). Proches des cytokines, des chemokines (de type C, CC, CXC, CX3C suivant la position des cystéines dans leurs récepteurs), des facteurs de stimulation de colonies (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) et des facteurs de croissance

(EPO, TPO, EGF, FGF, PDGF) vont aussi jouer un rôle dans la communication des cellules hématopoïétiques. Les voies JAK/STAT permettent l'internalisation du signal et la réponse transcriptionnelle de différentes familles de cytokines (interferons de type I et II, familles de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IL-12, ayant un récepteur partageant les chaînes communes gamma ou beta, ainsi que de nombreux facteurs de croissance hématopoïétique (Leonard and O'Shea, 1998). Les JAK sont une famille de 4 kinases : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Des études ont montré que les 4 JAK ont des fonctions différentes et non redondantes. Ainsi, des souris KO pour JAK1 ou JAK2 ne dépassent pas le stade de l'embryogenèse tandis que des KO pour JAK3 ou TYK2 « n'ont que » des défauts immunitaires importants (Ghoreschi et al., 2009; Macchi et al., 1995; Parganas et al., 1998; Rodig et al., 1998).

#### A.1.1. Structure des JAK

Les JAK tirent leur nom du dieu romain Janus, le dieu aux deux visages. Comparaison liée à la découverte de deux domaines kinases dans la séquence des 4 enzymes. Chez l'homme les JAK sont des protéines d'environ 1200 acides aminés. JAK1 se situe sur le locus 1p31.3, JAK2 au locus 9p24.1, JAK3 au locus 19p13.11 et TYK2 au locus 19p13.2. Les JAKs sont composées de 7 domaines d'homologie (JH1-7) associés aux différentes fonctions de la molécule. Le domaine kinase (JH1) se trouve en carboxy-terminal, suivi par un domaine pseudokinase (JH2) et deux domaines de liaison au récepteur : un domaine SH2-like (JH3-4) et un domaine 4.1 Ezrin, Radixin, Moesin (FERM, JH5-7) coté N-terminal (Figure 1).

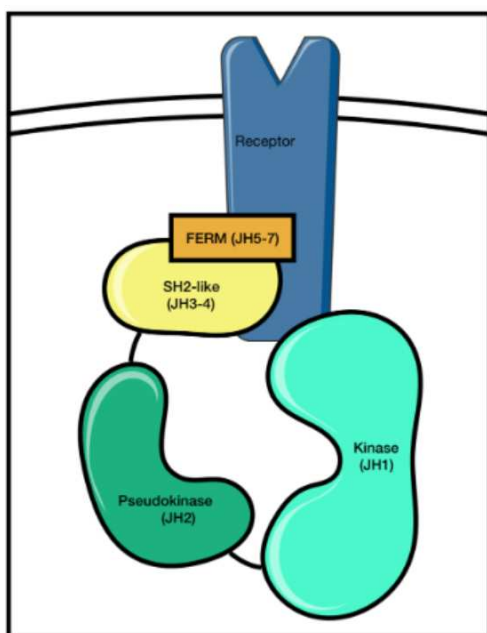


Figure 1 : Structure générale d'une JAK sur son récepteur

Tableau 1 : Position des résidus tyrosine activateurs dans la boucle d'activation du domaine kinase des JAKs

<b>Kinase</b>	<b>Résidus Tyr dans la boucle d'activation</b>
JAK1	Y1038 ; Y1039
JAK2	Y1007 ; Y1008
JAK3	Y980 ; Y981
TYK2	Y1054 ; Y1055

#### A.1.1.1. Domaine kinase

Le domaine kinase JH1 porte l'activité enzymatique principale de la JAK. Les kinases sont des structures protéiques, découpées en 12 sous-domaines possédant des structures fortement conservées (Dixit et al., 2009), nécessitant la présence de certains acides aminés à des positions très particulières dans leur séquence. Des études structurales ont montré que dans un état non activé, la boucle d'activation ne permet pas à l'ATP d'accéder à la poche catalytique (Hubbard et al., 1994). Ce n'est que l'autophosphorylation de résidus tyrosines dans cette boucle d'activation qui permet un changement de conformation et démasque le site de liaison à l'ATP. De tels sites phosphorylables existent en différents exemplaires sur les JAKs (tableau 1) et l'inhibition de chaque site a des effets plus ou moins prononcés sur l'activité catalytique, pouvant soit la réduire, soit l'augmenter. Par exemple, la mutation du résidu Y980 de JAK3 réduit partiellement l'activité enzymatique de la kinase, celle du résidu Y981 l'augmente (Zhou et al., 1997) alors que celle des deux résidus Y1054 et Y1055 homologues des résidus Y980 et Y981 de JAK3 sur TYK2 bloquent l'autophosphorylation sans toutefois abroger son activité (Gauzzi et al., 1996). Ainsi, bien que les 4 JAKs aient une forte homologie, la régulation interne de ces kinases est unique.

#### A.1.1.2. Domaine pseudo kinase

La principale particularité des JAK est la présence du domaine pseudokinase, second domaine kinase donc l'activité a longtemps été indéterminée. Ce domaine possède tous les éléments structurels d'un domaine kinase (boucle d'activation, poche catalytique) mais ceux-ci sont altérés au niveau de certains motifs nécessaires à la fonction enzymatique. Par exemple, on retrouve dans le sous-domaine I de la pseudokinase, une délétion du 3<sup>ème</sup> résidu Gly dans la séquence canonique GXGXXG, présente dans 95% des protéines interagissant avec des

nucléotides (Hanrs and Hunter, 1995). On retrouve également une mutation d'un résidu Phe dans le motif Asp-Phe-Glu du sous-domaine VII qui permet la liaison à l'ATP et une mutation sur un résidu Asp du sous-domaine VIb servant d'accepteur de protons lors du transfert du groupement phosphate. A cause de ces mutations, il a longtemps été cru que ce domaine pseudokinase ne possédait pas d'activité catalytique. Cependant, des travaux plus récents ont montré que la pseudokinase de JAK2 est capable de phosphoryler le domaine kinase associé sur les résidus Ser523 et Tyr570. La phosphorylation de ces résidus permet au domaine kinase de conserver un niveau d'activation basal minimal (Ungureanu et al., 2011). La pseudokinase a donc un rôle inhibiteur du domaine kinase empêchant son activation en absence de la cytokine (Saharinen and Silvennoinen, 2002).

#### A.1.1.3. Domaines de liaison

Les domaines de liaison permettent de relier la JAK à son récepteur membranaire (Frank et al., 1995, 1994; Hofmann et al., 2004; Kohlhuber et al., 1997; Zhao et al., 1995). Ce sont les régions les plus variables entre les JAK (Radtke et al., 2005). Des études sur des protéines recombinantes des parties N-terminales ont montré que pour JAK2 et JAK3, seules les régions JH6 et JH7 (domaine FERM minimal) étaient nécessaires pour fixer leurs récepteurs respectifs (Chen et al., 1997; Kohlhuber et al., 1997), alors que l'association de TYK2 sur l'IFNAR1 nécessite les JH5-7 (domaine FERM) (Yan et al., 1998), et que toute la région N-terminale, JH3 à 7 (SH2-like et FERM), est nécessaire pour l'interaction entre JAK1 et le récepteur à l'interféron gamma (Kohlhuber et al., 1997).

Les données de liaison entre les JAKs et les récepteurs aux cytokines ont rapidement mis en avant la non-exclusivité de ces interactions. Chaque récepteur est capable de recruter spécifiquement un complexe de deux ou trois JAKs, principalement des hétérodimères (JAK1-JAK2, JAK1-JAK3, JAK1-TYK2, JAK2-TYK2), mais on peut retrouver des homodimères JAK2-JAK2, et des hétérotrimères JAK1-JAK2-TYK2 (O'Shea et al., 2015).

#### A.1.2. Voie de signalisation JAK/STAT

Grâce au regroupement des chaînes du récepteur et donc des JAKs sous forme de complexe, l'activité d'autophosphorylation est complétée par une transphosphorylation des JAKs d'un même complexe entre elles, stimulant d'autant plus leur activité kinase (Matsuda et al., 2004). Activées, les JAKs phosphorylent alors des résidus situés dans les régions intracytoplasmiques

des récepteurs auxquels elles sont associées. Ces sites de phosphorylation découvrent des sites de fixation pour des domaines SH2 et ainsi, permettent le recrutement des STATs, qui sont subséquemment phosphorylées pour agir comme facteurs de transcription. Ainsi, cette voie de signalisation ne passe que par deux intermédiaires entre le récepteur situé sur la membrane cellulaire et l'ADN et son atout principal est sa rapidité d'action, permettant l'interaction des STATs avec leurs sites de liaison quelques minutes seulement après la liaison de la cytokine sur son récepteur (Gillinder et al., 2017).

#### A.2. Les STATs

7 STATs ont été identifiées, avec une spécificité pour des séquences présentes à la fois sur le récepteur et sur les JAKs promue par des domaines SH2. Les STATs sont des protéines d'approximativement 750 – 850 acides aminés codées par des gènes situés sur les locus 2q32.2 (STAT1 et STAT4), 12q14.1 (STAT2), 17q21.2 (STAT3, STAT5A, STAT5B) et 12q13.13 (STAT6). À la suite de leur phosphorylation, les STATs se dimérisent en homodimères ou en hétérodimères, via des domaines SH2. Le dimère de STATs est ensuite capable de migrer vers le noyau et de se lier à l'ADN pour moduler l'expression de nombreux gènes possédant des sites de fixation aux STATs (GAS : Gamma-interferon Activating Site, IRSE : Interferon Stimulated Response Element). Ces sites de fixation sont souvent retrouvés en tandem, permettant la fixation de deux dimères de STAT, qui ont la capacité de térameriser et ainsi de dupliquer leur affinité, notamment lorsque les motifs de liaison sont imparfaits et ne permettent qu'une liaison partielle des dimères STATs (John et al., 1996; Sperisen et al., 1995; Xu et al., 1996).

#### A.3. Spécificité des voies JAK/STATs

Comme nous l'avons vu, il n'existe que sept STATs et quatre JAKs pour plus de cinquante voies de signalisation. Il existe donc une certaine redondance entre ces signaux (tableau 2). Toutefois, il n'existe pas d'association spécifique de dimères de STATs selon les dimères de JAK. La spécificité entre deux cytokines qui activent les mêmes voies JAK et STATs se fait donc en amont, au niveau de mécanismes de production des cytokines et de leurs récepteurs. Chaque configuration de dimères de STAT a une spécificité transcriptionnelle qui lui est propre et l'inhibition spécifique de chaque STAT peut permettre de cibler des ensembles de gènes différents, mais non exclusifs (Alvarez and Frank, 2004) (tableau 3).



Tableau 2 : Interconnexion entre JAKs, STATs et récepteurs. D'après (Leonard and O'Shea, 1998)

Type I Cytokines	Jaks	STATs
<i>Cytokines whose receptors share <math>\gamma_c</math></i>		
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	Jak1, Jak3	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-4	Jak1, Jak3	Stat6
IL-13*	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat6
<i>Cytokines whose receptors share <math>\beta_c</math></i>		
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2	Stat5a, Stat5b
<i>Cytokines whose receptors share gp130</i>		
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat3
IL-12 <sup>+</sup>	Jak2, Tyk2	Stat4
Leptin <sup>+</sup>		Stat3
<i>Cytokines with homodimeric receptors</i>		
Growth hormone	Jak2	Stat5a, Stat5b, Stat3
Prolactin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Erythropoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Thrombopoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
<u>Type II Cytokines</u>		
<i>Interferons</i>		
IFN $\alpha$ , IFN $\beta$	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2
IFN $\gamma$	Jak1, Jak2	Stat1
IL-10 <sup>‡</sup>	Jak1, Tyk2	Stat3

\*IL-13 does not share  $\gamma_c$  but uses IL-4R $\alpha$ .

<sup>+</sup>IL-12 and leptin do not share gp130, but their receptors are related to gp130.

<sup>‡</sup>IL-10 is not an interferon, but its receptor is a type II cytokine receptor.

### I.A.1. Régulation de la voie JAK/STAT

Le contrôle du niveau d'activation est un élément important de ces voies de signalisation en aval de cytokines et facteurs de croissance, en amont de mécanismes d'activation et de prolifération. Cette régulation est opérée par les SOCS (Suppressors Of Cell Signaling) et les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT), deux boucles de rétrocontrôle qui permettent une régulation précise du niveau d'activation de cette voie de signalisation. En plus de ces rétrocontrôles, l'inhibition des voies JAK/STATs dépend aussi de l'activité de tyrosine phosphatases, dont l'activité s'oppose aux STATs (Böhmer and Friedrich, 2014; Croker et al., 2008; Liang et al., 2017; Linossi and Nicholson, 2015).

Tableau 3 : Exemples de gènes ciblés par STAT3 et STAT5 impliqués dans des mécanismes de progression tumorale. D'après (Alvarez and Frank, 2004)

Protéine	Fonction	Gene
STAT3	Prolifération	c-myc
	Prolifération	Cycline D1
	Prolifération	Cycline D2
	Prolifération	Cycline D3
	Prolifération	Cycline A
	Prolifération	P21 Cycline D1
	Survie & Prolifération	Pim-1 et Pim-2
	Survie	Survivine
	Survie	FAS
	Survie	MCL-1
	Survie	BCL-XL
	Survie	BCL-2
	Angiogenèse	VEGF
	Invasion / métastases	MMP-2
	Transformation	MMP-9
STAT5	Prolifération	Cycline D1
	Prolifération	c-myc
	Prolifération	Cycline D2
	Prolifération	Cycline D3
	Prolifération	Cycline E
	Survie	BCL-XL
	Survie	Pim-1
	Survie	BCL-2

### A.3.1. Les SOCS

Les SOCS sont une famille de 8 protéines possédant une région inhibitrice de kinases (KIR) et deux domaines SH2 et SOCS. La majorité des études ont été faites sur SOCS1 et SOCS3 (Croker et al., 2008) (Tableau 4). Pour SOCS1 les domaines KIR et SH2 permettent la liaison au domaine kinase de la JAK induisant ainsi son inhibition compétitrice en bloquant le recrutement de la STAT (Linossi and Nicholson, 2015). Pour SOCS3, les domaines KIR et SH2 permettent

l'interaction avec le complexe récepteur/JAK, bloquant de façon incompétitive la phosphorylation de la STAT. Le domaine SOCS permet la polyubiquitinylation et la dégradation du complexe par le protéasome (Linossi and Nicholson, 2015).

Tableau 4 : Voies de signalisations ciblées par les SOCS. D'après (Croker et al., 2008)

SOCS	Rôle démontré dans la signalisation de :
CIS	Hormone de croissance (GH), prolactine, IL-2
SOCS1	IFN- $\gamma$ , IL-2 (famille)
SOCS2	GH
SOCS3	G-CSF, IL-6, LIF, IL-23, leptine
SOCS4	IL-2
SOCS5	IL-4
SOCS6	Unknown
SOCS7	Unknown

#### A.3.2. Les PIAS

Les PIAS interagissent directement avec la forme dimérique, et donc activée, des STATs. Ils empêchent leur translocation au noyau et donc leur activité transcriptionnelle (Niu et al., 2018). Chez la drosophile, la surexpression de dPIAS permet de contrebalancer l'activation constitutive de STAT92E (homologue des STATs de mammifères) induite par une leucémie et est suffisante pour bloquer la signalisation JAK/STAT (Betz et al., 2001).

#### A.3.3. Les phosphatases

Les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPases) sont des enzymes qui fonctionnent à l'exact opposé des tyrosines kinases. L'activation des voies JAK/STAT nécessite la phosphorylation du domaine kinase de la JAK, du récepteur et de la STAT. Il n'est donc pas surprenant que des PTPases puissent antagoniser cette signalisation sur ces différents niveaux (Böhmer and Friedrich, 2014).

### B. Inhibition des voies JAK et intérêt thérapeutique

De nombreuses pathologies chroniques sont associées à une production importante de cytokines pro inflammatoires, et notamment des cytokines qui agissent via la voie JAK/STAT. Étant données les fonctions de ces cytokines dépendantes des voies JAK, les molécules ciblant et inhibant ces voies JAK ont un potentiel immunomodulateur, antiprolifératif et anti-

inflammatoire. Deux catégories de médicaments peuvent cibler les voies JAK/STAT : les anticorps monoclonaux dirigés contre les cytokines ou leurs récepteurs et des inhibiteurs et/ou des petites molécules chimiques inhibitrices des JAKs et / ou des STATs.

#### B.1. Les anticorps monoclonaux

L'utilisation d'agents biologiques en thérapie est assez récente. L'OKT3 (Muromonab) a été le premier anticorps monoclonal à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 1986 dans la prévention du rejet de greffe (Leavy, 2010). Cet anticorps cible et bloque la chaîne CD3 du récepteur des cellules T. Cependant son utilisation a été limitée à cause d'effets secondaires importants (Sgro, 1995). Depuis, d'autres anticorps monoclonaux, ciblant des cytokines ou leurs récepteurs, ont été développés avec l'objectif de bloquer le plus spécifiquement possible la voie de signalisation dans un contexte pathologique. Les plus connus sont les anti-TNF $\alpha$  (Étanercept, Adalimumab, Infliximab, Certolizumab, Golimumab), utilisés dans les maladies auto-inflammatoires, la polyarthrite rhumatoïde, la dermatite atopique, la maladie de Crohn ou la Spondylarthrite Ankylosante. On peut aussi citer les anti-IL-1 (Canakinumab), anti-IL-6R (Tocilizumab, Sarilumab) ou l'anti IL-12/IL-23 (Ustekinumab) (Lai and Dong, 2016). Cet arsenal thérapeutique a permis de contrôler l'inflammation et de réduire efficacement les symptômes. Cependant, l'un des grands freins à l'utilisation des anticorps monoclonaux est leur immunogénicité. La reconnaissance des anticorps étrangers par le système immunitaire favorise leur élimination et réduit leur efficacité. Environ 30% des patients ne répondent pas ou ne répondent plus à ces biothérapies (So, 2007). Pour contrer cette immunogénicité, deux stratégies sont développées. Soit les anticorps sont humanisés pour réduire directement leur immunogénicité, soit ils sont administrés en thérapie combinée avec des immunosuppresseurs.

#### B.2. Les inhibiteurs de JAK/STAT

Les inhibiteurs de JAK sont des petites molécules chimiques de 300 à 500Da capables de se fixer dans la poche catalytique du domaine kinase des JAKs, ou sur les sites SH2 et de liaison à l'ADN des STATs (Deuse et al., 2008; Furqan et al., 2013). Contrairement aux anticorps monoclonaux qui se fixent sur des cibles extracellulaires, les inhibiteurs de JAK et STAT sont capables de pénétrer les épithéliums et la membrane cellulaire, augmentant ainsi l'éventail des cibles potentielles (Bos and Meinardi, 2000; Nakajima et al., 2016; Nakamura et al., 2017).

Enfin, l'efficacité des inhibiteurs de JAK et des anticorps monoclonaux permet de posséder un éventail thérapeutique permettant de cibler les voies cytokiniques suivant différentes modalités, soit de façon très précise avec des anticorps monoclonaux, soit de façon un peu plus large en utilisant des inhibiteurs de JAK / STAT. Comme nous l'avons vu, les JAKs et les STATs sont des protéines très conservées, notamment les sites qui portent la fonction des protéines, de forte homologie. Il est donc compliqué de développer une molécule capable de se lier uniquement à l'une ou l'autre des JAKs, ou des STATs. C'est pourquoi la vaste majorité des inhibiteurs sur le marché ne possèdent pas une spécificité stricte envers un membre de ces deux familles, mais vont être capables d'en lier plusieurs avec des affinités plus ou moins fortes (McLornan et al., 2021). Le Tofacitinib par exemple, premier inhibiteur de JAK à avoir reçu une AMM était initialement décrit comme un inhibiteur spécifique de JAK3 (Changelian et al., 2003), avant d'être reclassé comme inhibiteur JAK1/JAK3, avec une activité plus faible sur JAK2 et TYK2, faible spécificité que l'on retrouve pour de nombreux autres inhibiteurs de JAK (Traves et al., 2021) (tableau 5). Cette variation dans la spécificité des inhibiteurs de JAK pour leurs cibles va renforcer d'autant plus l'importance de choisir l'une ou l'autre de ces molécules dans une stratégie thérapeutique, où la faible spécificité peut être une modalité recherchée, ou à éviter (Alves de Medeiros et al., 2016; Ghoreschi et al., 2011; Moodley et al., 2016; Tefferi and Pardanani, 2011). Les inhibiteurs de JAK doivent se trouver à l'interface entre une inhibition suffisamment large pour être efficace dans un contexte pathologique, mais aussi suffisamment précise pour ne pas entraîner une immunosuppression trop importante pouvant elle aussi devenir délétère. Cette dualité est à évaluer et à définir pour chaque contexte pathologique.

Tableau 5 : Inhibiteurs de JAK et leur effet sur la signalisation de différentes cytokines (IC<sub>50</sub>) D'après (Traves et al., 2021)

Table 1 JAKinib IC <sub>50</sub> values in CD4+ T-cells, monocytes and NK cells from whole blood assays															
Stimulation/pSTAT	CD4+ T-cells					Monocytes					NK cells				
	BARI	FIL	MET	TOFA	UPA	BARI	FIL	MET	TOFA	UPA	BARI	FIL	MET	TOFA	UPA
IC <sub>50</sub> , nM															
JAK2/JAK2 or JAK2/TYK2-dependent cytokines															
G-CSF/pSTAT3			NS			81	4977	50215	292	81			NS		
GM-CSF/pSTAT5			NS			127	9916	102910	510	74			NS		
IL-12/pSTAT4			NS			NS					269	10351	221777	1216	364
JAK1/JAK2/TYK2-dependent cytokines															
IFN $\alpha$ /pSTAT1	50	1096	17161	98	30	192	4560	91078	393	83	131	2440	41161	256	117
IFN $\alpha$ /pSTAT3	39	871	12644	80	24	40	991	15793	86	17	30	675	8620	60	25
IFN $\alpha$ /pSTAT5	28	638	9587	49	17	25	613	9518	51	11	34	507	7484	50	26
IFN $\gamma$ /pSTAT1			NS			74	4138	62374	228	58			NS		
IL-6/pSTAT1	29	783	5637	63	27	39	1011	10019	84	22			NS		
IL-6/pSTAT3	274	5435	62680	644	225	161	3527	49109	368	100			NS		
JAK1/JAK3-dependent cytokines															
IL-2/pSTAT5	40	988	14079	40	21			NS			80	2153	23824	87	56
IL-4/pSTAT6	73	1458	39420	77	36	53	1337	36537	116	32	40	869	20984	45	25
IL-15/pSTAT5	38	967	14326	39	21			NS			83	2044	27540	93	58

G-CSF, GM-CSF, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-2, IL-4 and IL-15 reported IC<sub>50</sub> values are based on the average of duplicates from 7–10 healthy volunteer whole blood. BARI, baricitinib; FIL, filgotinib; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; IC<sub>50</sub>, half maximum inhibitory concentration; IFN, interferon; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; JAKinib, Janus kinase inhibitor; MET, major metabolite of filgotinib (GS-829845); NK, natural killer cell; NS, not sampled; pSTAT, phosphorylated signal transducer and activator of transcription; TOFA, tofacitinib; TYK2, tyrosine kinase 2; UPA, upadacitinib.

### C. La dermatite atopique

La Dermatite Atopique (DA), encore appelée eczéma atopique est une maladie inflammatoire chronique. Très fréquente, elle se développe à tous les âges, principalement pendant l'enfance ou elle affecte 20% de la population dans les pays développés (Odhiambo et al., 2009; Silverberg and Hanifin, 2013). Les signes cliniques sont très hétérogènes (Williams, 2000), pouvant se déclarer à n'importe quel âge. Il existe une grande majorité de formes légères à modérée de la maladie qui se résorbent avec le temps, généralement au passage de l'adolescence à l'âge adulte (Abuabara et al., 2018b). Les formes les plus sévères touchent 10% des patients et nécessitent leur prise en charge (Abuabara et al., 2018a). Cependant, malgré sa fréquence, la DA est difficile à diagnostiquer en l'absence de tests spécifiques. Aujourd'hui encore, le diagnostic de la DA ne repose que sur l'examen clinique, qui s'appuie sur différents critères permettant de distinguer les principales conditions inflammatoires en dermatologie. Ainsi la DA se caractérise par un prurit intense, des lésions eczémateuses. C'est une pathologie qui évolue avec des phases aiguës et chroniques. La temporalité des phases aiguës et chroniques est propre à chaque lésion et les deux peuvent co-exister chez un patient. En addition à ces caractéristiques essentielles à la définition de la DA, les patients peuvent développer différents signes cliniques : chez le nourrisson, les lésions peuvent se caractériser par des plaques érythémateuses diffuses et des excoriations au niveau de la face, des joues et

de la poitrine. Chez l'enfant, les lésions sont plus localisées, principalement au niveau des articulations, avec un assèchement (xérosis) un épaissement (lichénification) de la peau. Chez l'adolescent et l'adulte, les lésions sont plus diffuses et se concentrent au niveau des mains, de la tête et du cou (Brenninkmeijer et al., 2008). Pour se retrouver dans cette disparité de symptômes, la sévérité de la DA peut être mesurée à l'aide de scores, le plus connu et largement utilisé étant le SCORAD (Scoring Atopic Dermatitis). Le SCORAD est un score composite composé pour 60% d'attributs cliniques, 20% d'évolution de la pathologie et 20% de ressenti subjectif du patient (Schmitt et al., 2009). D'autres scores existent reprenant la même base, orientés uniquement sur des signes cliniques et sur l'évolution de la pathologie comme l'EASI (Eczema Area and Severity Index), à 50% sur l'intensité des lésions et 50% sur leur évolution, ou au contraire mettant l'accent sur la qualité de vie du patient PO-SCORAD, DLQI, ADCT (Patient Oriented SCORAD, Dermatology Life Quality Index, Atopic Dermatitis Control Tool). Néanmoins, malgré la multiplication des scores utilisables, et la diversité des critères pris en compte, l'utilisation de valeurs seuils appropriées leur permet de classer les patients en groupes de DA légère, modérée et sévère (Chopra et al., 2017; Spuls et al., 2017).

Comme pour de nombreuses maladies auto-immunes ou allergiques, le risque de développer une DA dépend de nombreux facteurs environnementaux (Williams, 2000). Parmi ces facteurs, on retrouve de nombreux agents microbiens, notamment *staphylococcus aureus*, qui est l'espèce la plus représentée dans le microbiote de plus de 90% des patients DA, et en majorité absolue sur les sites lésionnels (Totté et al., 2016). Le rôle du genre *Malassezia* a été plus récemment mis en évidence dans la dysbiose cutanée de la DA (Bjerre et al., 2021) et plus particulièrement dans les formes cervico-faciales. En interagissant avec la barrière cutanée et induisant des modifications immunitaires, ce microbiote spécial favorise l'inflammation chronique, notamment lors d'une dysbiose précoce (Meylan et al., 2017).

L'alimentation est aussi une forte composante étiologique de nombreuses allergies, fréquentes chez l'enfant, dont la DA (Sampson, 2016). Le lien entre alimentation et dermatoses atopique a été très étudié (Barnetson and Merrett, 1983; Bever et al., 1989; Pourpak et al., 2004).

La pollution (microparticules, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) tend aussi à aggraver les symptômes de manière générale (Kim et al., 2021). Enfin, un dernier élément important de l'environnement lié à la DA, est le climat. L'effet saisonnier de la DA, est variable entre les patients. Chez certains patients, les signes cliniques sont plus importants pendant l'hiver. Pour d'autres patients, ce sera au printemps, l'automne ou l'été (Morren et al., 1994). Cet effet est causé par de multiples facteurs comme la température, la luminosité ou le vent. Et d'une manière générale, les extrêmes sont à éviter pour les patients : là où le froid et le vent assèchent la peau et favorisent la xérose, ils évitent aussi l'excès de sueur dont l'acidité favorise le prurit (Murota et al., 2019). L'action de ces modificateurs météorologiques est donc à intégrer dans une multitude de cofacteurs dont l'équation globale est encore aujourd'hui loin d'être comprise.

### C.1. Physiopathologie

#### *C.1.1. Altération de la barrière cutanée*

Chez les patients atteints de DA, on retrouve fréquemment des mutations dans des gènes impliqués dans l'intégrité de la peau. Les mutations les mieux documentées dans la DA se trouvent sur le gène de la filaggrine, codant normalement pour une protéine de structure de la peau impliquée dans le maintien de la barrière cutanée et muté chez 20-40% des patients (Sandilands et al., 2007). Ces mutations qui multiplient par 3 à 5 le risque de développer la DA sont aussi retrouvées dans de nombreux cas d'allergies cutanées, alimentaires ou encore dans l'asthme (Irvine et al., 2011; Rodríguez et al., 2009). Outre des protéines structurales, on retrouve aussi des mutations dans différents gènes associés au système immunitaire, notamment au niveau du locus 5q31.1 dans lequel on retrouve les gènes de différentes cytokines de type 2 dont l'IL-4 et l'IL-13 (Koh et al., 2010; Weidinger et al., 2018). Il existe donc, chez ces patients, un terrain favorisant le contact entre le système immunitaire et des antigènes exogènes, au travers d'une barrière cutanée incapable de remplir son rôle immunologique. La fragilité de ce terrain est accrue par les signes cliniques de la DA, notamment par le prurit qui induit des dommages physiques lors du grattage ou par la dysbiose microbienne qui favorise l'activation de l'immunité. Les mutations connues associées à une susceptibilité accrue à la DA sont listées tableau 6.



Tableau 6 : Mutations connues associées à la DA. D'après (Weidinger et al., 2018)

Locus	Gènes	Fonctions
<i>Voies cytokiniques</i>		
2q12.1	<i>IL1RL1</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL-33 ; impliqué dans la fonction des lymphocytes T CD4+
	<i>IL18R1</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL-18 ; Impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire via NF-κB
3p22.3	<i>IL18RAP</i> <i>CCR4</i>	CC-chemokine receptor; Impliqué dans la migration cellulaire
5p13.2	<i>IL7R</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL-7 et au TSLP ; impliqué dans la prolifération de progéniteurs lymphocytaires, le relargage de chimiokines et l'induction des réponses T CD4+ de type 2
5q22.1	<i>TSLP</i>	Impliqué dans release le relargage de chimiokines et l'induction des réponses T CD4+ de type 2
	<i>IL15RA</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL-15 ; impliqué dans la prolifération et la stimulation lymphocytaire
10p15.1	<i>IL2RA</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL-2 ; impliqué dans la prolifération et la stimulation lymphocytaire
17q21.2	<i>STAT3</i>	Facteur de transcription ; Impliqué dans la transduction de signaux
20q13.33	<i>TNFRSF6B</i>	Membre des récepteurs de la famille du TNF ; Impliqué dans la protection contre l'apoptose

*Différenciation leucocytaire*

1q21.3	<i>IL6R</i>	Sous-unité du récepteur à l'IL -6 ; Impliqué dans la différenciation lymphocytaire, notamment des lymphocytes B
4q27	<i>IL2</i> <i>IL21</i>	Impliqué dans la différenciation, activation et prolifération de différents types immunitaires (Lymphocytes B et T, macrophages et natural killer)
5q31.1	<i>IL4</i> <i>IL13</i>	Impliqué dans la prolifération des lymphocytes B et la commutation de classe en IgE
7p22.2	<i>CARD11</i>	Impliqué dans la signalisation TCR et l'activation de la voie NF-κB
11q13.5	<i>LRRC32</i>	Impliqué dans la régulation des lymphocytes T régulateurs et du TGFβ
14q13.2	<i>PPP2R3C</i>	Impliqué dans la régulation de phosphatases et l'AICD (activation-induced Cell Death)

*Facteurs de transcription*

1q21.2	<i>CIART</i>	Impliqué dans la répression de la transcription associée au cycle circadien
8q21.13	<i>ZBTB10</i>	Facteur de transcription
9p21.3	<i>DMRTA1</i>	Facteur de transcription
17q21.32-q21.33	<i>ZNF652</i>	Facteur de transcription

*Activité structurale*

1q21.3	<i>FLG</i>	Impliqué dans la différenciation épidermale terminale
2q24.3	<i>XIRP2</i> <i>ACTL9</i>	Impliqué dans le cytosquelette d'actine, les jonctions cellulaires et la protection des filaments d'actine contre la dépolymérisation
19p13.2	<i>ADAMTS10</i>	Impliqué dans l'activité des métalloprotéases et la production de la matrice extracellulaire

### *Présentation antigénique*

---

2p13.3	<i>CD207</i>	C-type lectine spécifique du mannose ; récepteur des cellules de Langerhans ; impliqué dans la présentation antigénique
6p21.32	<i>HLA-DRB1</i>	Impliqué dans la présentation antigénique, CMH de classe II
6p21.33	<i>HLA-B</i>	Impliqué dans la présentation antigénique, CMH de classe I

### *Régulation de la production cytokinique*

---

11p15.4	<i>NLRP10</i>	Impliqué dans la régulation du système immunitaire inné, production de cytokines pro-inflammatoires, inhibition de l'apoptose
11q24.3	<i>ETS1</i>	Facteur de transcription ; Impliqué dans le contrôle de l'expression cytokinique

### *Modifications post-transcriptionnelles*

---

2p16.1-p15	<i>PUS10</i>	Impliqué dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN
------------	--------------	---

### *Inconnu*

---

2p25.1	<i>LINC00299</i>	Long non-coding RNA
--------	------------------	---------------------

### *Transport membranaire*

---

3p21.1	<i>RFT1</i>	Impliqué dans le transport d'oligosaccharides vers la lumière u réticulum endoplasmique
--------	-------------	---

#### *C.1.2. Inflammation cutanée*

Outre les signes cliniques de la disruption cutanée, la DA est caractérisée par une activation caractéristique de l'immunité, partant de signaux exogènes pour produire une inflammation de type 2 atypique dans les phases les plus aiguës, et une inflammation de type 1 pendant les phases chroniques. Afin de mieux cerner la pathologie et pour proposer des options thérapeutiques adaptées, il est important de comprendre les signaux impliqués dans cette inflammation et toute la cascade de dérégulation immunologique.

##### *C.1.2.1. Cellules résidentes et alarmines*

Même si les mécanismes exacts sont encore mal connus, ils nécessitent l'action des composantes innées et adaptatives du système immunitaire. La première ligne de reconnaissance du système immunitaire se compose de cellules résidentes dans la couche de Malpighi de l'épiderme ; les cellules de Langerhans (LC), cellules dendritiques (DC) résidentes présentes dans l'épithélium et les muqueuses. Dans une peau saine, le rôle de ces cellules est de surveiller la pénétration de microbes dans l'organisme, le plus souvent suite à une blessure, et de transmettre l'information via des messagers solubles (alarmines) à travers tout

l'organisme. Cependant, dans la DA, l'intégrité de la peau étant diminuée, cela favorise l'activation de ces cellules. Comme l'ont montré Yoshida et al., les cellules résidentes sont plus nombreuses dans l'épiderme au niveau des sites lésionnels de patients atteints de DA et forment un réseau beaucoup plus important de dendrites, des élongations de cytoplasme leur permettant de couvrir plus de surface et de s'insérer entre les jonctions serrées formant la barrière épithéliale (Yoshida et al., 2014).

Ainsi la reconnaissance de différents signaux est potentialisée au niveau des sites lésionnels. En premier lieu, les LC sont capables de capturer différents antigènes viraux et bactériens par phagocytose, macropinocytose ou endocytose à récepteurs, pour les présenter sur le CMH de classe II (Reis and Austyn, 1993; Sparber et al., 2010). Une seconde voie de capture des antigènes est l'entrée directe dans le cytosol, lors d'une infection virale par exemple pour apprêter des peptides issus de la transcription du génome viral par les LC sur le CMH de classe I. Enfin, la présentation croisée, permet aux particules capturées de façon active par la cellule (phagocytose, macropinocytose, endocytose à récepteurs) d'être transférées sur des CMH de classe I pour potentiellement activer des lymphocytes T CD8 par des virus n'infectant pas les LC (Sallusto et al., 1995).

En plus du signal antigénique, les LC sont capables d'intégrer deux types de signaux, des signaux de danger (Danger Associated Molecular Pattern, DAMP) et des signaux associés aux pathogènes (Pathogen Associated Moléculaire Pattern, PAMP) orientant la réponse immunitaire vers l'inflammation ou la tolérance. Pour opérer ce choix, les LC possèdent plusieurs récepteurs regroupés sous la dénomination des Pattern Recognition Receptors (PRR) leur permettant d'intégrer le maximum d'informations dans leur environnement direct. Dans les LC, l'analyse de l'expression des différents Toll-Like Receptors (TLR), sous ensemble membranaire et intracellulaire des PRR, a montré que ces cellules exprimaient les TLR1, 2, 3, 6 et 9 (Flacher et al., 2006; Peiser et al., 2008). Les TLR1, 2 et 6 permettent la reconnaissance de différents types de lipopeptides : Le TLR1 permet de lier des lipopeptides diacyls tandis que le TLR6 est spécifique des lipopeptides triacyls. Le TLR2 a une spécificité plus large reconnaissant le peptidoglycane et l'acide lipotéichoïque des bactéries gram-positives, des lipoprotéines de certaines bactéries gram-négatives (*Mycoplasma fermentans*, *Treponema pallidum*, and *Borrelia burgdorferi*), mais aussi le lipoarabinomannane issus de mycobactéries,

le glycosylphosphatidylinositol, la forme soluble de la moduline, le zymosan et de nombreux autres glycolipides (Takeuchi et al., 2002, 2001). Le TLR3 est impliqué dans la reconnaissance d'ARN double brins, absents du règne animal et spécifiques à certains virus (Alexopoulou et al., 2001). Il est intéressant de noter que les LC ne possèdent pas tout l'éventail des TLRs (résumés dans le Tableau 7), et sont notamment incapables de reconnaître le LPS, composant majeur de la membrane des bactéries gram-négatives, via l'absence de TLR4 (Flacher et al., 2006).

Tableau 7 : TLRs et leurs ligands connus, D'après (Takeda and Akira, 2015)

TLR	Ligands
TLR1	Lipopeptides Triacylés
TLR2	Peptidoglycane Lipopeptides, acide lipotéichoïque, lipoarabinomannan, GPI anchors, phenol-soluble moduline, zymosan, glycolipides
TLR3	dsRNA
TLR4	LPS, Taxol, protéine de fusion RSV, protéine de l'enveloppe MMTV, ligands endogènes (HSPs, fibronectine, acide hyaluronique)
TLR5	Flagelline
TLR6	Lipopeptides Diacylés
TLR7	ssRNA, imidazoquinolines
TLR8	ssRNA, imidazoquinolines
TLR9	ADN CpG
TLR10	unknown
TLR11	Profiline, Flagelline
TLR12	Profiline
TLR13	ARN ribosomal 23S bactérien

L'engagement des TLR, et l'activation subséquente des LC a deux conséquences principales : tout d'abord, cela induit la production de cytokines, dont la composition varie selon le ligand détecté. En présence d'une stimulation TLR2/TLR6 par le peptidoglycane, les LC produisent de l'IL-10 *in vitro*, cytokine anti-inflammatoire, suggérant une fonction spécifique dans la tolérance aux bactéries commensales, gram-positives (Flacher et al., 2006). Outre ce cas spécifique, la stimulation des LC, induit la production de cytokines pro-inflammatoires (Flacher et al., 2006; Peiser et al., 2008) notamment de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ , mais aussi l'IL-8, cytokine chimioattractante qui favorise l'adhésion des granulocytes, monocytes, lymphocytes T, NK et macrophages sur les cellules endothéliales pour induire leur recrutement sur le site de production (Russo et al., 2014). En plus des TLRs, Bruynzeel-Koomen et al., ont détecté en

1986 la présence d'IgE à la surface des LC de patients DA (Bruynzeel-Koomen et al., 1986). La liaison des IgE sur leur récepteur FCεR1, fortement exprimé à la surface des LC de patients DA (Wollenberg et al., 1999) induit la production d'IL-8, de CCL2 et d'IL-16, 3 cytokines chimioattractantes (Reich et al., 2001). L'implication de chacun de ces signaux dans l'activation des LC au niveau des sites lésionnels reste encore mal compris.

#### C.1.2.2. Phase aigüe

A la suite de l'activation des LC, les signaux transmis par le TNFα favorisent leur migration en diminuant l'expression de l'E-cadherin, molécule participant à la formation et la structure des épithéliums, de CCR1 et de CCR5, deux récepteurs aux chémokines favorisant la migration (ou le maintien) dans les sites d'inflammation, et augmentant l'expression de CCR7, récepteur aux chimiokines favorisant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires. À la Suite de ces modifications, les LC quittent le site d'inflammation pour présenter les fragments d'antigènes qu'elles ont pu capter (Cumberbatch et al., 2000).

En présence de TNFα sur le site d'inflammation, les kératinocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires appelées alarmines telles que la Thymic Stromal Lymphopoïétine (TSLP), l'IL-25, l'IL-33 ou la Thymus and Activation Regulated Chemokine (TARC). Ces alarmines sont largement diffusées dans le microenvironnement (Humeau et al., 2022) et participent à l'activation des réponses de type Th2 qui favorisent l'immunité humorale. L'inflammation de type 2 est induite par différentes cellules : les lymphocytes T CD4+ Th2 qui produisent de fortes quantités de cytokines, les lymphocytes T CD4+ Th22, les ILC2 et les lymphocytes T CD8+ Tc2 (Langan et al., 2020). En réponses aux alarmines, dans la DA, ces cellules produisent principalement de l'IL-13, de l'IL-31 et de l'IL-5. Cette production cytokinique massive dans le microenvironnement lésionnel est à l'origine l'activation des cellules effectrices (Lymphocytes B, éosinophiles) et du prurit.

##### C.1.2.2.1. Recombinaison isotypique des IgE induit par l'IL-13 et le CD40

La recombinaison isotypique (CSR) est un processus qui se produit dans les lymphocytes B naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Avant la CSR, les Ig présentes sur les lymphocytes B possèdent une région constante M (Cμ) issue de la transcription du gène du BCR (régions V, D, J et Cμ). La CSR des IgE peut être initiée par le signal IL-13/JAK1/TYK2 qui induit la phosphorylation de STAT6 sur les lymphocytes B (Graber et al., 1998). En coopération

avec AP-1, induit par le CD40, STAT6 peut se fixer au promoteur de I $\epsilon$ , permettant la transcription de l'unité I $\epsilon$ /S $\epsilon$ /C $\epsilon$  (Geha et al., 2003; Hebenstreit et al., 2006).

La séquence ARN de S $\epsilon$  est riche en guanosines, ce qui augmente la probabilité d'hybridation avec leurs séquences complémentaires sur l'ADN. Cette hybridation conduit à la présence d'un fragment d'ADN simple brin (Roy et al., 2008; Yu et al., 2003). Les fragments d'ADN simples brins peuvent lier une cytidine désaminase inductible (AID), qui désamine les deoxycytidines (dC) en deoxyuridines (dU). Ces mutations peuvent mener à des cassures de l'ADN, à la fois dans la région S $\mu$  (précédant la région C $\mu$ ) et dans la région S $\epsilon$ .

La réparation de ces cassures de l'ADN peut entraîner l'excision du fragment situé entre ces deux régions, ce qui permet le rapprochement de la région C $\epsilon$  de la région VDJ induisant ainsi la CSR des IgE (Punnonen et al., 1993; Tong and Wesemann, 2015). Les IgE, ne sont pas présents chez tous les patients atteints de DA et contribuent à la réactivation du système immunitaire suite à une première inflammation.

L'IgE est une immunoglobuline principalement associée aux allergies permettant de faciliter la présentation des antigènes (IgE-FAP) aux lymphocytes T, diminuant fortement le seuil de détection des antigènes grâce à ce mécanisme (Villazala-Merino et al., 2020; Eckl-Dorna et al., 2019). Les IgE jouent aussi un rôle dans la dégranulation de cellules présentant le Fc $\epsilon$ R1 (Mastocytes, basophiles) et la libération d'histamine (Church and Hiroi, 1987; Nejad and MacGlashan Jr., 2018). Les IgE sont importantes dans l'immunité antiparasitaire. Dans certains cas, ces IgE peuvent être dirigés contre une substance allergène. Cependant ce mécanisme ne concerne qu'une partie des patients.

#### C.1.2.2.2. Induction du prurit par l'IL-31 et les alarmines

L'IL-31, principalement produite par les lymphocytes T et les cellules dendritiques immatures dans un contexte d'inflammation de type II au niveau des sites lésionnels agit sur son récepteur IL-31R (IL-31R $\alpha$  + OSMR $\beta$ ). Ce récepteur est notamment exprimé sur les neurones sensoriels et entraînant l'activation des voies JAK (JAK1/TYK2/STAT3) (Diveu et al., 2004). Cette activation permet l'envoi d'un signal associé à une sensation de démangeaison par le système nerveux central (Cevikbas et al., 2014; Ruzicka et al., 2017; Wilson et al., 2013; Yang

and Kim, 2019; Ständer et al., 2003). En addition du signal nerveux, l'IL-31 induit la production du peptide natriurétique cérébral (BNP) augmente la production de divers facteurs (CXCL10, IL17A, MMP9) favorisant l'inflammation et le recrutement cellulaire par les kératinocytes, qui vont en retour favoriser une nouvelle libération de médiateurs pruritogènes par les neurones sensitifs environnant (Meng et al., 2018). La nature chronique de la dermatite atopique entraîne également des altérations du système nerveux, notamment une hyperinnervation et une augmentation de l'expression des facteurs de croissance nerveuse, ce qui exacerbe encore la réponse pruritogène (Ikoma et al., 2006; Yoshioka et al., 2021).

#### C.1.2.2.3. Activation des éosinophiles par l'IL-5

l'IL-5 est une cytokine permettant l'activation des éosinophiles (Rothenberg and Hogan, 2006) et la DA est associée à une hyperéosinophilie (Čelakovská and Bukač, 2016). Cette activation des éosinophiles est caractérisée par leur dégranulation, avec l'augmentation du relargage de protéines de leurs granules (Major Basic Protein-1 et 2 (MBP-1, -2), Eosinophil Cationic Protein (ECP) et Eosinophils Derived Neurotoxin (EDN)) dans le sang et sur les sites lésionnels (Leiferman, 1994), ce qui suggère une activité cytotoxique au niveau de l'épithélium, ce qui contribuerait à sa fragilisation. Enfin, les éosinophiles produisent de l'IL-12 en réponse à une inflammation de type 2 permettant un switch vers une inflammation de type 1 (Grewe et al., 1998).

#### C.1.2.3. Phase chronique

Les lésions chroniques de la DA sont caractérisées par une inflammation de type Th1/Th17 et la surexpression des cytokines associées (IFN $\gamma$ , IL-17, IL-22) (Esaki et al., 2016) mais l'initiation de ces réponses et leur importance sont encore mal comprises (Gittler et al., 2012). Les différentes étapes de l'inflammation locale de la DA ainsi que les acteurs mis en jeu ont été résumés par (Langan et al., 2020) (Figure 2).

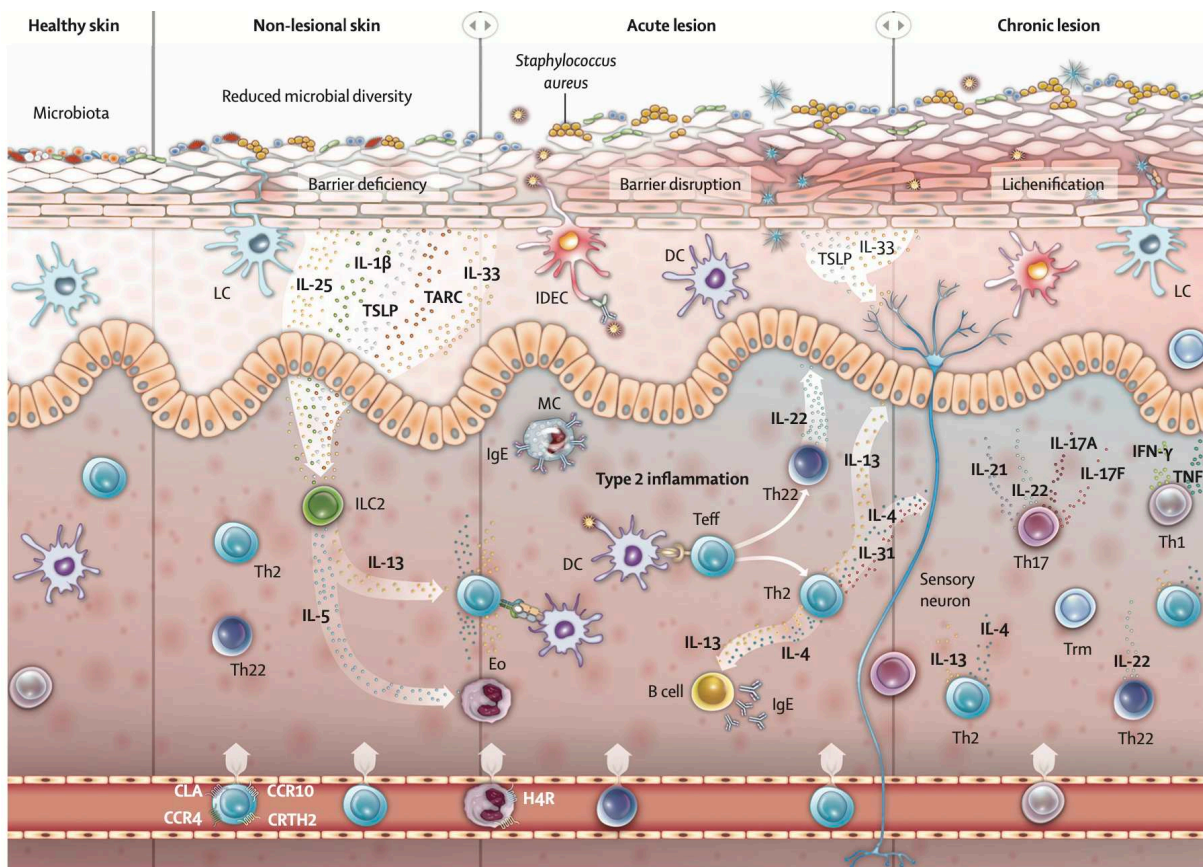


Figure 2 : Mécanismes et acteurs de l'inflammation dans la DA (tiré de Langan et al., 2020)

### C.1.3. Importance des différents acteurs de la réponse Th2 dans les phases aiguës de la DA

La DA est très largement caractérisée par une forte inflammation et par la production importante des interleukines 5, 13 et 31 (Esaki et al., 2016). En ceci, l'inflammation de la DA se différencie d'une inflammation de type 2 classique par une augmentation faible d'IL-4 (Tsoi et al., 2019). Cette spécificité soulève des questionnements sur l'origine de ces cytokines pro-inflammatoires. Il est souvent admis que les lymphocytes T CD4+ sont une population centrale dans le développement de la DA, sans action directe contre le pathogène, ils permettent cependant l'activation des cellules pathogéniques (lymphocytes B, Mastocytes, granulocytes) via une production cytokinique importante (Burstein and Abbas, 1991; Horowitz et al., 2010; Zhai et al., 2003). Cependant, différents arguments pointent le rôle d'autres populations que les lymphocytes T CD4+ : Les lymphocytes T CD8+ des sites lésionnels de patients atteints de DA modérée à sévère ont un profil de production cytokinique semblable à ce que l'on retrouve



dans le microenvironnement à savoir une production d'IL-13 en absence d'IL-4 là où ces deux cytokines sont produites en parallèle par les lymphocytes T CD4+ (Hijnen et al., 2013). De plus, les lymphocytes T CD8+ infiltrent le microenvironnement dans les heures qui suivent l'exposition aux allergènes présents dans les patchs de tests atopique (atopy patch test), alors que le recrutement de lymphocytes T CD4+ n'est visible qu'à 48h (Hennino et al., 2011). Une étude récente a utilisé le modèle murin pour évaluer le rôle des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans l'initiation de la DA. En bref, dans un modèle murin de DA induit par *Dermatophagoides farinae*, l'inhibition spécifique des lymphocytes T CD8+ par des anticorps bloquants (clone 53-6.72) permet de réduire significativement l'inflammation, mais pas l'inhibition des lymphocytes T CD4+ par des anticorps bloquants (clone GK1.5) (Mizutani, 2020). Les lymphocytes T CD8+ seraient donc important dans l'initiation de l'inflammation mais pas les lymphocytes T CD4. L'analyse en scRNAseq de biopsies de sites lésionnels montre qu'une plus grande proportion de lymphocytes T CD8 est engagée dans l'axe Tc2 que de lymphocytes T CD4+ sont engagés dans l'axe Th2 (Zhang et al., 2022). De plus, les lymphocytes T CD8+ mais pas les lymphocytes T CD4+ sont significativement plus activés dans les sites lésionnels que dans les sites non lésionnels et que dans la peau de volontaires sains (Zhang et al., 2022). En résumé, de nombreuses études pointent l'importance des lymphocytes T CD8+ dans l'induction des mécanismes effecteurs de la DA.

## C.2. Traitements actuels de la dermatite atopique

Il n'y a actuellement aucun traitement curatif à la DA et Les thérapies actuelles visent à contrôler l'avancée de la pathologie sur le long terme. Ces traitements sont principalement à visée immunosuppressive, et dans l'optique de l'amélioration de la qualité de vie du patient, doivent minimiser à la fois les symptômes de la DA et les effets secondaires liés à l'immunosuppression ou à la toxicité.

### C.2.1. Local vs systémique

Pour traiter la DA, les traitements peuvent être administrés soit en systémique, par voie orale ou par injection intraveineuse, soit de manière locale, par injection intradermique ou application de pommades diffusant à travers l'épiderme. L'administration locale permet de ne cibler que les sites lésionnels inflammés, et ainsi de réduire le risque d'infections opportunistes. Ils permettent aussi généralement de réduire la dose administrée, diminuant ainsi une potentielle toxicité. Au contraire, l'administration systémique est plus lourde pour

le patient, cependant cela permet de cibler toutes les niches dans lesquelles se trouvent les cellules immunitaires, dont les OLII, qui ne sont pas ciblés par les traitements locaux.

### *C.2.2. Dermocorticoïdes et inhibiteurs de la calcineurine*

En France, les traitements de la DA font souvent appel à des pommades contenant des corticoïdes. Le choix du corticoïde d'activité forte (classe 1) ou faible (classe 4) dépend de la sévérité de la pathologie. L'utilisation de dermocorticoïdes d'activité forte sur une durée prolongée peut fragiliser la peau, ils ne sont donc pas recommandés sur de longues durées et leur utilisation est limitée à des cures intermittentes (Weidinger et al., 2017).

En cas d'échecs des corticoïdes, le médecin peut proposer un traitement immunosuppresseur principalement à base de tacrolimus ou de ciclosporine. Il peut aussi être utilisé comme traitement d'entretien en cas de phases aiguës fréquentes, lorsque les corticoïdes ne sont pas conseillés (Eichenfield et al., 2014; Wollenberg et al., 2018). Si la combinaison successive de ces deux traitements obtient une bonne efficacité pour la majorité, une fraction non négligeable des patients est en échec de traitement, (pas ou perte d'efficacité), non tolérant (effets secondaires importants) ou en contre-indication (âge, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, allaitement). Il a donc fallu étendre la gamme de thérapies, ce qui a poussé au développement des biothérapies et des inhibiteurs de JAK.

### *C.2.3. Signaux cytokiniques*

#### *C.2.3.1. Biothérapies*

Bien que de nombreuses voies de signalisation soient impliquées dans la DA, la forte activation des cytokines responsables des réponses Th2, et notamment l'IL-13 sont le mécanisme central. Cibler spécifiquement cette signalisation est donc un choix thérapeutique. Le Dupilumab, anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'IL-4 permet de bloquer les deux signalisations IL-4 et IL-13 qui se partagent cette chaîne de récepteur. Dans deux essais de phase 3, 51.3% et 44.2% des patients qui ont reçu ce traitement ont vu une réduction de leurs symptômes après 16 semaines (réduction de 75% du score EASI réalisé avant traitement, EASI75) comparé à 14.7% et 25% dans les groupes témoins (Simpson et al., 2016). De plus, le Dupilumab a aussi montré une efficacité comparable pour des patients non répondants à la ciclosporine (Ariëns et al., 2020). Dans ces essais cliniques, les effets

secondaires du Dupilumab sont faibles, principalement associés à des problèmes oculaires, conjonctivites. A l'heure actuelle, le Dupilumab est le seul anticorps monoclonal ayant reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe (2018).

#### C.2.3.2. JAKi

Puisque l'IL-13 n'est pas la seule cytokine impliquée dans la DA, et que nombre d'entre elles sont dépendantes des voies JAK, les inhibiteurs de JAK sont intéressants pour compléter l'éventail thérapeutique de la DA, notamment pour les molécules ayant une valence JAK1 et / ou JAK3, permettant de cibler l'IL-13 (Malabarba et al., 1996). 3 inhibiteurs de JAK ont obtenu une AMM en Europe dans la DA.

##### C.2.3.2.1. Olumiant – Baricitinib

Le baricitinib est une molécule de 371.4Da de valence JAK1/JAK2 (JAK1 IC<sub>50</sub> = 5.9nM ; JAK2 IC<sub>50</sub> = 5.7nM ; TYK2 IC<sub>50</sub> = 53nM ; JAK3 IC<sub>50</sub> > 400nM) (Nezamololama et al., 2020) avec des IC<sub>50</sub> de 30 à 60nM sur les voies JAK1/JAK3 dépendantes (IL-2, IL-4, IL-15, IL-21) sur les lymphocytes T et JAK2 dépendantes (IL-3, G-CSF, GM-CSF) sur les monocytes (McInnes et al., 2019). Dans deux essais de phase 3, la prise quotidienne de 4g de Baricitinib a un effet bénéfique (EASI75 pour 24.8% et 21.1% des patients contre 8.8% et 4.4% dans les groupes contrôle respectifs ayant reçu un placebo). Cet effet bénéfique est dose dépendant, avec une EASI75 de 18.7% et 17.9% dans les groupes de patients ayant reçu une dose de 2mg de Baricitinib (Simpson et al., 2020). Les effets secondaires sont semblables avec ce qui a été montré en rhumatologie à savoir principalement des infections des voies respiratoires, mais aussi des infections oculaires, des infections par l'herpès virus ou par le zona, des éruptions cutanées. Quelques cas d'évènements thromboemboliques veineux et un cas de thrombose artérielle ont été rapportés durant les essais cliniques. La Haute Autorité de Santé (HAS) catégorise le service médical rendu (SMR) par le Baricitinib faible dû à une efficacité légèrement plus faible que le Dupilumab lors des essais cliniques de phase 3, sans toutefois qu'ils aient été comparés directement et recommande l'utilisation pour les adultes atteints de DA modérée à sévère en cas d'échec, d'intolérance ou de contre-indication à la ciclosporine. Il entre donc dans la même catégorie que le Dupilumab afin de pouvoir changer de traitements afin d'éviter des phénomènes de résistance et des rechutes.

#### C.2.3.2.2. Cibinqo – Abrocitinib

L'Abrocitinib est une molécule de 323.42g/mol de valence spécifique JAK1 (JAK1 IC<sub>50</sub> = 29nM ; JAK2 IC<sub>50</sub> = 803nM ; TYK2 IC<sub>50</sub> = 1250nM ; JAK3 IC<sub>50</sub> > 10µM) (Nezamololama et al., 2020). Dans un essai de phase 3 comparant l'Abrocitinib (200mg/jour et 100mg/jour au Dupilumab (dose initiale de 600mg, puis 300mg/semaine) et à un placebo, la dose de 200mg/jour d'Abrocitinib a montré une supériorité sur le placebo et le Dupilumab (EASI75 = 70.3% comparé à 58.1% pour le Dupilumab et 27.1% pour le placebo à 12 semaines) avec une amélioration significativement supérieure aux autres groupes sur le prurit dès deux semaines de traitement. Les effets secondaires les plus cités associées à l'Abrocitinib sont des nausées (11%) et de l'acné (6%) ainsi qu'une cytopénie, toutefois, il faut aussi noter de plus rares cas de cancers cutanés, des signes cardio-vasculaires et thrombo-emboliques (Bieber et al., 2021). Le SMR retenu par la HAS est important dans le traitement de la DA modérée à sévère de l'adulte en cas d'échec, d'intolérance ou de contre-indication à la ciclosporine avec une amélioration du service médical rendu (ASMR) mineure par rapport au Dupilumab malgré un profil de tolérance moins favorable que celui du Dupilumab. Le suivi de paramètres hématologiques en parallèle du traitement est donc recommandé pour l'Abrocitinib.

#### C.2.3.2.3. Rinvoq - Upadacitinib

L'Upadacitinib (380.375g/mol), est aussi un inhibiteur de valence JAK1 spécifique JAK1 IC<sub>50</sub> = 45nM ; JAK2 IC<sub>50</sub> = 109nM ; TYK2 IC<sub>50</sub> = 4700nM ; JAK3 IC<sub>50</sub> > 2100nM) (Nezamololama et al., 2020). Lors de l'essai de phase 3 comparant l'efficacité de 30mg/jour d'Upadacitinib à une prise initiale de 600mg, puis 300mg/semaine de Dupilumab, 71% des patients sous Upadacitinib avaient obtenu une réduction de 75% des symptômes après 16 semaines de traitement contre seulement 61% des patients sous Dupilumab (Blauvelt et al., 2021). De façon intéressante, cette étude est la seule à rapporter une diminution de 100% des symptômes (EASI100) pour 27.9% des patients traités avec l'Upadacitinib (vs 7.6% des patients traités avec le Dupilumab). Cependant, cette étude rapporte aussi que les patients sous anti-JAK développent plus d'infections sérieuses (1.1%), herpès (2%) et anémie (2%) (Blauvelt et al., 2021). Comme pour les autres anti-JAK, l'avis de la HAS retient un SMR important et un ASMR V dans la stratégie incluant le Dupilumab chez l'adulte en cas d'échec, d'intolérance ou de contre-indication à la ciclosporine.

#### C.2.3.2.4. Contre-indications des anti-JAK

En raison de l'expérience encore limitée de ces médicaments, les données relatives à leur sécurité, en particulier pendant la grossesse, sont rares. D'une manière générale, les inhibiteurs de JAK ont peu d'effets secondaires, qui se caractérisent principalement par une sensibilité accrue aux infections due à leur action immunosuppressive et à l'effet de l'inhibition de JAK2 dans les signalisations de l'érythropoïétine et de la thrombopoïétine, dont l'inhibition sur le long terme induit anémie et thrombocytopenie (Verstovsek et al., 2017a; b, 2012).

Dans les études de reproduction animale, des effets foétocides et tératogènes ont été observés lorsque des rates et des lapines enceintes ont reçu du Tofacitinib pendant la période d'organogenèse à des expositions multiples de respectivement 73 fois et 6,3 fois la dose maximale recommandée de 10 mg deux fois par jour, (Pfizer Inc. Xeljanz Full Prescribing Information 2019 <https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=959#data>). A cause de ce risque, les protocoles d'essais randomisés contrôlés excluent les patientes enceintes et la HAS recommande l'utilisation d'une contraception hautement efficace pour les femmes en âge de procréer pendant le traitement par n'importe quel anti-JAK et jusqu'à quatre mois après la dernière prise. La dermatite atopique est une pathologie qui se déclare chez l'enfant, et il est nécessaire d'avoir des solutions thérapeutiques systémiques chez l'enfant et l'adolescent puisque la ciclosporine n'est pas recommandée avant 16 ans. Cependant, les voies JAK participent au développement et à l'homéostasie osseuse, notamment via les membres de la famille de l'IL-6, et cette fonction est altérée par les anti-JAK (Murakami et al., 2017; O'Brien et al., 1999). Pour ces raisons, les anti-JAK ne sont pas proposés aux enfants de moins de 12 ans et uniquement après échec du Dupilumab entre 12 et 18 ans.

#### D. Objectifs du travail de thèse

Il n'y a actuellement aucun de traitement curateur de la DA. Il existe de nombreux enjeux au développement de nouvelles molécules immunosuppressives efficaces dans le traitement de la DA parmi lesquels on compte (1) la perte d'efficacité des traitements sur le long terme et la nécessité d'alterner différentes thérapies, (2) le besoin de solutions adaptées à chaque catégorie de la population, du jeune enfant à l'adulte et bien sûr, (3) un intérêt économique dans le développement d'un médicament pertinent dans la prise en charge d'une pathologie

fréquente chez l'Homme, mais aussi chez l'animal de compagnie, avec une prévalence similaire (Gedon and Mueller, 2018; Outerbridge and Jordan, 2021).

L'objectif premier de ce travail de thèse en collaboration avec notre partenaire CIFRE CEVA, est le développement de molécules permettant l'inhibition des voies cytokiniques impliquées dans la dermatite atopique et notamment l'IL-13 et l'IL-31 dépendantes de JAK1. La seconde partie de ce travail de thèse s'est concentrée sur le développement de méthodes pour apprécier les conséquences de l'utilisation des inhibiteurs de JAK dans la DA sur le phénotype et la fonction des cellules immunitaires périphériques.

## Références

- Abuabara, K., O. Hoffstad, A.B. Troxel, J.M. Gelfand, C.E. McCulloch, and D.J. Margolis. 2018a. Patterns and predictors of atopic dermatitis disease control past childhood: An observational cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 141:778-780.e6. doi:10.1016/j.jaci.2017.05.031.
- Abuabara, K., A.M. Yu, J.-P. Okhovat, I.E. Allen, and S.M. Langan. 2018b. The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Allergy*. 73:696–704. doi:10.1111/all.13320.
- Akdis, M., A. Aab, C. Altunbulakli, K. Azkur, R.A. Costa, R. Cramer, S. Duan, T. Eiwegger, A. Eljaszewicz, R. Ferstl, R. Frei, M. Garbani, A. Globinska, L. Hess, C. Huitema, T. Kubo, Z. Komlosi, P. Konieczna, N. Kovacs, U.C. Kucuksezer, N. Meyer, H. Morita, J. Olzhausen, L. O'Mahony, M. Pezer, M. Prati, A. Rebane, C. Rhyner, A. Rinaldi, M. Sokolowska, B. Stanic, K. Sugita, A. Treis, W. van de Veen, K. Wanke, M. Wawrzyniak, P. Wawrzyniak, O.F. Wirz, J.S. Zakzuk, and C.A. Akdis. 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 138:984–1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732–738. doi:10.1038/35099560.
- Alvarez, J.V., and D.A. Frank. 2004. Genome-wide analysis of STAT target genes: Elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biology & Therapy*. 3:1045–1050. doi:10.4161/cbt.3.11.1172.
- Alves de Medeiros, A.K., R. Speeckaert, E. Desmet, M. Van Gele, S. De Schepper, and J. Lambert. 2016. JAK3 as an Emerging Target for Topical Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *PLoS One*. 11. doi:10.1371/journal.pone.0164080.
- Ariëns, L.F.M., J. Schaft, D.S. Bakker, D. Balak, M.L.E. Romeijn, T. Kouwenhoven, M. Kamsteeg, B. Giovannone, J. Drylewicz, C.C.A. Amerongen, E.M. Delemarre, E.F. Knol, F. Wijk, S. Nierkens, J.L. Thijs, M.L.A. Schuttelaar, and M.S. Bruin-Weller. 2020. Dupilumab is very effective in a large cohort of difficult-to-treat adult atopic dermatitis patients: First clinical and biomarker results from the BioDay registry. *Allergy*. 75:116–126. doi:10.1111/all.14080.
- Barnetson, R.S., and T.G. Merrett. 1983. Food allergy and atopic eczema. *proceedings of the Nutrition Society*. 42:247–256.
- Betz, A., N. Lampen, S. Martinek, M.W. Young, and J.E. Darnell. 2001. A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates *stat92E*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:9563–9568. doi:10.1073/pnas.171302098.
- Bever, H.P., M. Docx, and W.J. Stevens. 1989. Food and food additives in severe atopic dermatitis. *Allergy*. 44:588–594. doi:10.1111/j.1398-9995.1989.tb04205.x.
- Bieber, T., E.L. Simpson, J.I. Silverberg, D. Thaçi, C. Paul, A.E. Pink, Y. Kataoka, C.-Y. Chu, M. DiBonaventura, R. Rojo, J. Antinew, I. Ionita, R. Sinclair, S. Forman, J. Zdybski, P. Biswas, B. Malhotra, F. Zhang, and H. Valdez. 2021. Abrocitinib versus Placebo or Dupilumab for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 384:1101–1112. doi:10.1056/NEJMoa2019380.
- Bjerre, R.D., J.B. Holm, A. Palleja, J. Sølberg, L. Skov, and J.D. Johansen. 2021. Skin dysbiosis in the

- microbiome in atopic dermatitis is site-specific and involves bacteria, fungus and virus. *BMC Microbiol.* 21:256. doi:10.1186/s12866-021-02302-2.
- Blauvelt, A., H.D. Teixeira, E.L. Simpson, A. Costanzo, M. De Bruin-Weller, S. Barbarot, V.H. Prajapati, P. Lio, X. Hu, T. Wu, J. Liu, B. Ladizinski, A.D. Chu, and K. Eyerich. 2021. Efficacy and Safety of Upadacitinib vs Dupilumab in Adults With Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 157:1047. doi:10.1001/jamadermatol.2021.3023.
- Böhmer, F.-D., and K. Friedrich. 2014. Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *JAK-STAT.* 3:e28087. doi:10.4161/jkst.28087.
- Bos, J.D., and M.M.H.M. Meinardi. 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs: The 500 Dalton rule for skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology.* 9:165–169. doi:10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x.
- Brenninkmeijer, E.E.A., M.E. Schram, M.M.G. Leeflang, J.D. Bos, and Ph.I. Spuls. 2008. Diagnostic criteria for atopic dermatitis: a systematic review. *Br J Dermatol.* 158:754–765. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08412.x.
- Bruynzeel-Koomen, C., D.F. van Wichen, J. Toonstra, L. Berrens, and P.L.B. Bruynzeel. 1986. The presence of IgE molecules on epidermal langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 278:199–205. doi:10.1007/BF00412924.
- Burstein, H.J., and A.K. Abbas. 1991. T-cell-mediated activation of B cells. *Current Opinion in Immunology.* 3:345–349. doi:10.1016/0952-7915(91)90036-Z.
- Čelakovská, J., and J. Bukač. 2016. Eosinophils in patients suffering from atopic dermatitis and the relation to the occurrence of food allergy and other atopic diseases. *Food and Agricultural Immunology.* 27:700–710. doi:10.1080/09540105.2016.1148669.
- Cevikbas, F., X. Wang, T. Akiyama, C. Kempkes, T. Savinko, A. Antal, G. Kukova, T. Buhl, A. Ikoma, J. Buddenkotte, V. Soumelis, M. Feld, H. Alenius, S.R. Dillon, E. Carstens, B. Homey, A. Basbaum, and M. Steinhoff. 2014. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 133:448-460.e7. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.048.
- Changelian, P.S., M.E. Flanagan, D.J. Ball, C.R. Kent, K.S. Magnuson, W.H. Martin, B.J. Rizzuti, P.S. Sawyer, B.D. Perry, W.H. Brissette, S.P. McCurdy, E.M. Kudlacz, M.J. Conklyn, E.A. Elliott, E.R. Koslov, M.B. Fisher, T.J. Strelevitz, K. Yoon, D.A. Whipple, J. Sun, M.J. Munchhof, J.L. Doty, J.M. Casavant, T.A. Blumenkopf, M. Hines, M.F. Brown, B.M. Lillie, C. Subramanyam, C. Shang-Poa, A.J. Milici, G.E. Beckius, J.D. Moyer, C. Su, T.G. Woodworth, A.S. Gaweco, C.R. Beals, B.H. Littman, D.A. Fisher, J.F. Smith, P. Zagouras, H.A. Magna, M.J. Saltarelli, K.S. Johnson, L.F. Nelms, D. Finco-Kent, D.L. Baker, M. Larson, M.-S. Si, R. Paniagua, J. Higgins, B. Holm, B. Reitz, Y.-J. Zhou, R.E. Morris, J.J. O’Shea, and D.C. Borie. 2003. Prevention of Organ Allograft Rejection by a Specific Janus Kinase 3 Inhibitor. 302:5.
- Chen, M., A. Cheng, Y.-Q. Chen, A. Hymel, E.P. Hanson, L. Kimmel, Y. Minami, T. Taniguchi, P.S. Changelian, and J.J. O’Shea. 1997. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common  $\gamma$  chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6910–6915. doi:10.1073/pnas.94.13.6910.
- Chopra, R., P.P. Vakharia, R. Sacotte, N. Patel, S. Immaneni, T. White, R. Kantor, D.Y. Hsu, and J.I. Silverberg. 2017. Severity strata for Eczema Area and Severity Index ( EASI ), modified EASI ,



- Scoring Atopic Dermatitis ( SCORAD ), objective SCORAD , Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 177:1316–1321. doi:10.1111/bjd.15641.
- Church, M.K., and J. Hiroi. 1987. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. *British Journal of Pharmacology.* 90:421–429. doi:10.1111/j.1476-5381.1987.tb08972.x.
- Croker, B.A., H. Kiu, and S.E. Nicholson. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 19:414–422. doi:10.1016/j.semcd.2008.07.010.
- Cumberbatch, M., R.J. Dearman, C.E.M. Griffiths, and I. Kimber. 2000. Langerhans cell migration: Experimental dermatology • Review article. *Clinical and Experimental Dermatology.* 25:413–418. doi:10.1046/j.1365-2230.2000.00678.x.
- Deuse, T., J.B. Velotta, G. Hoyt, J.A. Govaert, V. Taylor, E. Masuda, E. Herlaar, G. Park, D. Carroll, M.P. Pelletier, R.C. Robbins, and S. Schrepfer. 2008. Novel Immunosuppression: R348, a JAK3- and Syk-Inhibitor Attenuates Acute Cardiac Allograft Rejection: *Transplantation.* 85:885–892. doi:10.1097/TP.0b013e318166acc4.
- Diveu, C., A.-H.L. Lak-Hal, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Barbier, J. Hermann, H. Gascan, and S. Chevalier. 2004. Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling. *European Cytokine Network.* 15:291–302.
- Dixit, A., L. Yi, R. Gowthaman, A. Torkamani, N.J. Schork, and G.M. Verkhivker. 2009. Sequence and Structure Signatures of Cancer Mutation Hotspots in Protein Kinases. *PLoS ONE.* 4:e7485. doi:10.1371/journal.pone.0007485.
- Eckl-Dorna, J., S. Villazala-Merino, N.J. Campion, M. Byazrova, A. Filatov, D. Kudlay, A. Karsonova, K. Riabova, M. Khaitov, A. Karaulov, V. Niederberger-Leppin, and R. Valenta. 2019. Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. *Cells.* 8:994. doi:10.3390/cells8090994.
- Eichenfield, L.F., W.L. Tom, T.G. Berger, A. Krol, A.S. Paller, K. Schwarzenberger, J.N. Bergman, S.L. Chamlin, D.E. Cohen, K.D. Cooper, K.M. Cordoro, D.M. Davis, S.R. Feldman, J.M. Hanifin, D.J. Margolis, R.A. Silverman, E.L. Simpson, H.C. Williams, C.A. Elmetts, J. Block, C.G. Harrod, W.S. Begolka, and R. Sidbury. 2014. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 71:116–132. doi:10.1016/j.jaad.2014.03.023.
- Esaki, H., P.M. Brunner, Y. Renert-Yuval, T. Czarnowicki, T. Huynh, G. Tran, S. Lyon, G. Rodriguez, S. Immaneni, D.B. Johnson, B. Bauer, J. Fuentes-Duculan, X. Zheng, X. Peng, Y.D. Estrada, H. Xu, C. de Guzman Strong, M. Suárez-Fariñas, J.G. Krueger, A.S. Paller, and E. Guttman-Yassky. 2016. Early-onset pediatric atopic dermatitis is T H 2 but also T H 17 polarized in skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 138:1639–1651. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.013.
- Flacher, V., M. Bouschbacher, E. Verronèse, C. Massacrier, V. Sisirak, O. Berthier-Vergnes, B. de Saint-Vis, C. Caux, C. Dezutter-Dambuyant, S. Lebecque, and J. Valladeau. 2006. Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and Gram-Positive Bacteria. *The Journal of Immunology.* 177:7959–7967. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7959.
- Frank, S.J., G. Gilliland, A.S. Kraft, and C.S. Arnold. 1994. Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase.

- Frank, S.J., W. Yi, Y. Zhao, J.F. Goldsmith, G. Gilliland, J. Jiang, I. Sakai, and A.S. Kraft. 1995. Regions of the JAK2 Tyrosine Kinase Required for Coupling to the Growth Hormone Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 270:14776–14785. doi:10.1074/jbc.270.24.14776.
- Furqan, M., A. Akinleye, N. Mukhi, V. Mittal, Y. Chen, and D. Liu. 2013. STAT inhibitors for cancer therapy.
- Gauzzi, M.C., L. Velazquez, R. McKendry, K.E. Mogensen, M. Fellous, and S. Pellegrini. 1996. Interferon- $\alpha$ -dependent Activation of Tyk2 Requires Phosphorylation of Positive Regulatory Tyrosines by Another Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 271:20494–20500. doi:10.1074/jbc.271.34.20494.
- Gedon, N.K.Y., and R.S. Mueller. 2018. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clin Transl Allergy*. 8:41. doi:10.1186/s13601-018-0228-5.
- Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 3:721–732. doi:10.1038/nri1181.
- Ghoreschi, K., M.I. Jesson, X. Li, J.L. Lee, S. Ghosh, J.W. Alsup, J.D. Warner, M. Tanaka, S.M. Steward-Tharp, M. Gadina, C.J. Thomas, J.C. Minnerly, C.E. Storer, T.P. LaBranche, Z.A. Radi, M.E. Dowty, R.D. Head, D.M. Meyer, N. Kishore, and J.J. O’Shea. 2011. Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550). *J. Immunol*. 186:4234–4243. doi:10.4049/jimmunol.1003668.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, and J.J. O’Shea. 2009. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 228:273–287. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.
- Gillinder, K.R., H. Tuckey, C.C. Bell, G.W. Magor, S. Huang, M.D. Ilsley, and A.C. Perkins. 2017. Direct targets of pSTAT5 signalling in erythropoiesis. *PLOS ONE*. 12. doi:10.1371/journal.pone.0180922.
- Gittler, J.K., A. Shemer, M. Suárez-Fariñas, J. Fuentes-Duculan, K.J. Gulewicz, C.Q.F. Wang, H. Mitsui, I. Cardinale, C. de Guzman Strong, J.G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2012. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 130:1344–1354. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.012.
- Graber, P., D. Gretener, S. Herren, J.-P. Aubry, G. Elson, J. Poudrier, S. Lecoanet-Henchoz, S. Alouani, C. Losberger, J.-Y. Bonnefoy, M.H. Kosco-Vilbois, and J.-F. Gauchat. 1998. The distribution of IL-13 receptor  $\alpha$ 1 expression on B cells, T cells and monocytes and its regulation by IL-13 and IL-4. *Eur. J. Immunol*. 28:4286–4298. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<4286::AID-IMMU4286>3.0.CO;2-H.
- Grewe, M., W. Czech, A. Morita, T. Werfel, M. Klammer, A. Kapp, T. Ruzicka, E. Schöpf, and J. Krutmann. 1998. Human Eosinophils Produce Biologically Active IL-12: Implications for Control of T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 161:415–420. doi:10.4049/jimmunol.161.1.415.
- Hanrs, S.K., and T. Hunter. 1995. (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal*. 9:576–596. doi:10.1096/fasebj.9.8.7768349.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejshoeck, and A. Duschl. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 17:173–188. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.01.004.

- Hennino, A., C. Jean-Decoster, F. Giordano-Labadie, S. Debeer, B. Vanbervliet, A. Rozières, A.-M. Schmitt, and J.-F. Nicolas. 2011. CD8+ T cells are recruited early to allergen exposure sites in atopy patch test reactions in human atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127:1064–1067. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.022.
- Hijnen, D., E.F. Knol, Y.Y. Gent, B. Giovannone, S. Beijin, T.S. Kupper, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, and R.A. Clark. 2013. CD8+ T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*. 133. doi:10.1038/jid.2012.456.
- Hofmann, S.R., A.Q. Lam, S. Frank, Y.-J. Zhou, H.L. Ramos, Y. Kanno, D. Agnello, R.J. Youle, and J.J. O’Shea. 2004. Jak3-Independent Trafficking of the Common  $\gamma$  Chain Receptor Subunit: Chaperone Function of Jaks Revisited. *Mol Cell Biol*. 24:5039–5049. doi:10.1128/MCB.24.11.5039-5049.2004.
- Horowitz, A., R.H. Behrens, L. Okell, A.R. Fooks, and E.M. Riley. 2010. NK Cells as Effectors of Acquired Immune Responses: Effector CD4+ T Cell-Dependent Activation of NK Cells Following Vaccination. *The Journal of Immunology*. 185:2808–2818. doi:10.4049/jimmunol.1000844.
- Hubbard, S.R., L. Weit, L. Ellist, and W.A. Hendrickson. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. 372.
- Humeau, M., K. Boniface, and C. Bodet. 2022. Cytokine-Mediated Crosstalk Between Keratinocytes and T Cells in Atopic Dermatitis. *Front. Immunol*. 13:801579. doi:10.3389/fimmu.2022.801579.
- Ikoma, A., M. Steinhoff, S. Ständer, G. Yosipovitch, and M. Schmelz. 2006. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci*. 7:535–547. doi:10.1038/nrn1950.
- Irvine, A.D., W.H.I. McLean, and D.Y.M. Leung. 2011. Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *N Engl J Med*. 365:1315–1327. doi:10.1056/NEJMra1011040.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY BIOLOGICAL SCIENCES*. 147. doi:10.1098/rspb.1957.0048.
- John, S., C.M. Robbins, and W.J. Leonard. 1996. a chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *The EMBO Journal*. 15:5627–5635.
- Kim, B.E., J. Kim, E. Goleva, E. Berdyshev, J. Lee, K.A. Vang, U.H. Lee, S. Han, S. Leung, C.F. Hall, N.-R. Kim, I. Bronova, E.J. Lee, H.-R. Yang, D.Y.M. Leung, and K. Ahn. 2021. Particulate matter causes skin barrier dysfunction. *JCI Insight*. 6:e145185. doi:10.1172/jci.insight.145185.
- Koh, B.H., S.S. Hwang, J.Y. Kim, W. Lee, M.-J. Kang, C.G. Lee, J.-W. Park, R.A. Flavell, and G.R. Lee. 2010. Th2 LCR is essential for regulation of Th2 cytokine genes and for pathogenesis of allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:10614–10619. doi:10.1073/pnas.1005383107.
- Kohlhuber, F., N.C. Rogers, D. Watling, J. Feng, D. Guschin, J. Briscoe, B.A. Witthuhn, S.V. Kotenko, S. Pestka, G.R. Stark, J.N. Ihle, and I.M. Kerr. 1997. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol Cell Biol*. 17:695–706. doi:10.1128/MCB.17.2.695.
- Lai, Y., and C. Dong. 2016. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. *International Immunology*. 28:181–188. doi:10.1093/intimm/dxv063.
- Langan, S.M., A.D. Irvine, and S. Weidinger. 2020. Atopic dermatitis. *The Lancet*. 396:345–360.

doi:10.1016/S0140-6736(20)31286-1.

- Leavy, O. 2010. Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nat Rev Immunol.* 10:297–297. doi:10.1038/nri2763.
- Leiferman, K.M. 1994. Eosinophils in atopic dermatitis.
- Leonard, W.J., and J.J. O’Shea. 1998. JAKS AND STATS: Biological Implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16:293–322. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.293.
- Liang, Y.-B., H. Tang, Z.-B. Chen, L.-J. Zeng, J.-G. Wu, W. Yang, Z.-Y. Li, and Z.-F. Ma. 2017. Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type. *Molecular Medicine Reports.* 16:6405–6411. doi:10.3892/mmr.2017.7384.
- Linossi, E.M., and S.E. Nicholson. 2015. Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev.* 266:123–133. doi:10.1111/imr.12305.
- Macchi, P., A. Villa, S. Giliani, M.G. Sacco, A. Frattini, F. Porta, A.G. Ugazio, J.A. Johnston, F. Candotti, J.J. O’Shea, P. Vezzoni, and L.D. Notarangelo. 1995. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature.* 377:65–68. doi:10.1038/377065a0.
- Malabarba, M.G., H. Rui, H.H.J. Deutsch, J. Chung, F.S. Kalthoff, W.L. Farrar, and R.A. Kirken. 1996. Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing interleukin-2 receptor- $\gamma$  and interleukin-4 receptor- $\alpha$ . *Biochemical Journal.* 319:865–872. doi:10.1042/bj3190865.
- Matsuda, T., J. Feng, B.A. Witthuhn, Y. Sekine, and J.N. Ihle. 2004. Determination of the transphosphorylation sites of Jak2 kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 325:586–594. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.071.
- McInnes, I.B., N.L. Byers, R.E. Higgs, J. Lee, W.L. Macias, S. Na, R.A. Ortmann, G. Rocha, T.P. Rooney, T. Wehrman, X. Zhang, S.H. Zuckerman, and P.C. Taylor. 2019. Comparison of baricitinib, upadacitinib, and tofacitinib mediated regulation of cytokine signaling in human leukocyte subpopulations. *Arthritis Res Ther.* 21. doi:10.1186/s13075-019-1964-1.
- McLornan, D.P., J.E. Pope, J. Gotlib, and C.N. Harrison. 2021. Current and future status of JAK inhibitors. *The Lancet.* 398:803–816. doi:10.1016/S0140-6736(21)00438-4.
- Meng, J., M. Moriyama, M. Feld, J. Buddenkotte, T. Buhl, A. Szöllösi, J. Zhang, P. Miller, A. Ghetti, M. Fischer, P.W. Reeh, C. Shan, J. Wang, and M. Steinhoff. 2018. New mechanism underlying IL-31-induced atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 141:1677-1689.e8. doi:10.1016/j.jaci.2017.12.1002.
- Meylan, P., C. Lang, S. Mermoud, A. Johannsen, S. Norrenberg, D. Hohl, Y. Vial, G. Prod’hom, G. Greub, M. Kypriotou, and S. Christen-Zaech. 2017. Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy. *Journal of Investigative Dermatology.* 137:2497–2504. doi:10.1016/j.jid.2017.07.834.
- Mizutani, N. 2020. CD8+ T cells regulated by CD4+CD25+ regulatory T cells in the early stage exacerbate the development of *Dermatophagoides farinae*-induced skin lesions via increasing mast cell

infiltration in mice. *European Journal of Pharmacology*. 8.

- Moodley, D., H. Yoshida, S. Mostafavi, N. Asinovski, A. Ortiz-Lopez, P. Symanowicz, J.-B. Telliez, M. Hegen, J.D. Clark, D. Mathis, and C. Benoist. 2016. Network pharmacology of JAK inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:9852–9857. doi:10.1073/pnas.1610253113.
- Morren, M.-A., B. Przybilla, M. Bamelis, B. Heykants, A. Reynaers, and H. Degreef. 1994. Atopic dermatitis: Triggering factors. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 31:467–473. doi:10.1016/S0190-9622(94)70213-6.
- Murakami, K., Y. Kobayashi, S. Uehara, T. Suzuki, M. Koide, T. Yamashita, M. Nakamura, N. Takahashi, H. Kato, N. Udagawa, and Y. Nakamura. 2017. A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro. *PLoS ONE*. 12:e0181126. doi:10.1371/journal.pone.0181126.
- Murota, H., K. Yamaga, E. Ono, N. Murayama, H. Yokozeki, and I. Katayama. 2019. Why does sweat lead to the development of itch in atopic dermatitis? *Exp Dermatol*. 28:1416–1421. doi:10.1111/exd.13981.
- Nakajima, Y., N. Aoyama, F. Takahashi, H. Sasaki, K. Hatanaka, A. Moritomo, M. Inami, M. Ito, K. Nakamura, F. Nakamori, T. Inoue, and S. Shirakami. 2016. Design, synthesis, and evaluation of 4,6-diaminonicotinamide derivatives as novel and potent immunomodulators targeting JAK3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 24:4711–4722. doi:10.1016/j.bmc.2016.08.007.
- Nakamura, K., M. Inami, H. Morio, K. Okuma, M. Ito, T. Noto, S. Shirakami, J. Hirose, and T. Morokata. 2017. AS2553627, a novel JAK inhibitor, prevents chronic rejection in rat cardiac allografts. *European Journal of Pharmacology*. 796:69–75. doi:10.1016/j.ejphar.2016.12.025.
- Nejad, A.S., and D.W. MacGlashan Jr. 2018. Dependence of Optimal Histamine Release on Cell Surface IgE Density on Human Basophils: Nature of the Stimulus. *Int Arch Allergy Immunol*. 177:181–191. doi:10.1159/000490152.
- Nezamololama, N., K. Fieldhouse, K. Metzger, and M. Gooderham. 2020. Emerging systemic JAK inhibitors in the treatment of atopic dermatitis: a review of abrocitinib, baricitinib, and upadacitinib. *DIC*. 9:1–7. doi:10.7573/dic.2020-8-5.
- Niu, G.-J., J.-D. Xu, W.-J. Yuan, J.-J. Sun, M.-C. Yang, Z.-H. He, X.-F. Zhao, and J.-X. Wang. 2018. Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK/STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation. *Front. Immunol*. 9:2392. doi:10.3389/fimmu.2018.02392.
- O'Brien, C.A., I. Gubrij, S.-C. Lin, R.L. Saylor, and S.C. Manolagas. 1999. STAT3 Activation in Stromal/Osteoblastic Cells Is Required for Induction of the Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand and Stimulation of Osteoclastogenesis by gp130-utilizing Cytokines or Interleukin-1 but Not 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or Parathyroid Hormone. *Journal of Biological Chemistry*. 274:19301–19308. doi:10.1074/jbc.274.27.19301.
- Odhiambo, J.A., H.C. Williams, T.O. Clayton, C.F. Robertson, and M.I. Asher. 2009. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124:1251-1258.e23. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.009.
- O'Shea, J.J., D.M. Schwartz, A.V. Villarino, M. Gadina, I.B. McInnes, and A. Laurence. 2015. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu. Rev. Med*.

66:311–328. doi:10.1146/annurev-med-051113-024537.

- Outerbridge, C.A., and T.J.M. Jordan. 2021. Current Knowledge on Canine Atopic Dermatitis. *Advances in Small Animal Care*. 2:101–115. doi:10.1016/j.yasa.2021.07.004.
- Parganas, E., D. Wang, D. Stravopodis, D.J. Topham, J.-C. Marine, S. Teglund, E.F. Vanin, S. Bodner, O.R. Colamonici, J.M. van Deursen, G. Grosveld, and J.N. Ihle. 1998. Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors. *Cell*. 93:385–395. doi:10.1016/S0092-8674(00)81167-8.
- Peiser, M., J. Koeck, C.J. Kirschning, B. Wittig, and R. Wanner. 2008. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4<sup>+</sup> T cell stimulatory capacity. *Journal of Leukocyte Biology*. 83:1118–1127. doi:10.1189/jlb.0807567.
- Pourpak, Z., A. Farhoudi, M. Mahmoudi, M. Movahedi, M. Ghargozlou, A. Kazemnejad, and B. Eslamnoor. 2004. The Role of Cow Milk Allergy in Increasing the Severity of Atopic Dermatitis. *Immunological Investigations*. 33:69–79. doi:10.1081/IMM-120027686.
- Punnonen, J., G. Aversa, B.G. Cocks, A.N. McKenzie, S. Menon, G. Zurawski, R. de Waal Malefyt, and J.E. de Vries. 1993. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3730–3734. doi:10.1073/pnas.90.8.3730.
- Radtke, S., S. Haan, A. Jörissen, H.M. Hermanns, S. Diefenbach, T. Smyczek, H. Schmitz-Vandeur, P.C. Heinrich, I. Behrmann, and C. Haan. 2005. The Jak1 SH2 Domain Does Not Fulfill a Classical SH2 Function in Jak/STAT Signaling but Plays a Structural Role for Receptor Interaction and Up-regulation of Receptor Surface Expression. *J. Biol. Chem.* 280:25760–25768. doi:10.1074/jbc.M500822200.
- Reich, K., A. Heine, S. Hugo, V. Blaschke, P. Middel, A. Kaser, H. Tilg, S. Blaschke, C. Gutgesell, and C. Neumann. 2001. Engagement of the FcεRI Stimulates the Production of IL-16 in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 167:6321–6329. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6321.
- Reise Sousa, C., and J.M. Austyn. 1993. Phagocytosis of Antigens by Langerhans Cells. *In Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*. E.W.A. Kamperdijk, P. Nieuwenhuis, and E.C.M. Hoefsmit, editors. Springer US, New York, NY. 199–204.
- Rodig, S.J., M.A. Meraz, J.M. White, P.A. Lampe, J.K. Riley, C.D. Arthur, K.L. King, K.C.F. Sheehan, L. Yin, D. Pennica, E.M. Johnson, and R.D. Schreiber. 1998. Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced Biologic Responses. *Cell*. 93:373–383. doi:10.1016/S0092-8674(00)81166-6.
- Rodríguez, E., H. Baurecht, E. Herberich, S. Wagenpfeil, S.J. Brown, H.J. Cordell, A.D. Irvine, and S. Weidinger. 2009. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: Robust risk factors in atopic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123:1361-1370.e7. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.036.
- Rothenberg, M.E., and S.P. Hogan. 2006. THE EOSINOPHIL. *Annu. Rev. Immunol.* 24:147–174. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720.
- Roy, D., K. Yu, and M.R. Lieber. 2008. Mechanism of R-Loop Formation at Immunoglobulin Class Switch Sequences. *Mol Cell Biol*. 28:50–60. doi:10.1128/MCB.01251-07.

- Russo, R.C., C.C. Garcia, M.M. Teixeira, and F.A. Amaral. 2014. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*. 10:593–619. doi:10.1586/1744666X.2014.894886.
- Ruzicka, T., J.M. Hanifin, M. Furue, G. Pulka, I. Mlynarczyk, A. Wollenberg, R. Galus, T. Etoh, R. Mihara, H. Yoshida, J. Stewart, and K. Kabashima. 2017. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 376:826–835. doi:10.1056/NEJMoa1606490.
- Saharinen, P., and O. Silvennoinen. 2002. The Pseudokinase Domain Is Required for Suppression of Basal Activity of Jak2 and Jak3 Tyrosine Kinases and for Cytokine-inducible Activation of Signal Transduction. *J. Biol. Chem*. 277:47954–47963. doi:10.1074/jbc.M205156200.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*. 182:389–400. doi:10.1084/jem.182.2.389.
- Sampson, A. 2016. Food Hypersensitivity and Atopic Dermatitis. *Allergy Proc*.
- Sandilands, A., A. Terron-Kwiatkowski, P.R. Hull, G.M. O'Regan, T.H. Clayton, R.M. Watson, T. Carrick, A.T. Evans, H. Liao, Y. Zhao, L.E. Campbell, M. Schmuth, R. Gruber, A.R. Janecke, P.M. Elias, M.A.M. van Steensel, I. Nagtzaam, M. van Geel, P.M. Steijlen, C.S. Munro, D.G. Bradley, C.N.A. Palmer, F.J.D. Smith, W.H.I. McLean, and A.D. Irvine. 2007. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet*. 39:650–654. doi:10.1038/ng2020.
- Schmitt, N., R. Morita, L. Bourdery, S.E. Bentebibel, S.M. Zurawski, J. Banchereau, and H. Ueno. 2009. Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity*. 31:158–169. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.016.
- Sgro, C. 1995. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology*. 105:23–29. doi:10.1016/0300-483X(95)03123-W.
- Silverberg, J.I., and J.M. Hanifin. 2013. Adult eczema prevalence and associations with asthma and other health and demographic factors: A US population-based study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 132:1132–1138. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.031.
- Simpson, E.L., T. Bieber, E. Guttman-Yassky, L.A. Beck, A. Blauvelt, M.J. Cork, J.I. Silverberg, M. Deleuran, Y. Kataoka, J.-P. Lacour, K. Kingo, M. Worm, Y. Poulin, A. Wollenberg, Y. Soo, N.M.H. Graham, G. Pirozzi, B. Akinlade, H. Staudinger, V. Mastey, L. Eckert, A. Gadkari, N. Stahl, G.D. Yancopoulos, and M. Ardeleanu. 2016. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*. 375:2335–2348. doi:10.1056/NEJMoa1610020.
- Simpson, E.L., J. -P. Lacour, L. Spelman, R. Galimberti, L.F. Eichenfield, R. Bissonnette, B.A. King, J.P. Thyssen, J.I. Silverberg, T. Bieber, K. Kabashima, Y. Tsunemi, A. Costanzo, E. Guttman-Yassky, L.A. Beck, J.M. Janes, A.M. DeLozier, M. Gamalo, D.R. Brinker, T. Cardillo, F.P. Nunes, A.S. Paller, A. Wollenberg, and K. Reich. 2020. Baricitinib in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis and inadequate response to topical corticosteroids: results from two randomized monotherapy phase III trials. *Br J Dermatol*. 183:242–255. doi:10.1111/bjd.18898.
- So, A. 2007. Revue Médicale Suisse : Rhumatologie La patiente polyarthritique qui ne répond pas à l'anti-TNF. *Revue Médicale Suisse*. 3:60–62.

- Sparber, F., C.H. Tripp, M. Hermann, N. Romani, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology*. 215:770–779. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.014.
- Sperisen, P., S.M. Wang, E. Soldaini, M. Pla, C. Rusterholz, P. Bucher, P. Corthésy, P. Reichenbach, and M. Nabholz. 1995. Mouse Interleukin-2 Receptor  $\alpha$  Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 270:10743–10753. doi:10.1074/jbc.270.18.10743.
- Spuls, P.I., L.A.A. Gerbens, C.J. Apfelbacher, D. Wall, B.W.M. Arents, S. Barbarot, A. Roberts, M. Deleuran, M.A. Middelkamp-Hup, C. Vestergaard, S. Weidinger, J. Schmitt, A.D. Irvine, and C. Flohr. 2017. The International TREATment of ATopic Eczema (TREAT) Registry Taskforce: An Initiative to Harmonize Data Collection across National Atopic Eczema Photo- and Systemic Therapy Registries. *Journal of Investigative Dermatology*. 137:2014–2016. doi:10.1016/j.jid.2017.05.014.
- Ständer, S., M. Steinhoff, M. Schmelz, E. Weisshaar, D. Metze, and T. Luger. 2003. Neurophysiology of Pruritus: Cutaneous Elicitation of Itch. *Arch Dermatol*. 139. doi:10.1001/archderm.139.11.1463.
- Takeda, K., and S. Akira. 2015. Toll-Like Receptors. *CP in Immunology*. 109. doi:10.1002/0471142735.im1412s109.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P.F. Mühlradt, M. Morr, J.D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*. 13:933–940. doi:10.1093/intimm/13.7.933.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *The Journal of Immunology*. 169:10–14. doi:10.4049/jimmunol.169.1.10.
- Tefferi, A., and A. Pardanani. 2011. JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms: Rationale, current data and perspective. *Blood Reviews*. 25:229–237. doi:10.1016/j.blre.2011.06.002.
- Tong, P., and D.R. Wesemann. 2015. Molecular Mechanisms of IgE Class Switch Recombination. In *IgE Antibodies: Generation and Function*. J.J. Lafaille and M.A. Curotto de Lafaille, editors. Springer International Publishing, Cham. 21–37.
- Totté, J.E.E., W.T. van der Feltz, M. Hennekam, A. van Belkum, E.J. van Zuuren, and S.G.M.A. Pasmans. 2016. Prevalence and odds of *S taphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 175:687–695. doi:10.1111/bjd.14566.
- Traves, P.G., B. Murray, F. Campigotto, R. Galien, A. Meng, and J.A. Di Paolo. 2021. JAK selectivity and the implications for clinical inhibition of pharmacodynamic cytokine signalling by filgotinib, upadacitinib, tofacitinib and baricitinib. *Ann Rheum Dis*. 80:865–875. doi:10.1136/annrheumdis-2020-219012.
- Tsoi, L.C., E. Rodriguez, F. Degenhardt, H. Baurecht, U. Wehkamp, N. Volks, S. Szymczak, W.R. Swindell, M.K. Sarkar, K. Raja, S. Shao, M. Patrick, Y. Gao, R. Uppala, B.E. Perez White, S. Getsios, P.W. Harms, E. Maverakis, J.T. Elder, A. Franke, J.E. Gudjonsson, and S. Weidinger. 2019. Atopic Dermatitis Is an IL-13–Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 139:1480–1489. doi:10.1016/j.jid.2018.12.018.



- Ungureanu, D., J. Wu, T. Pekkala, Y. Niranjana, C. Young, O.N. Jensen, C.-F. Xu, T.A. Neubert, R.C. Skoda, S.R. Hubbard, and O. Silvennoinen. 2011. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol.* 18:971–976. doi:10.1038/nsmb.2099.
- Verstovsek, S., J. Gotlib, R.A. Mesa, A.M. Vannucchi, J.-J. Kiladjian, F. Cervantes, C.N. Harrison, R. Paquette, W. Sun, A. Naim, P. Langmuir, T. Dong, P. Gopalakrishna, and V. Gupta. 2017a. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. *J Hematol Oncol.* 10. doi:10.1186/s13045-017-0527-7.
- Verstovsek, S., R.A. Mesa, J. Gotlib, R.S. Levy, V. Gupta, J.F. DiPersio, J.V. Catalano, M. Deininger, C. Miller, R.T. Silver, M. Talpaz, E.F. Winton, J.H. Harvey, M.O. Arcasoy, E. Hexner, R.M. Lyons, R. Paquette, A. Raza, K. Vaddi, S. Erickson-Viitanen, I.L. Koumenis, W. Sun, V. Sandor, and H.M. Kantarjian. 2012. A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N Engl J Med.* 366:799–807. doi:10.1056/NEJMoa1110557.
- Verstovsek, S., R.A. Mesa, M.E. Salama, L. Li, C. Pitou, F.P. Nunes, G.L. Price, J.L. Giles, D.N. D’Souza, R.A. Walgren, and J.T. Prchal. 2017b. A phase 1 study of the Janus kinase 2 ( JAK2 ) V617F inhibitor, gandotinib (LY2784544), in patients with primary myelofibrosis, polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Leukemia Research.* 61:89–95. doi:10.1016/j.leukres.2017.08.010.
- Villazala-Merino, S., A. Rodriguez-Dominguez, V. Stanek, N.J. Champion, P. Gattinger, G. Hofer, R. Froeschl, I. Fae, C. Lupinek, S. Vrtala, H. Breiteneder, W. Keller, T. Perkmann, R. Nakamura, W.F. Pickl, R. Valenta, J. Eckl-Dorna, and V. Niederberger. 2020. Allergen-specific IgE levels and the ability of IgE-allergen complexes to cross-link determine the extent of CD23-mediated T-cell activation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 145:958-967.e5. doi:10.1016/j.jaci.2019.11.019.
- Weidinger, S., H. Baurecht, and J. Schmitt. 2017. A 5-year randomized trial on the safety and efficacy of pimecrolimus in atopic dermatitis: a critical appraisal. *Br J Dermatol.* 177:999–1003. doi:10.1111/bjd.15827.
- Weidinger, S., L.A. Beck, T. Bieber, K. Kabashima, and A.D. Irvine. 2018. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers.* 4:1. doi:10.1038/s41572-018-0001-z.
- Williams, H.C. 2000. The epidemiology, causes and prevention of atopic eczema. In *Atopic Dermatitis*. H.C. Williams, editor. Cambridge University Press. 3–24.
- Wilson, S.R., L. Thé, L.M. Batia, K. Beattie, G.E. Katibah, S.P. McClain, M. Pellegrino, D.M. Estandian, and D.M. Bautista. 2013. The Epithelial Cell-Derived Atopic Dermatitis Cytokine TSLP Activates Neurons to Induce Itch. *Cell.* 155:285–295. doi:10.1016/j.cell.2013.08.057.
- Wollenberg, A., S. Barbarot, T. Bieber, S. Christen-Zaech, M. Deleuran, A. Fink-Wagner, U. Gieler, G. Girolomoni, S. Lau, A. Muraro, M. Czarnecka-Operacz, T. Schäfer, P. Schmid-Grendelmeier, D. Simon, Z. Szalai, J.C. Szepietowski, A. Taïeb, A. Torrelo, T. Werfel, J. Ring, and the European Dermatology Forum (EDF), the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), the European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD), European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients’ Associations (EFA), the European Society for Dermatology and Psychiatry (ESDaP), the European Society of Pediatric Dermatology (ESPD), Global Allergy and Asthma European Network (GA2LEN) and the European Union of Medical Specialists. 2018. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children:

- part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 32:657–682. doi:10.1111/jdv.14891.
- Wollenberg, A., S. Wen, and T. Bieber. 1999. Phenotyping of epidermal dendritic cells: Clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry*. 37:147–155. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19991001)37:2<147::AID-CYTO8>3.0.CO;2-Y.
- Xu, X., Y.-L. Sun, and T. Hoey. 1996. Cooperative DNA Binding and Sequence-Selective Recognition Conferred by the STAT Amino-Terminal Domain. *Science*. 273:794–797. doi:10.1126/science.273.5276.794.
- Yan, H., F. Piazza, K. Krishnan, R. Pine, and J.J. Krolewski. 1998. Definition of the Interferon- $\alpha$  Receptor-binding Domain on the TYK2 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 273:4046–4051. doi:10.1074/jbc.273.7.4046.
- Yang, T.-L.B., and B.S. Kim. 2019. Pruritus in allergy and immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 144:353–360. doi:10.1016/j.jaci.2019.06.016.
- Yoshida, K., A. Kubo, H. Fujita, M. Yokouchi, K. Ishii, H. Kawasaki, T. Nomura, H. Shimizu, K. Kouyama, T. Ebihara, K. Nagao, and M. Amagai. 2014. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 134:856–864. doi:10.1016/j.jaci.2014.08.001.
- Yoshioka, Y., Y. Kamata, M. Tominaga, Y. Umehara, I. Yoshida, N. Matsuoka, and K. Takamori. 2021. Extract of *Scutellaria baicalensis* induces semaphorin 3A production in human epidermal keratinocytes. *PLoS ONE*. 16:e0250663. doi:10.1371/journal.pone.0250663.
- Yu, K., F. Chedin, C.-L. Hsieh, T.E. Wilson, and M.R. Lieber. 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol*. 4:442–451. doi:10.1038/ni919.
- Zhai, Y., L. Meng, R.W. Busuttil, M.H. Sayegh, and J.W. Kupiec-Weglinski. 2003. Activation of Alloreactive CD8<sup>+</sup> T Cells Operates Via CD4-Dependent and CD4-Independent Mechanisms and Is CD154 Blockade Sensitive. *The Journal of Immunology*. 170:3024–3028. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3024.
- Zhang, B., L.M. Roesner, S. Traidl, V.A.C.M. Koeken, C. Xu, T. Werfel, and Y. Li. 2022. Single-cell profiles reveal distinctive immune response in atopic dermatitis in contrast to psoriasis. *Allergy*. all.15486. doi:10.1111/all.15486.
- Zhao, Y., F. Wagner, S.J. Frank, and A.S. Kraft. 1995. The Amino-terminal Portion of the JAK2 Protein Kinase Is Necessary For Binding and Phosphorylation of the Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor  $\beta$  Chain. *Journal of Biological Chemistry*. 270:13814–13818. doi:10.1074/jbc.270.23.13814.
- Zhou, Y.-J., E.P. Hanson, Y.-Q. Chen, K. Magnuson, M. Chen, P.G. Swann, R.L. Wange, P.S. Changelian, and J.J. O'Shea. 1997. Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13850–13855. doi:10.1073/pnas.94.25.13850.

## Chapitre II

---

### Généralités sur les lymphocytes B régulateurs dans la transplantation rénale

## A. Généralités sur la transplantation rénale

Les reins sont deux organes fonctionnant en parallèle et indispensables au maintien de l'homéostasie du corps humain. Leurs fonctions sont multiples. La première et la plus importante est de filtrer le sang afin d'éliminer les déchets en régulant la concentration plasmatique en eau, urée, ions minéraux, sucres et autres acides aminés qui peuvent facilement traverser la membrane glomérulaire pour être éliminés dans les urines ou réabsorbés au niveau du tubule distal, et à l'inverse, les cellules présentes dans le sang sont retenues dans le système sanguin. En plus de cette fonction de filtration, les reins assurent aussi une fonction hormonale en produisant de l'érythropoïétine, facteur de croissance hématopoïétique favorisant la production de globules rouges ainsi que la rénine, qui participe à la régulation de la pression artérielle. Enfin, le rein participe à de nombreux processus enzymatiques et métaboliques. La défaillance rénale terminale se caractérise par une perte immédiate ou progressive de la filtration du sang par les reins. Les causes de cette défaillance sont multiples et souvent liées à des pathologies ciblant directement les reins comme la polykystose rénale, augmentant la pression artérielle et/ou produisant une quantité de métabolites trop importante qui endommage les unités filtrantes des reins comme le diabète, ou des maladies auto-immunes telles que Lupus, Glomérulonéphrite à IgA, Vasculite à IgA mais aussi par une toxicité médicamenteuse directe (Anglicheau et al., 2019; Jacobson, 1991; Murea et al., 2022a, 2022b).

Quand il y a dysfonctionnement des reins, une solution de remplacement doit être envisagée pour assurer la filtration du sang. Cette filtration peut être réalisée de manière extra-rénale, en faisant passer le sang soit à travers un rein artificiel extracorporel (Arasu et al., 2022), soit en utilisant une partie du péritoine abdominal en tant que filtre (Mehrotra et al., 2016). Ces deux méthodes ont l'avantage de ne pas nécessiter de matériel « rare » et sont possibles dès la détection de l'insuffisance rénale. Cependant, elles sont contraignantes pour le patient et peuvent fortement réduire la qualité de vie (Niang et al., 2018). A l'inverse, la transplantation est décrite comme étant la solution de choix pour la majorité des patients en termes de qualité de vie (O'Connell et al., 2020). Après résorption des actes chirurgicaux, le patient devra prendre un traitement immunosuppresseur quotidien à vie et avoir un suivi médical important

la première année post-transplantation, qui s'assouplira vers un bilan trimestriel avec le néphrologue sur le long terme.

Aujourd'hui, la transplantation présente deux grands aspects négatifs. Le premier est l'accès à la greffe et la pénurie d'organes disponibles. En France en 2019, 3643 organes ont pu être transplantés alors qu'au 01 janvier 2020, 16 181 patients étaient sur liste d'attente pour une greffe de rein dont 5269 nouveaux inscrits en 2019 (Divard and Goutaudier, 2021). Ces chiffres montrent que nous sommes actuellement loin d'être capable de greffer tous les patients éligibles à la greffe de rein, et que la dialyse est encore un point de passage obligé pour la grande majorité des patients. Ceci restera le cas tant que nous n'aurons pas de nouvelles sources d'organe. Pour cela, de nombreuses recherches sont axées autour de cet accès à la greffe et travaillent sur l'utilisation de greffons de qualité sous optimale, définie par la présence de facteurs de comorbidités comme une créatinine sérique faible chez le donneur ou une infection de l'échantillon par le VIH (Augustine, 2018; Nambiar et al., 2021). Sur l'humanisation d'organes issus d'autres espèces pour favoriser leur acceptation par le patient (Cooper et al., 2021; Montgomery et al., 2022; Porrett et al., 2022), et enfin sur la fabrication d'organes artificiels (Rajab and Tchantchaleishvili, 2019; Vijayavenkataraman et al., 2018).

La transplantation est aussi limitée par risque d'insuffisance rénale aigüe. Cette insuffisance peut être causée par des facteurs immunologiques ou non, résumés dans la figure 3 (Anglicheau et al., 2019). Les causes immunologiques associées à la destruction du greffon par le système immunitaire de l'hôte sont regroupées sous le terme de rejet. C'est la suite logique des transplantations allogéniques qui représentent aujourd'hui la quasi-exclusivité des greffes d'organe contrairement aux greffes tissulaires qui peuvent être réalisées en autologue. En absence d'option thérapeutique, le système immunitaire de l'hôte va reconnaître différents éléments du greffon et s'efforcer de les éliminer. Cette reconnaissance, et l'élimination dépendent de plusieurs paramètres, encore mal connus, probablement associés à des facteurs génétiques, à l'éducation du système immunitaire et à de nombreux facteurs de comorbidité. Afin d'aider le médecin dans la sélection d'un traitement, les rejets sont classés en différents types selon le suivi cinétique ainsi que les mécanismes immunologiques impliqués.

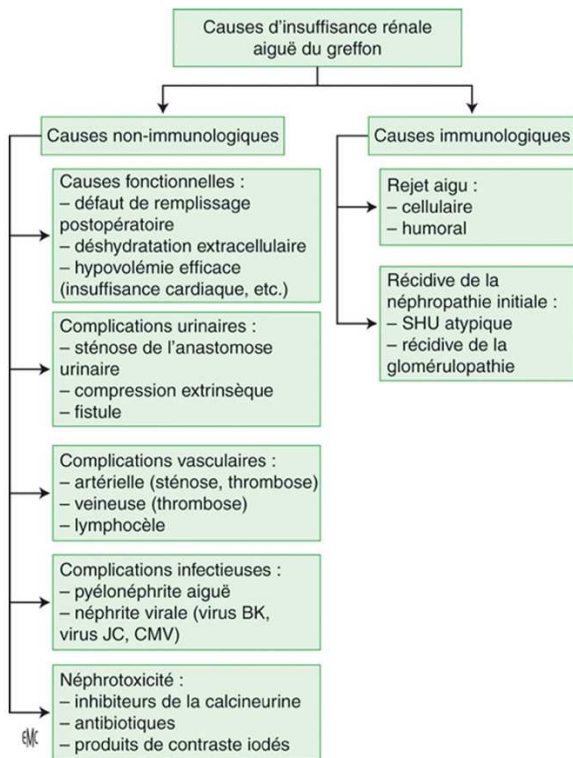


Figure 3 : Causes d'insuffisance rénale aiguë. SHU : syndrome hémolytique et urémique ; CMV : cytomegalovirus. D'après (Anglicheau et al., 2019)

### A.1. Le rejet :

En transplantation rénale, les critères diagnostiques du rejet ont été établis et sont régulièrement mis à jour lors des conférences de Banff (Haas et al., 2018; Roufosse et al., 2018). Les rejets sont caractérisés selon différents paramètres histologiques et immunologiques, selon la localisation des lésions et selon la durée pendant laquelle le greffon a gardé une fonction après la transplantation.

Les rejets hyperaigus surviennent dans les heures après l'anastomose vasculaire entre l'hôte et le greffon. Ils sont généralement associés à la présence d'anticorps qui sont dirigés contre l'endothélium du greffon déjà présent chez le receveur avant la greffe et qui vont activer le système du complément (Platt, 1992). Les rejets hyperaigus se caractérisent par une nécrose de l'organe et une thrombose des vaisseaux, nécessitant rapidement le retrait de l'organe défaillant. Ce type de rejet est majoritairement associé aux anticorps anti-HLA préexistants (Tittelbach-Helmrich et al., 2014). Ce type de rejet est très rare de nos jours, notamment grâce à la réalisation de tests sérologiques lors de l'appariement donneur/receveur pour s'assurer de l'absence de ces anticorps chez le receveur.

Les rejets aigus sont les rejets qui surviennent dans l'année après la greffe. Le facteur principal induisant ces rejets est la présence d'un mismatch HLA entre le donneur et le receveur, qui va favoriser la reconnaissance du greffon par l'hôte (Roufosse et al., 2018). On peut subdiviser le rejet aigu en deux types selon les mécanismes immunologiques impliqués (Haas et al., 2018). Le rejet aigu cellulaire est lié à la reconnaissance d'alloantigènes du donneur par les lymphocytes T qui s'activent, prolifèrent et migrent vers le greffon pour entraîner sa destruction (Rampersad et al., 2022; Wiebe et al., 2020) (Figure 4). Et le rejet aigu humoral qui s'apparente au rejet hyperaigu avec une activation du système du complément dépendant ou non d'anticorps dirigés contre le donneur (Halloran et al., 2022; Stites et al., 2020) (Figure 5).

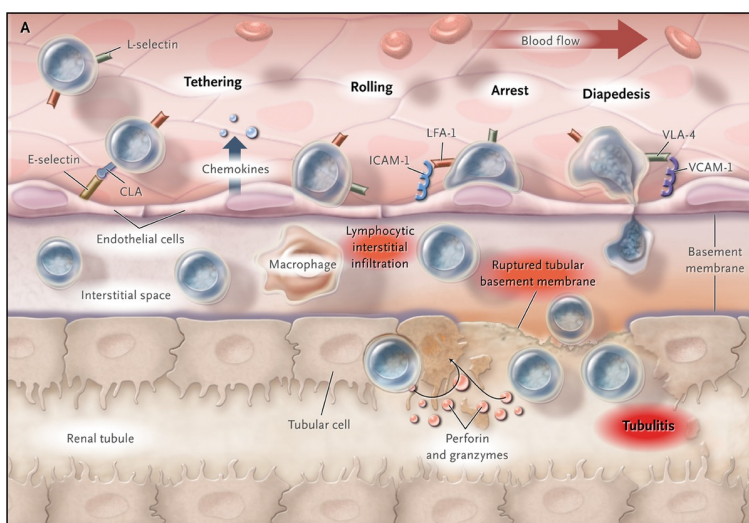


Figure 4 : Rejet aigu médié par les cellules T. D'après (Nankivell, 2010). Le rejet cellulaire et le transport des cellules dans le greffon sont illustrés. Après la fixation, le roulement et l'arrêt initiaux des lymphocytes T effecteurs (qui se lient aux sélectines et aux intégrines des cellules endothéliales), les lymphocytes et les autres cellules immunitaires pénètrent dans le compartiment interstitiel et envahissent les tubules, provoquant une destruction locale des tissus.

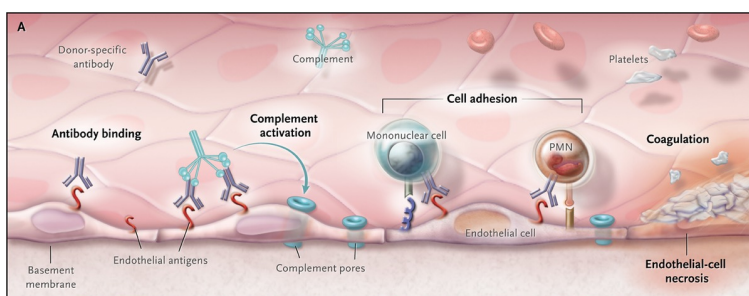


Figure 5 : Rejet aigu médié par les anticorps. D'après (Nankivell, 2010). Les anticorps contre les antigènes du donneur se lient aux antigènes exprimés sur les cellules endothéliales du vaisseau greffé. L'activation du complément et l'adhésion cellulaire qui s'ensuivent entraînent la nécrose des cellules endothéliales, puis le dépôt de plaquettes et la coagulation. PMN : polymorphonuclear cell

Aujourd'hui les causes du rejet aigu sont bien comprises et la sélection du donneur sur la compatibilité HLA a permis d'en réduire significativement l'incidence. Cependant, il n'est pas aisé de trouver un donneur compatible à 100% sur toutes les allèles HLA, qui ne sont de toute façon pas les seuls antigènes présents dans le greffon (Hourmant et al., 2019; Larkins et al., 2022). C'est pourquoi on va souvent s'arrêter à une compatibilité partielle, bien qu'en recherchant toujours la meilleure similarité possible et pour compenser ce taux d'erreur entre donneur et receveur, les patients sont placés sous traitement immunosuppresseur.

Enfin, les rejets chroniques regroupent tous ceux qui surviennent après la première année. Leurs causes sont bien moins bien comprises. Ces rejets sont avant tout associés à une fibrose du greffon, à une diminution de sa vascularisation et à une perte progressive de ses fonctions (Kloc et al., 2015). Tout comme les rejets aigus, ils peuvent aussi être associés aux composantes humorales et / ou cellulaires du système immunitaire.

#### A.2. Les traitements immunosuppresseurs :

Aujourd'hui, le risque de rejet pendant la première année après la greffe est faible, de l'ordre de 5% à 10% (DIVAT, Rapport d'activité 2019). Ceci est en grande partie due aux traitements immunosuppresseurs qui font partie du quotidien des patients transplantés et qui, pour la grande majorité des patients, devront être pris à vie.

Ainsi, le traitement se décompose en plusieurs phases : avant, au moment, et après la transplantation. Les traitements d'induction commencent dans les jours précédant la transplantation. Ils favorisent l'acceptation de la greffe par le receveur. Les traitements d'induction sont généralement lourds et vont très fortement diminuer toutes les fonctions du système immunitaire, tant contre le greffon que contre les autres pathogènes et augmenter ainsi le risque d'infections ou de cancer. Pour éviter ces issues peu favorables, les traitements immunosuppresseurs sont peu à peu diminués lors de la phase d'entretien. Cette diminution des traitements est accompagnée par un suivi de différents paramètres permettant d'apprécier la fonction rénale et l'activation du système immunitaire du patient et d'adapter l'immunosuppression à la hausse en cas de suspicion de rejet (Anglicheau et al., 2019).



De nombreuses générations de traitements immunosuppresseurs se sont succédées depuis la découverte des corticoïdes, et leur introduction dans les traitements post-greffes dans les années 1960. Leur développement avance de pair avec la compréhension du système immunitaire et de sa réaction contre le greffon pour cibler au mieux les mécanismes impliqués (Figure 6). Comme nous avons vu qu'il n'existe pas qu'un seul mode de rejet, les traitements doivent avoir des actions multiples pour permettre de bloquer les différentes voies d'activation du système immunitaire face au greffon (Parlakpinar and Gunata, 2021).

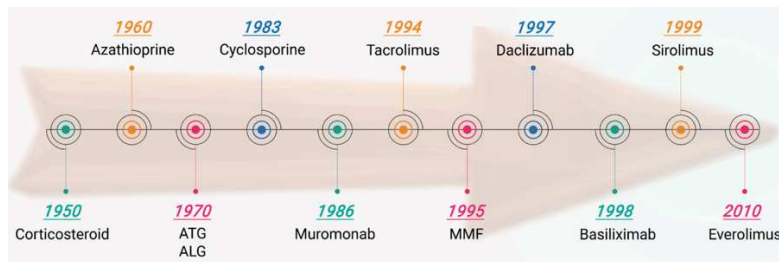


Figure 6 : Frise chronologique du développement des drogues immunosuppresseuses utilisées en transplantation. D'après (Parlakpinar and Gunata, 2021)

### A.2.1. Corticoïdes

Les corticoïdes utilisés aujourd'hui en thérapeutique sont des molécules dérivées d'hormones naturelles produites par les glandes surrénales (aldostérone et cortisol). Ils ont de nombreux effets sur le corps humain qui ne se limitent pas à leur action immunosuppressive. Le récepteur aux corticoïdes est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactivée par des protéines de choc thermique et des immunophilines (Grad and Picard, 2007). Lorsque les corticoïdes fixent leur récepteur en migrant passivement à travers la membrane cytoplasmique, le complexe corticoïde-récepteur est libéré et transloqué vers le noyau où ils agissent en tant que facteur de transcription pouvant se lier aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), de séquence d'ADN palindromique (GGAACAnnnTGTTCT) et aux éléments de réponse négative aux glucocorticoïdes (nGRE) de séquence (CTCC(n)0-2GGAGA) (Beato, 1989; Hudson et al., 2013; Surjit et al., 2011). En plus de ses propres éléments de réponse, le complexe corticoïde-récepteur se lie à d'autres facteurs de transcriptions, STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription), NF-kB et AP-1 (Nissen and Yamamoto, 2000; Yang-Yen et al., 1990). La liaison des corticoïdes sur leur récepteur agit aussi hors de ce cadre de facteur de transcription. Ce complexe peut se lier à différentes cascades de signalisation pour moduler directement leur activité, dans le cytoplasme ou après translocation dans les mitochondries (Croxtall et al., 2000; Groeneweg et al., 2012). Au travers

de leurs différents mécanismes, les corticoïdes peuvent réguler différents métabolismes, l'apoptose, la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, et plus généralement sur le développement, l'homéostasie, l'inflammation ou la cognition (Rhen and Cidlowski, 2005). De par leur très vaste action anti-inflammatoire, les corticoïdes font partie des drogues favorisées dans le contexte de transplantation. Cependant, de la même manière que tous les traitements hormonaux, leur utilisation doit être surveillée et leur arrêt se faire progressivement pour favoriser la reprise de la production physiologique par les surrénales (Ramamoorthy and Cidlowski, 2016).

#### *A.2.2. Inhibiteurs de la calcineurine*

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans les processus de rejet, que ce soient les lymphocytes T CD8+ qui présentent une cytotoxicité directe lors du rejet à médiation cellulaire ou les lymphocytes Tfh CD4+ qui supportent l'activité d'autres types cellulaires en produisant des cytokines, et participent notamment à l'activation et au changement de classe des immunoglobulines des lymphocytes B pendant le rejet humoral (Walters and Vinuesa, 2016). L'inhibition de ces lymphocytes T en prévention du rejet est donc primordiale et la découverte de la cyclosporine, le premier inhibiteur de la calcineurine (CNI), en 1976 a été une avancée majeure dans l'évolution des traitements immunosuppresseurs (Rüegger et al., 1976). Les effets des CNI sont aujourd'hui bien décrits. Après leur entrée dans le cytoplasme, ils forment des complexes avec certaines immunophilines qui sont capables de séquestrer la calcineurine (Huai et al., 2002). La calcineurine est une phosphatase activée par le flux calcique qui suit l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) sur un complexe CMH-peptide (issu du donneur dans le cas de la transplantation). Ainsi, en présence de CNI, le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NF-AT) ne peut pas transloquer vers le noyau faute de déphosphorylation par la calcineurine (Clipstone and Crabtree, 1992). NF-AT est un facteur de transcription central dans l'activation des lymphocytes T en régulant la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, l'IL-4, l'interféron- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Hogan, 2017).

#### *A.2.3. Antimétabolites*

La prolifération cellulaire est conditionnée par la capacité des cellules à répliquer leur ADN. Contrairement aux autres types cellulaires, les lymphocytes ne peuvent pas recycler les purines pré-existantes et dépendent donc de leur synthèse de-novo. Les antimétabolites tels

que l'azathioprine et le mycophenolate mofetil sont métabolisés pour inhiber cette synthèse de bases puriques et bloquer la prolifération des lymphocytes (Allison, 2005). Les dérivés de l'azathioprine vont aussi bloquer la réplication de l'ADN en s'intercalant lors de leur synthèse (Anstey et al., 2004).

#### *A.2.4. Immunogénéisation des lymphocytes*

Afin de cibler spécifiquement les lymphocytes, il est possible de les rendre immunogènes afin de les faire éliminer par d'autres mécanismes immunitaires. Pour cela des anticorps humanisés ciblant des molécules spécifiques des lymphocytes ont été développés tels que le Muromonab ( $\alpha$ CD3, lymphocytes T), le rituximab ( $\alpha$ CD20, lymphocytes B) Alemtuzumab ( $\alpha$ CD52, lymphocytes (Hill et al., 2017; Sood and Hariharan, 2018; Zhao et al., 2017)). Une fois fixés sur leur cible, ces anticorps permettent le recrutement du système du complément ou des phagocytes (Macrophages, granulocytes) via des sites spécifiques de leurs fragments constants (O'Mahony, 2006).

#### *A.2.5. Inhibiteurs de l'activation lymphocytaire*

Suite à la reconnaissance de l'antigène, les lymphocytes T ont besoin de différents signaux pour compléter leur activation. La signalisation TCR fournit un signal incomplet qui est amplifié par les signaux de costimulation. Le principal signal de costimulation est fourni par l'interaction du CD28 avec ses ligands CD80 et CD86 présents sur les cellules présentatrices d'antigène (Rudd and Schneider, 2003). En absence cette costimulation, le lymphocyte T entre en anergie, est inactivé et devient insensible à un réengagement du TCR (Hosseini et al., 2020). Le Belatacept, protéine de fusion entre le domaine extracellulaire du CTLA-4 et un fragment constant IgG1 permet de mimer l'action du CTLA-4, en se liant aux récepteurs CD80 et CD86 entrant ainsi en compétition avec le CD28 et empêchant l'activation complète des lymphocytes T (Wekerle and Grinyó, 2012).

#### *A.2.6. Inhibiteurs de la signalisation inter-cellulaire*

Les cytokines et chimiokines sont des messagers solubles permettant le transport d'informations sans nécessiter de contact entre les cellules. Les cytokines sont le 3<sup>ème</sup> signal nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T, mais ils participent aussi à la survie et la différenciation cellulaire, et les chimiokines ont un rôle important dans la migration cellulaire, notamment au niveau des sites d'inflammation ou dans les organes lymphoïdes

secondaires (Baggiolini, 1998). Différentes voies de signalisation intracellulaires permettent l'intégration de ces signaux. La plus largement utilisée est la voie JAK/STAT qui sont utilisées par plus de 50 cytokines, chimiokines et facteurs de transcription hématopoïétiques. Parmi les 4 JAK, JAK3 est présente uniquement dans les populations lymphoïdes et les inhibiteurs de JAK3 ont montré une bonne efficacité pour bloquer l'activation des lymphocytes T en inhibant les cytokines de la famille de l'IL-2 (Maeshima et al., 2012). La seconde voie de signalisation largement utilisée par les cytokines est la voie des phosphoinositide-3-kinase / protéine kinase B / mammalian Target of Rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) (Grüniger et al., 2022). Ces deux voies de signalisation peuvent induire la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes. Les inhibiteurs de mTOR (Sirolimus et Everolimus) et les inhibiteurs de JAK (Tofacitinib, Ruxolitinib) permettent une inhibition efficace de la prolifération, survie et de la différenciation des lymphocytes T (Shihab et al., 2014). Les effets des inhibiteurs de JAK sur les différentes population immunitaires sont plus longuement décrits dans une revue de la littérature en annexe 4 (Saillet et al., 2019).

Cibler ces voies de signalisation, redondantes entre les différentes cytokines, permet d'avoir des effets très larges sur le système immunitaire et ne va pas uniquement bloquer l'activation des lymphocytes T effecteurs, qui sont la principale cible des traitements (Traves et al., 2021). Les traitements basés sur la communication cytokinique sont donc à la fois très spécifiques au système immunitaire, mais peu spécifiques à l'intérieur de celui-ci, ce qui peut être problématique à l'initiation de la tolérance périphérique en bloquant aussi les cellules régulatrices qui requièrent aussi bien souvent les mêmes cytokines que les cellules effectrices, ou des cytokines de même famille (de Leur et al., 2017; Lindner et al., 2013). L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des cytokines ou leurs récepteurs permet de mieux cibler certaines voies cytokiniques, comme le daclizumab, un anti IL-2R $\alpha$  (Flavio et al., 1998).

### A.3. Choix de la stratégie thérapeutique

Ces différentes stratégies sont complémentaires et leur combinaison permet d'accroître leur efficacité en ciblant des voies d'activation différentes (Figure 7). Les traitements d'induction et de maintenance sont principalement composés de 3 molécules de la classe des corticoïdes, des CNI et de l'azathioprine (Lindholm et al., 1994). Chaque centre de transplantation a son propre protocole d'immunosuppression en s'attachant à adapter les traitements en fonction

de la réponse du patient. Plusieurs évènements peuvent amener l'équipe médicale à modifier le traitement d'un patient. D'abord, le départ d'un rejet va immédiatement entraîner une augmentation de la dose d'immunosuppresseurs ou son changement avec des molécules orientées sur les mécanismes du rejet (Haas et al., 2018). Ensuite, l'utilisation de drogues immunosuppressives s'accompagne de nombreux effets secondaires. Beaucoup sont liés à la toxicité des immunosuppresseurs de première génération (Corticoïdes et inhibiteurs de la calcineurine), qui vont ironiquement avoir une forte toxicité au niveau des reins. Enfin il y a un risque d'avoir une immunosuppression trop importante, ou trop peu spécifique, pouvant conduire à une plus grande susceptibilité aux infections, cancers. Les traitements immunosuppresseurs sont alors minimisés, voir arrêtés le temps de traiter ces autres maladies (Boratyńska et al., 2007; Cheung et al., 2017). De façon quasi-systématique, l'arrêt des traitements immunosuppresseurs va immédiatement induire le rejet. Mais chez certains patients qui ont, par nécessité ou non, arrêté leurs traitements, on observe ce qu'on appelle une tolérance opérationnelle spontanée vis-à-vis du greffon. Cette tolérance est définie par la perte de la réponse spécifique anti-donneur et le maintien d'une réponse immunitaire normale sur tout autre type de stimulation (infection, cancer). En clinique, cela se traduit par une fonction rénale stable (créatinine stable < 150µmol/L, protéinurie stable < 1g/24h) pendant plus d'un an après l'arrêt des traitements immunosuppresseurs.

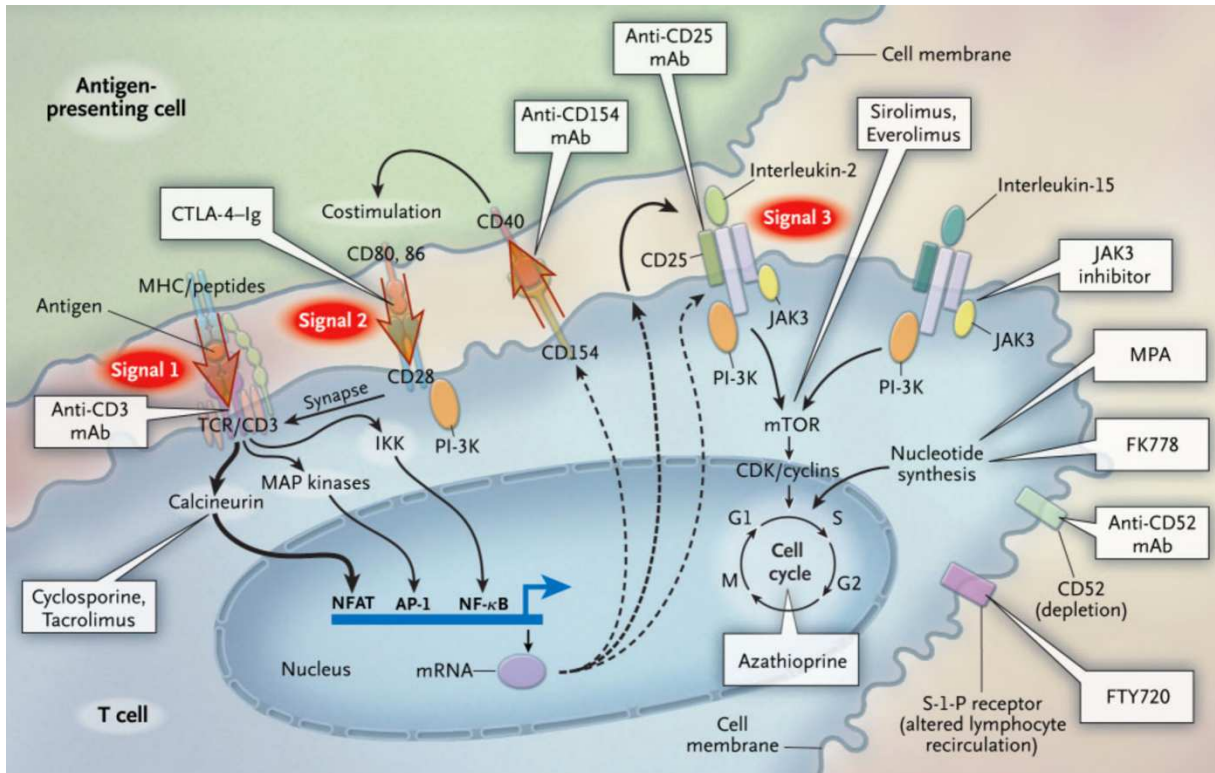


Figure 7 : Sites d'action de différentes drogues immunosuppressives. D'après (Halloran, 2004)

## B. Mécanismes de tolérance

Comme nous l'avons vu, ces traitements ne sont pas infallibles avec une proportion non nulle de rejet avant un an, et une demi-vie des reins greffés de 143 mois (Figure 8). De nouvelles stratégies, visant non plus à empêcher la fonction immune mais visant à rendre le receveur tolérant au rein du donneur, c'est-à-dire une stratégie visant à redéfinir le « soi » du receveur sont aujourd'hui mises en avant pour améliorer la demi-vie des greffons tout en s'affranchissant des traitements immunosuppresseurs sur le long terme. Cette quête de la tolérance en transplantation a été initiée dès la seconde moitié du XXème siècle avec les travaux de Medawar sur les greffes de peau (Billingham and Medawar, 1953). La définition du soi implique différents mécanismes intervenant soit lors de la lymphopoïèse (tolérance centrale) soit lors de l'activation des cellules dans les tissus ou les organes lymphoïdes secondaire (tolérance périphérique).

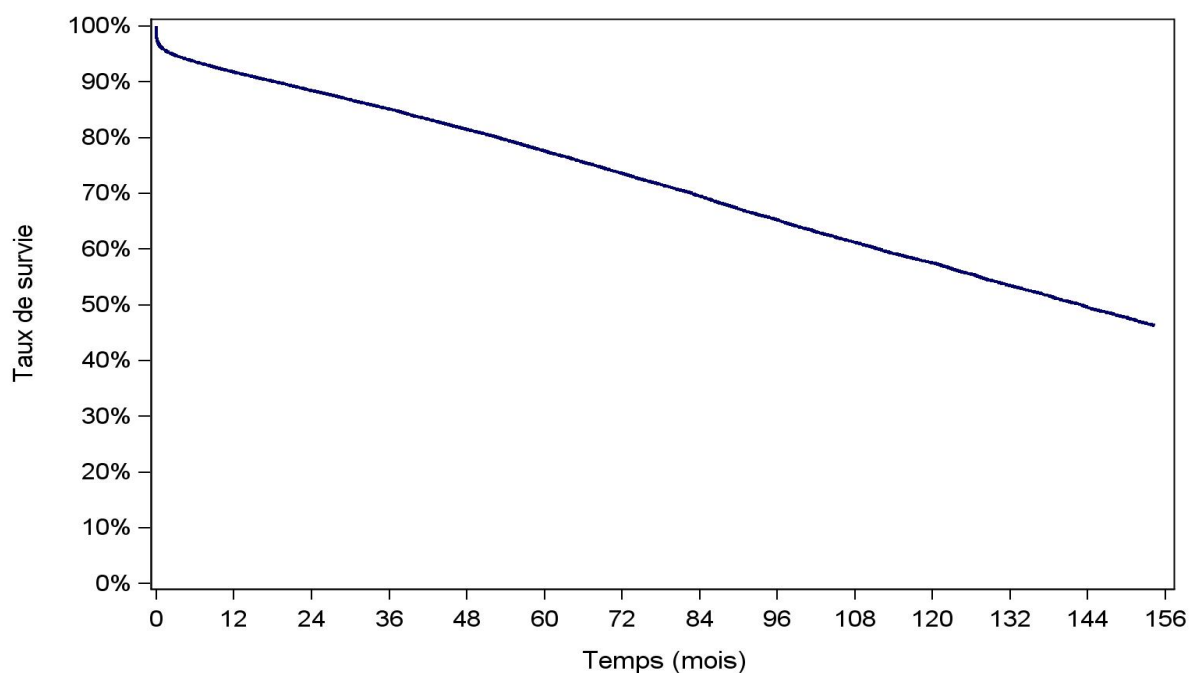


Figure 8 : Survie globale du greffon rénal en France pour les patients greffés entre 2007 et 2020. (Agence de la biomédecine)

### B.1. La tolérance centrale

La tolérance centrale correspond au « contrôle qualité » lors de la génération des cellules de l'immunité adaptative et concerne donc uniquement les lymphocytes T et B. La spécificité d'un lymphocyte à l'encontre d'un antigène n'est possible que grâce à la séquence variable des récepteurs des lymphocytes B et T (BCR, TCR). Dans les cellules immatures, les gènes des chaînes lourdes du BCR ainsi que de la chaîne  $\beta$  et  $\delta$  du TCR sont composés d'une succession de différents fragments de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  du BCR ainsi que les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  du TCR ne sont composés que de séquences V et J en amont de la (ou des) région constante. Lors de la maturation (stades pro-B/pré-B et thymocyte double négatif/double positif), les recombinaisons RAG vont permettre un réarrangement de ces gènes non fonctionnels pour rapprocher une séquence de chaque région V(D)J à la région constante (Schatz et al., 1989). En complément, la Terminal deoxynucléotidyl Transferase (TdT) peut ajouter aléatoirement de 1 à 20 nucléotides entre chaque fragment (Delarue et al., 2002). Ainsi, il existe théoriquement de l'ordre de  $10^{11}$  séquences possibles de BCR et de TCR devant reconnaître, de façon très hasardeuse, un complexe CMH-peptide pour le TCR et un antigène pour le BCR. Ces précurseurs des lymphocytes vont passer par des étapes successives de sélection, permettant l'élimination des BCR/TCR autoréactifs et la non reconnaissance du soi.

### B.1.1. Sélection du TCR

Que ce soit pour la reconnaissance des cellules infectées par un organisme intra-cellulaire par les lymphocytes T CD8+, ou pour soutenir l'activation du système immunitaire par les lymphocytes T CD4+, l'activation des lymphocytes T nécessite que l'antigène soit présent sur une cellule du soi. Cellules infectées et cellules présentatrices d'antigène (professionnelles) vont présenter différents peptides issus de la dégradation de protéines qui les composent par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I et CMH II) (Croft et al., 1992; Miller et al., 1976). La reconnaissance du TCR doit se faire sur le complexe CMH-peptide et implique une première sélection des thymocytes sur leur capacité à reconnaître les CMH du soi. Cette sélection positive permet de sauvegarder les cellules engageant leur TCR sur un complexe CMH du soi – peptide de la mort programmée en leur fournissant un signal de survie (Fink and Bevan, 1978; Hogquist et al., 1997). Ces 10% à 30% de cellules sélectionnées (Merkenschlager et al., 1997) subissent ensuite une seconde sélection, négative, qui induit la mort des cellules engageant leur TCR sur un complexe CMH du soi – peptide du soi, éliminant ainsi les potentielles cellules autoréactives (Zal et al., 1994). Cependant, certaines cellules d'autoréactivité faible survivent mais se différencient en cellules régulatrices exprimant le FoxP3. Ces cellules seront plus longuement discutées dans la partie sur les lymphocytes T régulateurs des mécanismes de tolérance périphérique. Les étapes de la sélection du TCR sont représentés Figure 9.

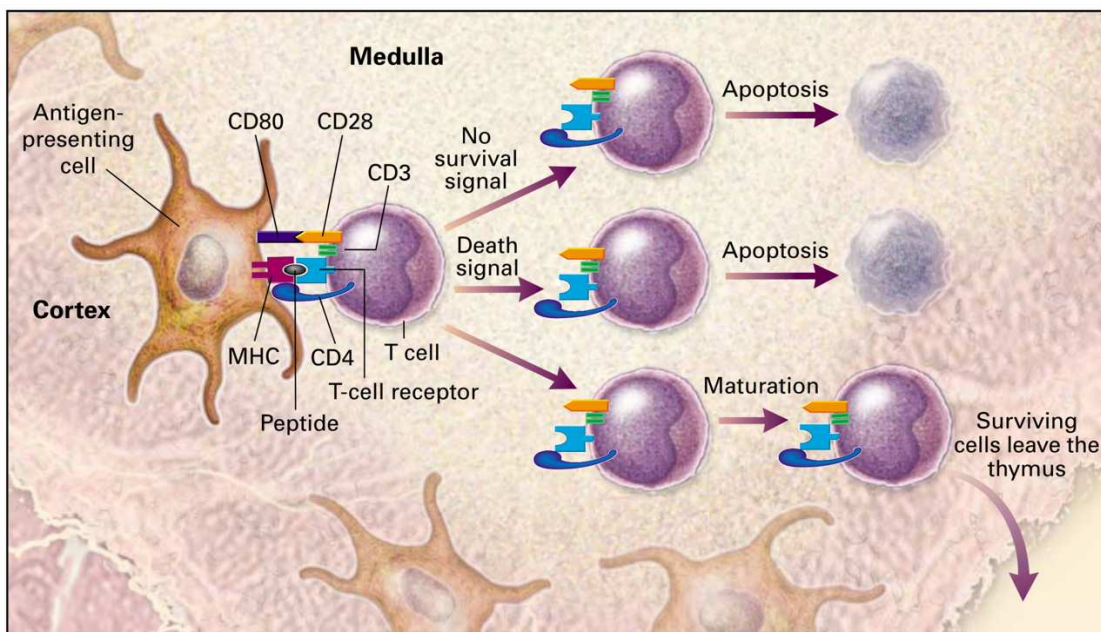


Figure 9 : Mécanismes de la tolérance centrale impliquant les lymphocytes T. D'après (Thomas and Avrion, 2001)



### *B.1.2. Sélection du BCR*

Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B ne reconnaissent pas forcément les antigènes dans un contexte cellulaire, et ne sont pas soumis à la reconnaissance du CMH du soi. Après réarrangement d'une chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ , la cellule B immature est sélectionnée sur son incapacité à reconnaître des autoantigènes dans la moelle osseuse (Goodnow et al., 1995). La majorité des lymphocytes autoréactifs sont éliminés par délétion clonale. Cependant, d'autres destins sont possibles pour ces lymphocytes B autoréactifs. Avant d'induire la mort cellulaire, la ligation du BCR avec un autoantigène permet un réarrangement VJ des chaînes légères. En effet, le rapprochement aléatoire de deux séquences V et J aboutit à l'élimination du matériel génétique se trouvant physiquement entre ces séquences. L'expression des protéines RAG permet différents réarrangements successifs, jusqu'à obtention d'un BCR non autoréactifs ou l'épuisement de toutes les séquences V et J (Casellas et al., 2001). Les cellules autoréactives peuvent aussi entrer en anergie lorsque leur autoantigène est sous forme soluble. Cet état d'anergie inhibe toute réponse effectrice en bloquant la transduction du signal BCR. Et si elles peuvent migrer en périphérie, ces cellules ont une biologie altérée. Elles sont exclues des follicules lymphoïdes et ont une vie relativement courte (Dintzis et al., 1990; Leon et al., 2019; Reim et al., 1996). Les étapes de la sélection du BCR sont représentées Figure 10.

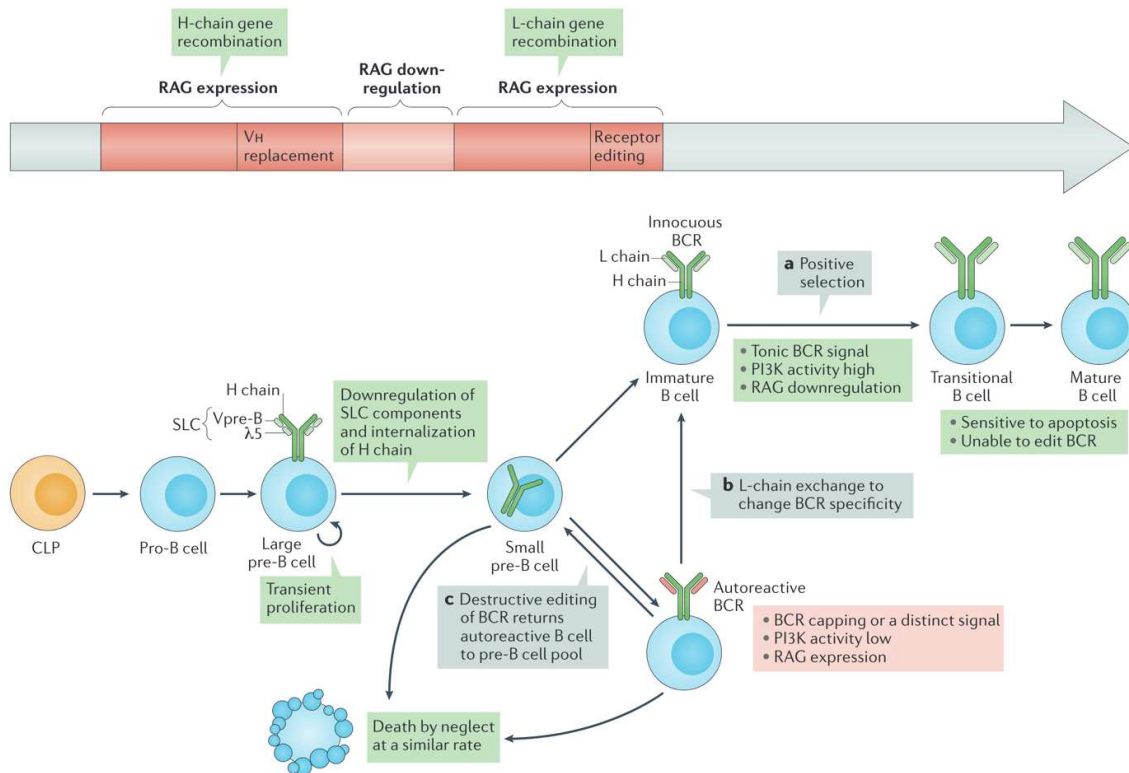


Figure 10 : Étapes de génération et sélection du BCR. D'après (Nemazee, 2017)

### B.1.3. Limites des mécanismes de la tolérance centrale

Une première limite de la tolérance centrale est un mécanisme permettant d'augmenter la spécificité des lymphocytes B activés en périphérie. L'hypermutation somatique permet de diversifier les gènes de la région V d'un lymphocyte B mature activé ce qui modifie légèrement la structure finale de l'immunoglobuline. La survie des clones de plus grande affinité se fait au détriment des clones de moins bonne affinité, ce qu'on peut définir comme une sélection positive (survie des cellules ayant la meilleure affinité), mais aucune sélection négative sur ces nouveaux clones ne garantit l'absence d'autoréactivité (McKean et al., 1984).

Une seconde limite à la tolérance centrale est la diversité antigénique de chaque organe. Chaque organe possède ses propres fonctions, ses propres types cellulaires et donc, ses propres antigènes. La tolérance centrale se faisant dans les organes lymphoïdes primaires, il faut permettre à ces organes d'exprimer un grand nombre d'auto-antigènes qui n'y sont normalement pas exprimés. Ces auto-antigènes sont exprimés par les cellules épithéliales via le facteur de transcription AIRE (AutoImmune REgulator) qui est responsable de l'activation de nombreux gènes périphériques dans le thymus et a aussi été retrouvé dans la moelle osseuse (Eldershaw et al., 2011). Environ 500 gènes sont activés dans le thymus par AIRE

(Nishijima et al., 2022), ce qui est bien évidemment trop peu pour couvrir tous les auto-antigènes. D'autres mécanismes viennent donc compléter cette tolérance centrale.

## B.2. La tolérance périphérique

La tolérance périphérique correspond à l'ensemble des mécanismes permettant la régulation du système immunitaire hors des organes lymphoïdes primaires. On peut encore diviser ces mécanismes en deux catégories : Les mécanismes intrinsèques, où la cellule effectrice va s'auto-réguler après la reconnaissance antigénique, et les mécanismes extrinsèques qui font intervenir une cellule tierce.

### B.2.1. *Les mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique*

Ces mécanismes intrinsèques se font lors de la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte. Ces mécanismes sont au nombre de 4 : L'ignorance, l'anergie, la déviation phénotypique et la déplétion clonale.

L'ignorance se définit simplement par l'incapacité du lymphocyte à se rendre sur le site de son antigène, ou par l'incapacité de l'interaction récepteur/antigène à transduire des signaux intracellulaires.

L'anergie se définit par l'inactivation des lymphocytes T due à une activation incomplète. Le lymphocyte T a besoin de plusieurs signaux pour s'activer. Le premier correspond à la liaison du TCR sur un complexe CMH-peptide spécifique, le second à la liaison de molécules de costimulation présentes sur les cellules présentatrices d'antigène professionnelles : CD28, ICOS et des membres de la famille du TNFR et le troisième à la liaison de cytokines favorisant la survie lymphocytaire et notamment celles de la famille de l'IL-2. En absence de costimulation, les lymphocytes T entrent dans un état d'anergie avec une activation incomplète des lymphocytes, conduisant à une absence de réponse. Cet état d'anergie peut aussi être induit par la stimulation chronique du lymphocyte T qui induit la production de CTLA-4, un récepteur de meilleure affinité pour le ligand de CD28 et transduisant un signal inhibiteur. L'anergie est un mécanisme important dans la tolérance au soi qui intervient dans différents cas de figure. Tout d'abord, il permet d'inactiver les lymphocytes qui reconnaissent un antigène du soi présenté par une cellule non professionnelle (qui ne présente pas les signaux de costimulation). Ensuite il permet de freiner la stimulation chronique des cellules

issues de l'expansion clonale d'un lymphocyte T activé. Ce mécanisme nécessite un rétrocontrôle inhibant le second signal qui passe par l'expression du CTLA-4 par les lymphocytes T activés (Vanhove et al., 2003). L'anergie a également été décrite lors de la stimulation chronique du lymphocyte B mais selon des mécanismes sensiblement différents. Classiquement, le signal BCR va induire un influx calcique court induisant une cascade de phosphorylation transduite par Lyn et Syk. L'activation chronique du BCR est associée à une mobilisation intracellulaire soutenue de la signalisation calcique et à une phosphorylation altérée de Syk par Lyn, ne permettant pas l'activation de cette dernière et donc la transduction du signal BCR. Cette inhibition est renforcée par différents mécanismes d'anergie passant par les phosphatases SHIP-1, SHP-1 et PTEN qui antagonisent la signalisation BCR (Cambier and Getahun, 2010; Liu et al., 2014; Yarkoni et al., 2010).

Le troisième mécanisme consiste en la déplétion clonale des lymphocytes B et T par apoptose. Cette déplétion met en jeu les voies FAS-FASL du lymphocyte T (Ryan, 2005; Sprent and Webb, 1995) et des mécanismes encore non-décrits du lymphocyte B (Nemazee et al., 1991; Nemazee and Bürki, 1989; Tan et al., 2019).

Enfin, le dernier mécanisme de déviation phénotypique a été décrit sur les lymphocytes T uniquement et repose sur la plasticité de ces cellules. L'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ induit une polarisation vers différents phénotypes effecteurs, dont les fonctions vont varier selon les cytokines présentes dans le micro-environnement. Les principales populations effectrices sont les Th1 et Th2 pour les Lymphocytes T CD4+ et les Tc1 et Tc2 pour les Lymphocytes T CD8+ sécrétant préférentiellement de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  pour les Th1/Tc1 et de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 pour les Th2/Tc2. Dans des modèles murins de diabète insulino-dépendant et de sclérose en plaque, des traitements cytokiniques pro-Th2 permettent de réduire les effets de ces maladies auto-immunes, des résultats similaires sont visibles dans des modèles de souris prédisposées à une orientation Th2 (Bradley et al., 1999; Young et al., 2000). Les mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique sont représentés Figure 11.

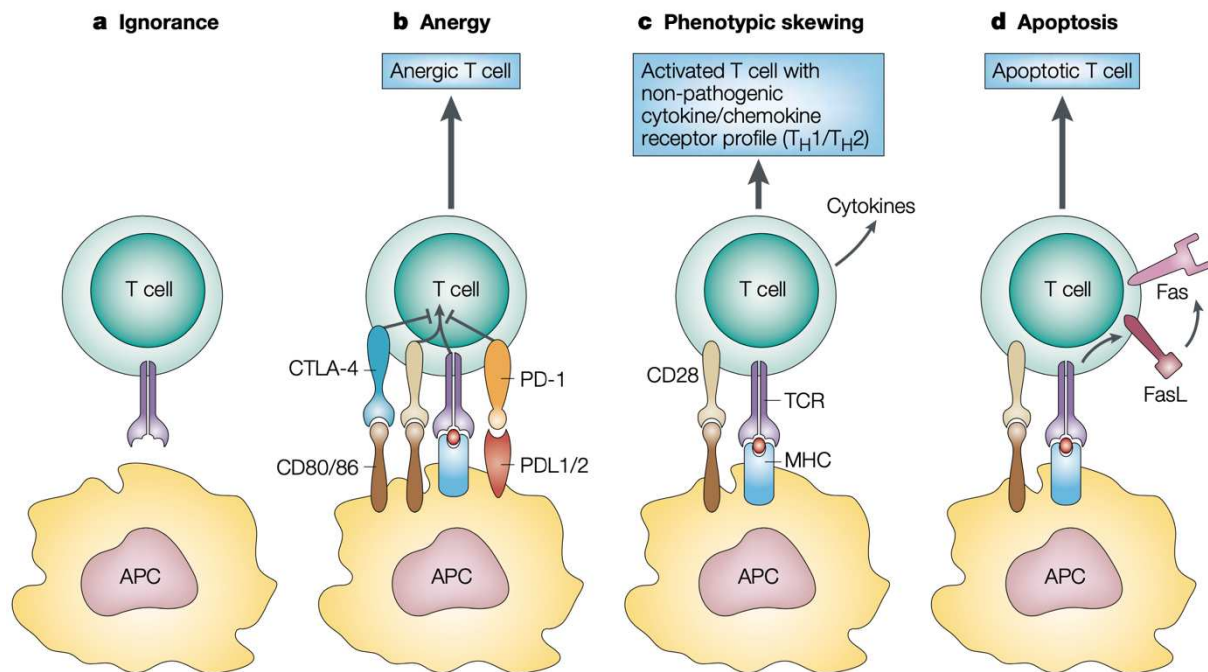


Figure 11 : Schéma des mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique. D'après (Walker and Abbas, 2002)

### B.2.2. Les mécanismes extrinsèques de la tolérance périphérique

En plus de ces mécanismes autorégulateurs, les cellules effectrices sont sensibles à de nombreux signaux extrinsèques permettant de limiter leur fonction. Ces signaux sont produits par des cellules régulatrices dont l'activité suppressive n'est pas dirigée contre un exo-antigène, mais contre les cellules effectrices. Ces cellules régulatrices ont été décrites dans de nombreuses populations immunitaires, si ce n'est toutes.

#### B.2.2.1. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont sans doute la population régulatrice la plus étudiée et la mieux décrite. Deux origines ont été décrites pour ces Tregs : soit des lymphocytes T immatures qui n'ont pas passé les étapes de sélection dont nous avons parlé dans les mécanismes de la tolérance centrale, mais qui ont réussi à survivre (Tregs naturels : nTregs), soit des lymphocytes T matures qui ont été activés en périphérie et qui se sont différenciés en présence de cytokines régulatrices (Tregs induits : iTregs). Les iTregs sont générés suite à l'activation des lymphocytes T naïfs suite à une costimulation insuffisante. La plasticité des lymphocytes T a aussi montré qu'il était possible de reformater les lymphocytes T effecteurs en présence de cytokines immunorégulatrices. Ces populations de Tregs sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription FoxP3 qui contrôle tout ou partie de leur phénotype régulateur (Kasprowicz et al., 2003; Sakaguchi, 2003). Initialement décrite dans la

population des lymphocytes T CD4+, on sait aujourd’hui qu’il y a une population de Tregs au sein des lymphocytes T CD8+, et qu’ils ont un rôle complémentaire aux Tregs CD4+ dans les mécanismes de tolérance. Les Tregs CD8+ fonctionnent via la production de Fibrinogène-like protein (FGL2) et l’induction de la production d’Indoléamine 2-3, DiOxygénase (IDO) par les cellules endothéliales (Picarda et al., 2015). FGL2 inhibe l’activation des cellules présentatrices d’antigènes en se liant aux FcγRII et FcγRIII ce qui en retour empêche l’activation des lymphocytes T effecteurs (Morris et al., 2020; Zhang et al., 2021). IDO est une enzyme sécrétée favorisant la dégradation du tryptophane, un acide aminé essentiel dont l’absence bloque la prolifération des lymphocytes T effecteurs ainsi que leur cycle cellulaire en phase G1. Des mécanismes beaucoup plus variés ont été décrits pour les lymphocytes T CD4+ : la production de cytokines suppressives (IL-10, IL-35, TGF-β), le blocage de voies métaboliques par la production et la délivrance de l’AMPc aux lymphocytes T effecteurs bloquant leurs fonctions, l’inhibition des fonctions T effectrices par contact cellulaire (LAG-3, CTLA-4), l’expression de forts niveaux de récepteur à l’IL-2 permettant aux Tregs de capter l’IL-2 et d’appauvrir l’approvisionnement des lymphocytes T effecteurs, et enfin une action cytotoxique directe mettant en jeu le granzyme B et la perforine (Bauché et al., 2018; Cao et al., 2007; Collison et al., 2007; Lainé et al., 2021; Matheu et al., 2015; Rubtsov et al., 2008; Śledzińska et al., 2020; Vaeth et al., 2011). Ces différents mécanismes sont présentés figure 12.

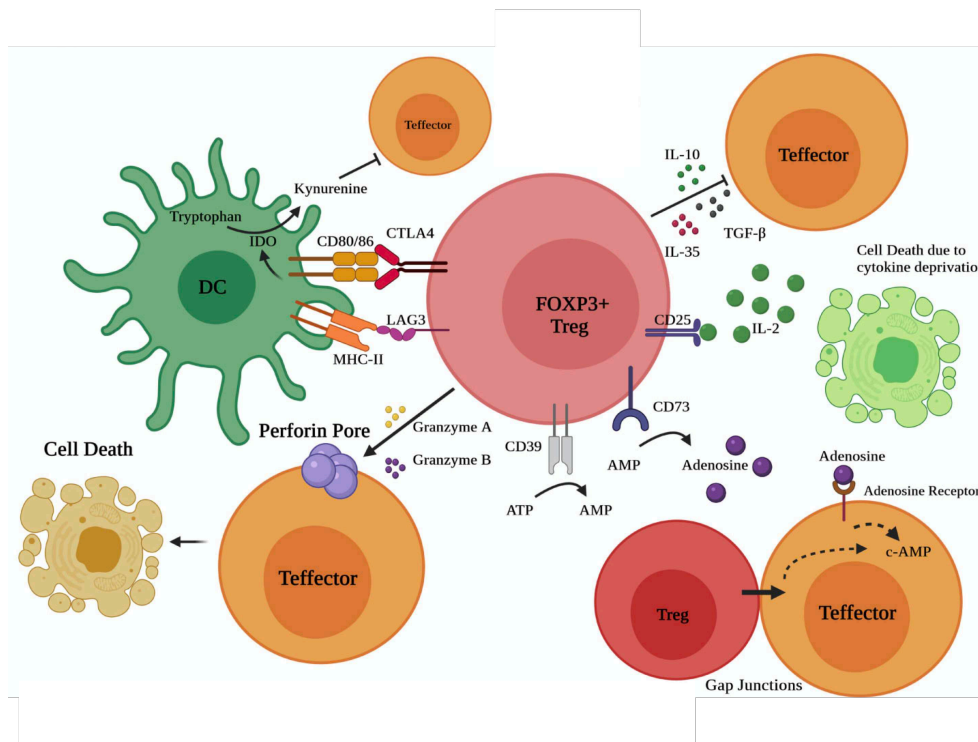


Figure 12 : Schéma des mécanismes suppressifs du lymphocyte T régulateur. D’après (Grover et al., 2021)

#### B.2.2.2. Cellules régulatrices non lymphocytaires

La tolérance n'est pas seulement liée à la composante adaptative du système immunitaire et les mécanismes suppressifs impliquent de nombreux types cellulaires.

Les cellules dendritiques (DC) sont capables de migrer dans tous les tissus de l'organisme, des couches les plus externes des différentes interfaces (peau, poumons, organes digestifs) jusqu'aux organes lymphoïdes pour surveiller et capter la présence d'antigènes. Les DC sont LES cellules présentatrices d'antigènes par excellence et leurs fonctions sont totalement dévolues à cette tâche d'immunosurveillance.

En périphérie, les DCs sont présentes sous une forme immature spécialisée dans la capture d'antigènes par phagocytose et macropinocytose (Sallusto et al., 1995; Swanson and Watts, 1995). Périodiquement, les DCs immatures migrent de la périphérie jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires et présentent une grande variété d'antigènes aux lymphocytes T (Kohli et al., 2016). Ces antigènes rendent compte de l'état du tissu dans lequel ils étaient, mais ne sont absolument pas spécifiques d'un pathogène et une grande partie de ces antigènes sont des auto-antigènes. C'est la maturation des DCs qui influera sur leur capacité à activer les lymphocytes T. Cette maturation est conditionnée à la présence de marqueurs de l'inflammation ainsi que de signaux de danger (Danger Associated Molecular Pattern DAMP) et de signaux de pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern PAMP). En absence de ces signaux, les DCs immatures présentent des auto-antigènes dans un contexte pro-tolérologique en absence de signaux de costimulation menant à l'anergie ou la délétion des lymphocytes T autoréactifs en périphérie, ou encore à l'émergence de lymphocytes T régulateurs selon des mécanismes déjà discutés (Kohli et al., 2016).

Les cellules NK (Natural Killer) sont principalement connues pour leur fonction cytotoxique envers toutes les cellules qui ne présentent pas de CMH du soi. L'action régulatrice des cellules NK CD56<sup>bright</sup> est effectuée par l'élimination directe de macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T activés par la sécrétion de granules cytotoxiques (Jiang et al., 2011). Les mécanismes par lesquels les NK ciblent préférentiellement les cellules autoréactives ne sont encore pas bien compris, mais dépendent de la balance de nombreux signaux activateurs et inhibiteurs.

A l'instar des cellules NK, les granulocytes éosinophiles sont principalement connus pour leur fonction cytotoxique, ils sont notamment impliqués dans l'immunité antiparasitaire et les phénomènes d'allergie. Chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, les granulocytes éosinophiles ont été associés à une meilleure résolution des symptômes et leurs fonctions régulatrices ont récemment été mises en évidence dans des modèles murins de la pathologie (Andreev et al., 2021). Cependant, les mécanismes associés à cette fonction ne sont encore pas totalement décrits mais semblent dépendre de l'IL-5.

### C. Les lymphocytes B régulateurs

Les lymphocytes B sont des acteurs centraux de la réponse effectrice dans différentes situations pathologiques. Par leur capacité à présenter les antigènes aux lymphocytes T, à produire des anticorps et des cytokines, les lymphocytes B sont capables d'initier et de soutenir la réponse immunitaire. Cependant, l'existence d'une population « suppressive » dans le compartiment B a été envisagée dans les années 1970 lorsque plusieurs équipes indépendantes ont montré dans des modèles de cochon d'inde la capacité des lymphocytes B à inhiber des réactions d'hypersensibilité (Katz et al., 1974; Neta and Salvin, 1974) par transfert adoptif de splénocytes déplétés ou non en lymphocytes B. Toutefois, bien qu'ils aient été capables de montrer la fonction suppressive de ces LB, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence les mécanismes sous-jacents à cette activité suppressive. Aujourd'hui, la littérature autour des lymphocytes B suppresseurs puis régulateurs s'est enrichie. Plusieurs équipes ont montré l'existence d'une telle population dans différents modèles animaux, mais aussi dans différents contextes pathologiques chez l'Homme (Braza et al., 2015; Chesneau et al., 2015; Evans et al., 2007; Fillatreau et al., 2002; Sattler et al., 2014; Watanabe et al., 2010). Chaque équipe a donc voulu caractériser cette sous-population de lymphocyte B, trouver des marqueurs phénotypiques permettant de l'identifier au sein des lymphocytes B totaux et mettre en évidence leurs mécanismes régulateurs. Une vaste hétérogénéité transcriptomique, phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B régulateurs en fonction des espèces ou du contexte pathologique a mis le doute sur l'existence d'une population unique, laissant plutôt envisager une certaine plasticité au sein du compartiment B favorisant l'émergence d'une fonction régulatrice à partir de n'importe quelle cellule B en réponse à une stimulation environnementale favorable (Dubois et al., 2020; Rosser and Mauri, 2015; Yang et



al., 2021). L'hétérogénéité et les marqueurs des populations de lymphocytes B sont représenté Figure 13. L'étude transcriptomique de lymphocytes B régulateurs (IL-10+) provenant de différents compartiments (foie, sang, rate, moelle osseuse, cavité péritonéale et ganglions lymphatiques mésoenchymateux) provenant d'un même modèle animal nous montre qu'il est difficile de mettre en avant une signature commune à ces cellules, et que contrairement aux lymphocytes T, il n'y a pas de facteurs de transcription spécifique à cette population (Yang et al., 2021).

La signature immunologique de la tolérance opérationnelle a été fortement associée à une surexpression de marqueurs des lymphocytes B totaux dans le sang (Baron et al., 2015; Brouard et al., 2007a; Danger et al., 2017). Cette signature a été à l'origine de nombreux travaux sur l'étude du rôle des lymphocytes B dans l'induction et la maintenance d'un état de tolérance opérationnelle, et tout particulièrement sur les fonctions régulatrices des lymphocytes B. Dans les prochains paragraphes, nous allons décrire plus précisément les différentes populations de lymphocytes B régulateurs, d'abord sur leur phénotype, puis sur leur fonction, et au rôle qu'ils peuvent avoir dans la tolérance.

#### C.1. Diversité phénotypique des lymphocytes B régulateurs

##### *C.1.1. Lymphocytes B transitionnels*

Les lymphocytes B transitionnels sont un stade intermédiaire que l'on retrouve en périphérie entre les lymphocytes B immatures de la moelle osseuse et les lymphocytes B matures des organes lymphoïdes secondaires. Ils sont caractérisés par leur forte expression de CD24 et CD38. Chez l'homme, des lymphocytes B transitionnels stimulés avec du CD40 sont capables de supprimer la polarisation Th1 (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013), Th17 (Flores-Borja et al., 2013) et d'induire des Tregs (Flores-Borja et al., 2013). L'action suppressive des B transitionnels est partiellement dépendante de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  (Hasan et al., 2019) et de façon intéressante, leur fonction est altérée dans des contextes auto-immuns (respectivement dans le lupus érythémateux disséminé (Blair et al., 2010) et dans l'arthrite rhumatoïde (Flores-Borja et al., 2013)). La présence de cette population de B régulateurs a été corrélée avec une meilleure fonction du transplant et une meilleure survie dans des contextes de greffe rénale (Ibrahim et al., 2021; Latorre et al., 2016) et pulmonaire (Brosseau et al., 2019; Piloni et al., 2019) et peuvent être réduits dans des contextes inflammatoires (Brosseau et al., 2018). Chez

la souris, la tolérance est associée à une augmentation des lymphocytes B transitionnels CD19<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, qui acquièrent une fonction régulatrice en réponse à des signaux spécifiques aux souris greffées (le transfert de cellules issues de souris non greffées n'induit pas la tolérance) mais encore non-définis (Moreau et al., 2015).

### *C.1.2. Lymphocytes B mémoire*

Les lymphocytes B CD24<sup>high</sup> CD27<sup>+</sup> sont générés suite à une primo-activation de lymphocytes B naïfs. En comparaison des lymphocytes B naïfs, leur phénotype leur confère une plus longue durée de vie et une meilleure capacité à s'activer suite à une stimulation antigénique en faisant des acteurs majeurs de la mémoire immunitaire et sont principalement associés aux réponses effectrices. Cependant, lorsque l'on s'intéresse au phénotype des lymphocytes B totaux IL-10<sup>+</sup> fraîchement isolés, une vaste majorité des lymphocytes CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> sont également CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup> et IgD<sup>low</sup> (Iwata et al., 2011) correspondant à cette population mémoire. De même que les B transitionnels régulateurs, les B mémoire régulateurs sécrètent de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$ , mais aussi du TGF- $\beta$  et du Granzyme B (Chesneau et al., 2014; Hasan et al., 2019). L'analyse des populations B dans différents groupes de patients transplantés et de volontaires sains a montré que l'augmentation des lymphocytes B visible chez les patients tolérants est due à une augmentation des lymphocytes B mémoire IgD<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> exprimant des marqueurs de régulation (CD32a/CD32b ratio, BANK1) (Pallier et al., 2010).

### *C.1.3. Plasmablastes*

Les plasmablastes sont générés dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires suite à l'activation de lymphocytes B naïfs ou mémoire. Les plasmablastes sont un état intermédiaire hyperprolifératif avant la différenciation terminale en plasma cells spécialisées dans la production d'anticorps. Matsumoto et al., ont montré que les plasmablastes CD138<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> étaient la principale sous-population de lymphocytes B à produire de l'IL-10 dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Matsumoto et al., 2014). Chez l'homme, l'induction in vitro de la différenciation de lymphocytes B en plasmablastes suite à une stimulation ADN-CpG, IL-2, IL-6 et IFN $\alpha$  permet d'induire l'expression d'IL-10. De façon intéressante, les auteurs ont également montré que les plasmablastes générés à partir de lymphocytes B naïfs ou immatures étaient capables de produire considérablement plus d'IL-10 que les plasmablastes générés à partir de lymphocytes

B mémoire (Matsumoto et al., 2014). En date, aucune étude n'a montré d'implication de plasmablastes régulateurs dans la tolérance opérationnelle.

#### C.1.4. CD1Dhi CD5+

Les lymphocytes CD1DhiCD5+ sont une population de B qu'on retrouve dans la rate et dans le sang périphérique (Yanaba et al., 2008). C'est une population de lymphocytes B non conventionnels. Ces cellules peuvent sécréter de l'IL-10 chez la souris et l'Homme (Yanaba et al., 2008), et le granzyme B chez l'Homme (Hagn et al., 2010). Leur transfert adoptif permet de réduire l'inflammation dans des souris déplétées en lymphocytes B (Yanaba et al., 2008). Dans l'analyse des populations B dans différents groupes de patients transplantés et de volontaires sains, les lymphocytes B CD5+ est la seconde population surexprimée après les lymphocytes B mémoire (Pallier et al., 2010)

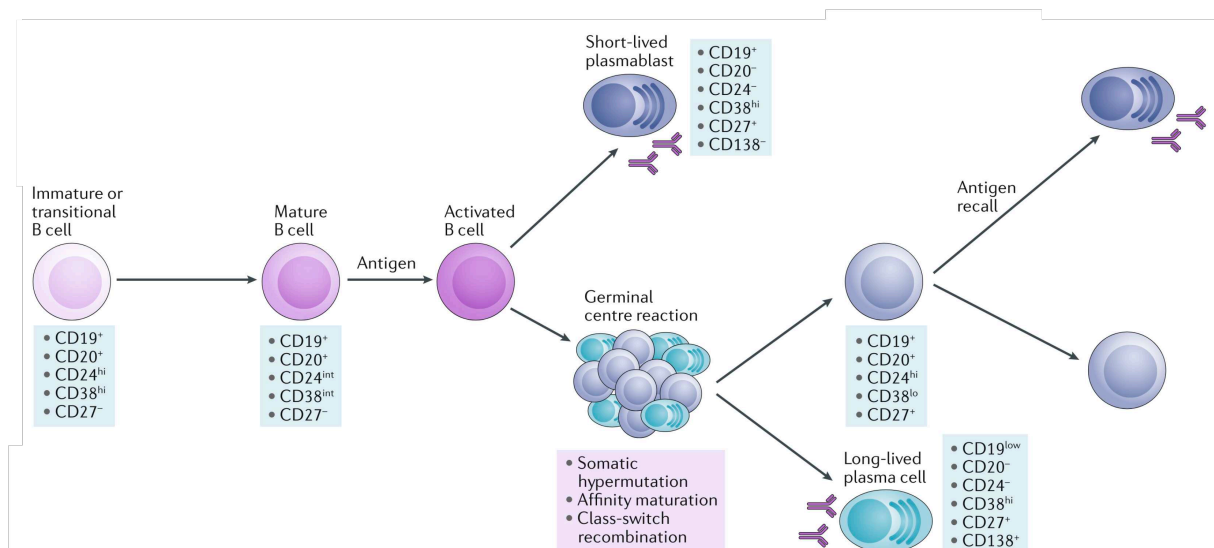


Figure 13 : Marqueurs des populations de lymphocytes B. D'après (Oleinika et al., 2019)

#### C.2. Mécanismes effecteurs du lymphocyte B régulateur

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu de nombreux mécanismes par lesquels ces différentes populations de B pouvaient avoir une action régulatrice. Nous allons ici présenter plus profondément ceux qui ont été décrits chez l'Homme (Figure 14).

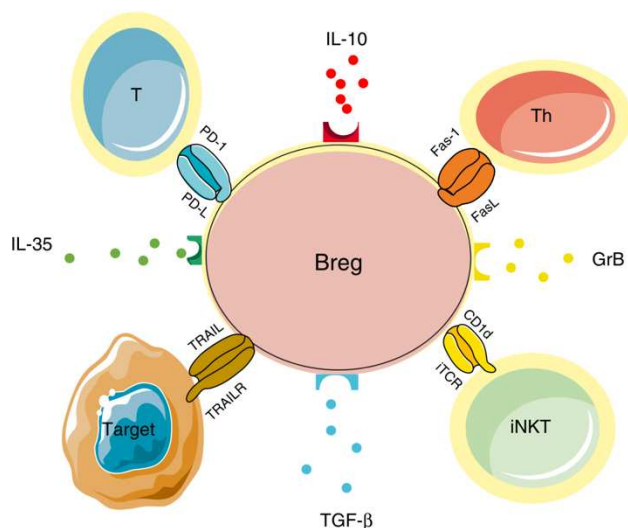


Figure 14 : Représentation des mécanismes suppresseurs du lymphocyte B régulateur. D'après (Li et al., 2019)

### C.2.1. Cytokines

L'IL-10 est le plus cité des mécanismes par lesquels le lymphocyte B régulateur va transmettre sa réponse suppressive. C'est une cytokine homodimérique de 18.6kDa dont la liaison à son récepteur composé des chaînes IL-10R1 et IL-10R2 induit l'activation de JAK1-TYK2 et la phosphorylation de STAT1-STAT3. L'engagement de l'IL-10 sur son récepteur inhibe l'activation des cellules dendritiques responsables de la présentation antigénique, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par de nombreux types cellulaires (Takeda et al., 1999, p. 1) et favorise l'induction de lymphocytes T régulateurs (Chaudhry et al., 2011).

L'IL-35, une autre cytokine régulatrice a aussi montré sa capacité à induire les lymphocytes T régulateurs (Collison et al., 2007) et les lymphocytes B régulateurs (Wang et al., 2014).

Le TNF $\alpha$ , initialement décrit comme une molécule cytotoxique associée aux fonctions effectrices du système immunitaire a aussi montré une action immunosuppressive en induisant la survie des cellules régulatrices (Salomon et al., 2018) via l'expression du TNFR2 (Balkwill, 2009).

Le TGF- $\beta$  est une cytokine sécrétée sous la forme d'un précurseur qui nécessite un clivage par protéolyse (baisse de pH, ROS ou  $\alpha$ V-intégrines) pour se lier à son récepteur, induire l'apoptose et inhiber la prolifération (Akdis et al., 2016).

### C.2.2. *PDL-1*

PDL-1 (Programmed Death Ligand-1) est un ligand de PD-1 (Programmed Death-1). La liaison du ligand sur ce récepteur permet d'inhiber la signalisation TCR (LCK/PI3K/AKT/mTOR) via la protéine SHP2. Ce mécanisme régulateur a été très largement décrit, notamment pour ses utilisations thérapeutiques agonistes (immunosuppressives) et antagonistes (anti-cancéreuses) et est un des mécanismes largement utilisé par les cellules régulatrices pour contenir l'inflammation, et est notamment utilisé par certains lymphocytes B régulateurs (Doi et al., 2012).

### C.2.3. *TIGIT*

TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) a été initialement décrit sur les Tregs et les NK activés. Les ligands de TIGIT (CD155 et CD112) sont fortement exprimés par les monocytes, DC, fibroblastes, cellules endothéliales, plaquettes et lymphocytes activés. TIGIT va mener son activité régulatrice par compétition, car ses deux ligands peuvent aussi se lier aux récepteurs de costimulation CD226 et CD96, associés à l'activation des lymphocytes T. TIGIT va aussi pouvoir induire l'expression d'IL-10 dans les cellules dendritiques CD155<sup>+</sup> (Zhang et al., 2020). Récemment, l'implication de TIGIT a été démontrée dans les mécanismes suppressifs de certains lymphocytes B régulateurs chez l'Homme (Hasan et al., 2021).

### C.2.4. *Granzyme B*

Enfin, le granzyme B est une protéase possédant différents récepteurs membranaires et intracellulaires. Sa spécificité lui est offerte par la présence de 6 acides aminés : His57, Leu172, Phe191, Gln180, Tyr 215 et surtout Arg226 qui vont recruter les substrats pouvant présenter un Asp face à l'Arg226 pour former deux liaisons hydrogènes (Fell et al., 2002; Ruggles et al., 2004; Waugh et al., 2000). Le rôle du granzyme B diffère en fonction des récepteurs qu'il va lier. Son effet le mieux décrit est sa capacité à induire l'apoptose (Jenne and Tschopp, 1988) par son action conjointe avec la perforine qui crée des pores de quelques nanomètres dans la membrane de la cellule cible permettant au granzyme B de trouver ses cibles intracellulaires. Le granzyme B peut être internalisé dans les cellules cibles via un mécanisme indépendant de la perforine. En effet, le groupe de Trapani a montré dans un modèle murin que bloquer le récepteur du Manose-6-phosphate réduisait l'entrée du granzyme B (Trapani et al., 2003). Il a aussi été montré que l'ajout de perforine ne permettait pas d'augmenter le niveau de granzyme B intracellulaire (Shi et al., 1997). Cependant, en absence de perforine, le granzyme

B internalisé ne peut induire d'apoptose (Shi et al., 1997) et il est possible que la perforine ne permette non pas d'accéder au compartiment intracellulaire, mais directement aux cibles séquestrées dans le noyau ou la mitochondrie. Parmi ces cibles, on trouve la caspase 3 dont le clivage est un inducteur direct de l'apoptose, mais aussi d'autres protéines pro-apoptotiques, BID (Waterhouse et al., 2005) (BH3-interacting domain death agonist) qui permet le relargage du cytochrome C mitochondrial (Gross et al., 1999) pour former l'apoptosome (Garrido et al., 2006) et ICAD (inhibitor of caspase activated DNase) dont le nom est évocateur de sa fonction (Enari et al., 1998).

Cependant, on ne peut pas réduire le granzyme B à ses mécanismes intracellulaires pro-apoptotiques. Le granzyme B peut être produit et sécrété par de nombreuses cellules en absence de perforine. Les premières études sur le sujet montrent que le granzyme B peut être produit en absence de perforine par les lymphocytes B régulateurs, mais différentes études ont aussi montré une expression conjointe de granzyme B et de perforine par les lymphocytes B régulateurs (de Andrés et al., 2014; Hagn et al., 2010). Ce granzyme B extracellulaire va trouver et cliver d'autres cibles plus diverses : des cytokines sécrétées sous la forme de précurseurs (IL-18, IL-1a) (Akeda et al., 2014), le système du complément (C3, C5) (Perl et al., 2012), des protéines constitutives de la matrice extracellulaire (fibronectin, vitronectin, collagen IV), des protéines de liaison (e-cadherin, filaggrin) et enfin, des facteurs de coagulation (von Willebrand factor) (Akeda et al., 2014; Buzza et al., 2008; Hiebert et al., 2013; Hollestelle et al., 2011; Jensen et al., 2020; Perl et al., 2012; Turner et al., 2021). A travers toutes ces cibles, le granzyme B a donc une/des fonction(s) immunomodulatrice(s) multifactorielle en agissant sur la communication cellulaire et la capacité migratoire des cellules effectrices (Gondek et al., 2005).

#### D. Fonction et phénotype des lymphocytes B régulateurs exprimant le Granzyme B

Comme nous l'avons énoncé au paragraphe II-A, les lymphocytes B régulateurs ont une diversité phénotypique et fonctionnelle importante. Dans une méta-analyse de données transcriptomiques générées à partir de lymphocytes B régulateurs induits ou enrichis in vitro chez l'homme et chez la souris, nous avons montré que les deux signatures de lymphocytes B régulateurs humains et murins ne présentent que très peu de correspondances suggérant des mécanismes différents. De plus, l'intégration des données humaines a mené à la génération d'une signature réduite aux gènes dont la différence est homogène dans toutes

les bases de données, et à la perte de gènes d'intérêt comme l'IL-10 ou le CD9, fortement associés à la fonction de ces cellules régulatrices, mais dont l'expression était opposée entre les datasets (Dubois et al., 2020). Il est donc très hasardeux de vouloir caractériser une population au travers du phénotype et de la fonction d'une population voisine ou hétérogène. Dans ce chapitre, nous nous efforcerons de décrire les caractéristiques des lymphocytes B régulateurs qui expriment le granzyme B.

C'est le groupe de Bernd Jahrsdörfer qui, en 2006, a le premier mis en évidence la capacité de certains lymphocytes B à produire du granzyme B chez des patients atteints de leucémie lymphoblastique B chronique (Jahrsdörfer et al., 2006). Très vite, il a été montré que ces cellules étaient dotées d'une fonction suppressive dépendante du granzyme B (Lindner et al., 2013), et qu'en coculture, le granzyme B était internalisé dans des lymphocytes T CD4+ et qu'il induisait la dégradation de la chaîne zeta du TCR (Lindner et al., 2013), qui, conjointement avec les chaînes du CD3, est responsable de la transduction du signal antigénique.

Le granzyme B est une molécule intracellulaire et le seul marqueur connu de cette population. De ce fait, il ne permet pas d'isoler des cellules viables pour des études fonctionnelles. Leur exploration fonctionnelle ne se limite dans un premier temps qu'à des corrélations entre activité suppressive et proportion de ces Bregs dans la fraction B totale. La compréhension de ces cellules est passée par l'élaboration de cocktails de stimulation permettant d'induire la sécrétion de granzyme B en parallèle d'un phénotype régulateur à partir des B totaux. Une des spécificités de ce phénotype est sa dépendance à l'IL-21, cytokine de la famille de l'IL-2 surrégulée dans différents contextes inflammatoires dans lesquels on retrouve une surexpression de lymphocytes B exprimant le granzyme B (Syndrome de Sjögren primitif, Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, syndrome du VIH, lymphome diffus à grandes cellules B, Lupus systémique érythémateux, maladie de Chagas, mononucléose, périodontite, et en transplantation rénale) (Chesneau et al., 2015; Cupi et al., 2014; Fares et al., 2013; Hagn et al., 2015, 2010; Kaltenmeier et al., 2015; Mahanonda et al., 2016; Papp et al., 2016; Tabanelli et al., 2017; Zhu et al., 2017). Toutefois, on retrouve moins de 2% de cellules B GZMB+ dans le sang de volontaires sains, et seulement 15% des lymphocytes B expriment le granzyme B après stimulation TLR9/IL-21. Leur expansion optimale a donc été centrale pour leur caractérisation. Le protocole que nous utilisons aujourd'hui reprend les bases posées par Jahrsdörfer, à savoir une stimulation TLR9 en présence d'IL-21, auxquelles nous ajoutons simultanément de l'IL-2, une stimulation du BCR et du CD40 permettant

d'induire l'expression du granzyme B dans plus de 90% des lymphocytes B dans des situations pathologiques, mais aussi chez le volontaire sain (Chesneau et al., 2021, 2020). Ce cocktail de stimulation a été décrit comme optimal pour l'obtention d'une population pure (>90%) de lymphocytes B régulateurs (en termes d'expression du granzyme B) et la majorité des études fonctionnelles sur les lymphocytes B régulateurs se font aujourd'hui sur des cellules induites in vitro.

Un second frein à la caractérisation de ces cellules est leur grande disparité entre les espèces. Cette population n'est pas spécifique à l'Homme puisqu'elle peut être retrouvée chez le rat (Durand et al., 2015) ou encore le macaque (Kotb et al., 2017; Pallikkuth et al., 2011) dans des proportions moindres et avec une activité indépendante du granzyme B. Cependant la présence de lymphocytes B exprimant le granzyme B est discutée chez d'autres espèces, dont notamment la plus fréquemment utilisée dans les études in vivo : la souris. Suite à des stimulations dépendantes de l'IL-21 et du LPS, les lymphocytes B murins ne semblent pas produire de granzyme B (Hagn et al., 2012, Sailliet et al., In preparation). En revanche, l'équipe de Derrick a montré qu'une infection par *plasmodium yoelli* 17X NL induisait 19% de lymphocytes B GZMB+ avec une forte corrélation entre le CD73, l'IgM et le granzyme B sans toutefois avoir regardé le rôle du granzyme B dans la fonction régulatrice de ces cellules (Parra et al., 2020). De façon intéressante, même chez l'Homme en caractérisant ces cellules par une fonction régulatrice, un même marqueur, et des stimulations proches, de nombreux résultats divergent. Notamment sur les mécanismes régulateurs du granzyme B : Le groupe de Jahrsdörfer a montré une fonction indépendante de la perforine et des cibles intracellulaires induisant l'apoptose, tandis que nous avons montré que la production de granzyme B était accompagnée de perforine, et que les lymphocytes B régulateurs étaient capables d'activer les voies de l'apoptose dans les cellules cibles, mais pas de dégrader les chaînes zeta du TCR. Il semble donc que cet unique marqueur n'est pas suffisant pour obtenir une population homogène. Il est donc difficile de transposer les études faites entre deux modèles dont on sait que les mécanismes sont différents, c'est pourquoi la majorité des études actuelles sur les lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B ne sont pas transposables d'un modèle à l'autre.

Comme nous l'avons vu, de nombreux phénotypes régulateurs ont été décrits pour les lymphocytes B. Il en va de même pour ceux qui expriment le granzyme B. En 2009, Jahrsdörfer montre que les lymphocytes B naïfs (CD27+) sont plus aptes à exprimer le granzyme B après



une stimulation BCR + IL-21 que les lymphocytes B mémoire (CD27-) et qu'après stimulation, il y avait un enrichissement en cellules CD27- CD38-, mais que ce phénotype de cellules naïves était associé à une incapacité à produire de l'IgD et qu'elles surexprimaient des molécules d'activation (CD69+), d'adhésion (CD54+) et, de façon contradictoire, des molécules de costimulation (CD86+) (Hagn et al., 2009). Ce phénotype a plus tard été enrichi par l'analyse d'autres immunoglobulines, notamment les IgG, qui sont produites par les lymphocytes B exprimant le granzyme B (Bulati et al., 2014). Les IgG sont normalement produites par les lymphocytes B mémoires ayant effectué une commutation isotypique. Cette nouvelle caractérisation classe ces B régulateurs dans une catégorie particulière de cellules mémoires : les doubles négatives (CD19+IgG+CD27-IgD-). Ces cellules doubles négatives sont augmentées chez des patients atteints de SLE ou infectés par le VIH, RSV (Cagigi et al., 2009; Fecteau et al., 2006; Huggins et al., 2007; Wei et al., 2007), mais aussi corrélées avec l'âge où les susceptibilités infectieuses sont plus importantes (Colonna-Romano et al., 2009). A l'inverse, lorsqu'elle est stimulée par le TLR9 uniquement, la population GZMB+ a un phénotype mémoire plus conventionnel (CD19+CD27+IgD-) (Hasan et al., 2021). Et lorsqu'elle est stimulée avec le cocktail permettant son expansion maximale (stimulation BCR, TLR9, CD40 en présence d'IL-21 et IL-2), on retrouve cette population GZMB+ dans toutes les populations de lymphocytes B (naïves (CD24-CD38-), mémoires (CD24+CD38-), transitionnelles (CD24+CD38+), et plasmablastes (CD24-CD38+)) avec la plus forte expression en GZMB par les plasmablastes (Chesneau et al., 2020). De plus on retrouve la sous-expression d'IgD par les cellules GZMB+ ainsi qu'une surexpression d'IgM mais pas d'IgG (contrairement aux cellules stimulées via le TLR9 uniquement). On retrouve une distribution similaire dans une cohorte pédiatrique de patients atteints de Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Schnell et al., 2021).

Ainsi on se rend bien compte qu'il y a un impact non négligeable de la stimulation sur ces cellules, notamment par le CD40L qui induit une différenciation puissante en plasmablastes. Il faut donc absolument prendre en compte ces éléments de stimulation, et en particulier ceux qui ne sont pas spécifiques à l'émergence de lymphocytes B régulateurs, soit 4 ligands sur les 5 présents dans ce dernier cocktail.

Hormis leur fonction régulatrice, certaines autres particularités ont été mises en avant pour les lymphocytes B exprimant le granzyme B.

Ces cellules sont aussi plus sensibles à l'apoptose (Chesneau et al., 2020), ce qui laisse supposer que ces lymphocytes B ne représentent qu'un état transient dû à une autorégulation une fois le processus inflammatoire résorbé, et explique leur faible proportion en périphérie. Toutefois, des études transcriptionnelles ont montré une diminution de l'expression de BANK1 sur les lymphocytes B régulateurs GZMB<sup>+</sup> (Dubois et al., 2020). Suite à la signalisation BCR, BANK1 se lie à la kinase lymphoïde B (BLK) pour interagir avec PLC $\gamma$ 2. Ce complexe permet de cliver PIP3 en DAG + IP3. Ce dernier induit le relargage de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et déclenche l'apoptose de la cellule (Le Berre et al., 2021). Nous avons donc proposé un modèle dans lequel l'apoptose n'est pas induite par cette signalisation BCR, mais par les molécules FAS ou TNFR (Le Berre et al., 2021).

#### E. Apport des lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B dans la tolérance opérationnelle et objectifs du travail de thèse

La tolérance opérationnelle est un phénomène rare et mal compris. Dans notre équipe, nous avons montré que dans une cohorte de patients transplantés du rein, les patients en tolérance opérationnelle présentaient une forte signature de marqueurs de lymphocytes B (CD79a, CD79b, RPS5, CD22, CD19, CD20, BCNP1) au niveau sanguin (Brouard et al., 2007b). Cette signature transcriptomique est également associée à une fréquence plus importante de lymphocytes B totaux et à un enrichissement en lymphocytes B qui expriment le granzyme B (Chesneau et al., 2015; Pallier et al., 2010). Nous avons relié cette dernière population à une fonction régulatrice par la corrélation entre le pourcentage initial de cellules B exprimant le granzyme B dans le sang et la capacité des lymphocytes B totaux du sang à inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (p<0.05) (Chesneau et al., 2015). De plus, le transfert adoptif de cette population de lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> dans un modèle de rat de transplantation cardiaque permet de maintenir une fonction stable sans développement d'immunité contre le greffon pendant plus de 100 jours après la greffe en absence de traitements. Cet état de tolérance a été associé à la migration des lymphocytes B injectés vers la greffe (Durand et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc l'importance de ce compartiment de lymphocytes B GZMB<sup>+</sup> dans le processus de tolérance. De façon intéressante, nous avons montré les lymphocytes B des patients tolérants sont capables d'induire la production d'IL-21 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, alors que les lymphocytes T de patients stables et de volontaires sains ne produisaient significativement pas plus d'IL-21 en présence de lymphocytes B, avec

même une tendance à la baisse (Chesneau et al., 2015). Cela signifie qu'au-delà de réduire la prolifération des lymphocytes T, les lymphocytes B de patients tolérants, enrichis en cellules régulatrices GZMB<sup>+</sup> vont agir sur les lymphocytes T pour induire cette expression d'IL-21, nécessaire à la génération de ces lymphocytes B régulateurs dans toutes les études in vitro (Chesneau et al., 2021; Jahrsdörfer et al., 2006; Kaltenmeier et al., 2015; Lindner et al., 2013; Pallikkuth et al., 2011; Papp et al., 2016). Cependant, cette induction d'IL-21 par les lymphocytes B régulateurs est un mécanisme encore mal compris. Une partie du travail de cette thèse a été de mieux caractériser les interactions entre le lymphocyte B régulateur exprimant le granzyme B et le lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. Ces résultats sont décrits dans la partie III-C des résultats de ce manuscrit.

## Références

- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R.A., Cramer, R., Duan, S., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna, P., Kovacs, N., Kucuksezer, U.C., Meyer, N., Morita, H., Olzhausen, J., O'Mahony, L., Pezer, M., Prati, M., Rebane, A., Rhyner, C., Rinaldi, A., Sokolowska, M., Stanic, B., Sugita, K., Treis, A., van de Veen, W., Wanke, K., Wawrzyniak, M., Wawrzyniak, P., Wirz, O.F., Zakzuk, J.S., Akdis, C.A., 2016. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138, 984–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>
- Akeda, T., Yamanaka, K., Tsuda, K., Omoto, Y., Gabazza, E.C., Mizutani, H., 2014. CD8+ T cell granzyme B activates keratinocyte endogenous IL-18. *Arch Dermatol Res* 306, 125–130. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1382-1>
- Allison, A., 2005. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 14, 2–8. <https://doi.org/10.1191/0961203305LU2109OA>
- Andreev, D., Liu, M., Kachler, K., Llerins Perez, M., Kirchner, P., Kölle, J., Gießl, A., Rauber, S., Song, R., Aust, O., Grüneboom, A., Kleyer, A., Cañete, J.D., Ekici, A., Ramming, A., Finotto, S., Schett, G., Bozec, A., 2021. Regulatory eosinophils induce the resolution of experimental arthritis and appear in remission state of human rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 80, 451–468. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218902>
- Anglicheau, D., Tinel, C., Canaud, G., Loupy, A., Zuber, J., Delville, M., Rabaté, C., Scemla, A., Snanoudj, R., Sberro-Soussan, R., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bererhi, L., Martinez, F., Timsit, M.-O., Rabant, M., Correas, J.-M., Bienaimé, F., Duong, J.-P., Hélénon, O., Prié, D., Méjean, A., Legendre, C., 2019. Transplantation rénale : réalisation et suivi précoce. *Néphrologie & Thérapeutique* 15, 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2019.09.001>
- Anstey, A.V., Wakelin, S., Reynolds, N.J., 2004. Guidelines for prescribing azathioprine in dermatology. *Br J Dermatol* 151, 1123–1132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06323.x>
- Arasu, R., Jegatheesan, D., Sivakumaran, Y., 2022. Overview of hemodialysis access and assessment. *Can Fam Physician* 68, 577–582. <https://doi.org/10.46747/cfp.6808577>
- Augustine, J., 2018. Kidney transplant: New opportunities and challenges. *CCJM* 85, 138–144. <https://doi.org/10.3949/ccjm.85gr.18001>
- Baggiolini, M., 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–572. <https://doi.org/10.1038/33340>
- Balkwill, F., 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361–371. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>
- Baron, D., Ramstein, G., Chesneau, M., Echassierau, Y., Pallier, A., Paul, C., Degauque, N.,

- Hernandez-Fuentes, M.P., Sanchez-Fueyo, A., Newell, K.A., Giral, M., Soullillou, J.-P., Houlgatte, R., Brouard, S., 2015. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney International* 87, 984–995. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.395>
- Bauché, D., Joyce-Shaikh, B., Jain, R., Grein, J., Ku, K.S., Blumenschein, W.M., Ganal-Vonarburg, S.C., Wilson, D.C., McClanahan, T.K., Malefyt, R. de W., Macpherson, A.J., Annamalai, L., Yearley, J.H., Cua, D.J., 2018. LAG3+ Regulatory T Cells Restrain Interleukin-23-Producing CX3CR1+ Gut-Resident Macrophages during Group 3 Innate Lymphoid Cell-Driven Colitis. *Immunity* 49, 342-352.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.007>
- Beato, M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90237-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90237-7)
- Billingham, R.E., Medawar, P.B., 1953. “DESENSITIZATION” TO SKIN HOMOGRAFTS BY INJECTIONS OF DONOR SKIN EXTRACTS: *Annals of Surgery* 137, 444–449. <https://doi.org/10.1097/00000658-195304000-00002>
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2010. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Boratyńska, M., Wątorek, E., Smolska, D., Patrzalek, D., Klinger, M., 2007. Anticancer Effect of Sirolimus in Renal Allograft Recipients With De Novo Malignancies. *Transplantation Proceedings* 39, 2736–2739. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.08.078>
- Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.-K., Harbertson, J., Krahl, T., Patstone, G., Woolf, N., Campbell, I.L., Sarvetnick, N., 1999. Islet-Specific Th1, But Not Th2, Cells Secrete Multiple Chemokines and Promote Rapid Induction of Autoimmune Diabetes. *J. Immunol.* 162, 2511.
- Braza, F., Chesne, J., Durand, M., Dirou, S., Brosseau, C., Mahay, G., Cheminant, M.A., Magnan, A., Brouard, S., 2015. A regulatory CD9<sup>+</sup> B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* 70, 1421–1431. <https://doi.org/10.1111/all.12697>
- Brosseau, C., Danger, R., Durand, M., Durand, E., Foureau, A., Lacoste, P., Tissot, A., Roux, A., Reynaud-Gaubert, M., Kessler, R., Mussot, S., Dromer, C., Brugière, O., Mornex, J.F., Guillemain, R., Claustre, J., Magnan, A., Brouard, S., 2019. Blood CD9+ B cell, a biomarker of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation* 19, 3162–3175. <https://doi.org/10.1111/ajt.15532>
- Brosseau, C., Durand, M., Colas, L., Durand, E., Foureau, A., Cheminant, M.A., Bouchaud, G., Castan, L., Klein, M., Magnan, A., Brouard, S., 2018. CD9+ Regulatory B cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and are Reduced in Severe Asthmatic Patients. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03034>
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-

- Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., Dupont, A., Pallier, A., Moreau, A., Louis, S., Ruiz, C., Salvatierra, O., Souillou, J.-P., Sarwal, M., 2007a. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15448–15453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705834104>
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., Dupont, A., Pallier, A., Moreau, A., Louis, S., Ruiz, C., Salvatierra, O., Souillou, J.-P., Sarwal, M., 2007b. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15448–15453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705834104>
- Bulati, M., Buffa, S., Martorana, A., Candore, G., Lio, D., Caruso, C., Colonna-Romano, G., 2014. Trafficking phenotype and production of granzyme B by double negative B cells (IgG+IgD-CD27-) in the elderly. *Experimental Gerontology* 54, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.12.011>
- Buzza, M.S., Dyson, J.M., Choi, H., Gardiner, E.E., Andrews, R.K., Kaiserman, D., Mitchell, C.A., Berndt, M.C., Dong, J.-F., Bird, P.I., 2008. Antihemostatic Activity of Human Granzyme B Mediated by Cleavage of von Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry* 283, 22498–22504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709080200>
- Cagigi, A., Du, L., Dang, L.V.P., Grutzmeier, S., Atlas, A., Chiodi, F., Pan-Hammarström, Q., Nilsson, A., 2009. CD27- B-Cells Produce Class Switched and Somatic Hyper-Mutated Antibodies during Chronic HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 4, e5427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005427>
- Cambier, J.C., Getahun, A., 2010. B cell activation versus anergy; the antigen receptor as a molecular switch. *Immunology Letters* 128, 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.09.006>
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnicka-Worms, D.R., Ley, T.J., 2007. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* 27, 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.014>
- Casellas, R., Shih, T.-A.Y., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C., 2001. Contribution of Receptor Editing to the Antibody Repertoire. *Science* 291, 1541–1544. <https://doi.org/10.1126/science.1056600>
- Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.-M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Brünig, J.C., Müller, W., Rudensky, A.Y., 2011. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 34, 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
- Chesneau, M., Brouard, S., Mai, H.L., 2021. New Method for the Expansion of Highly Purified Human Regulatory Granzyme B-Expressing B Cells, in: Mion, F., Tonon, S. (Eds.), *Regulatory B Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer

US, New York, NY, pp. 203–216. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1237-8>

- Chesneau, M., Mai, H.L., Danger, R., Le Bot, S., Nguyen, T.-V.-H., Bernard, J., Poullaouec, C., Guerrif, P., Conchon, S., Giral, M., Charreau, B., Degauque, N., Brouard, S., 2020. Efficient Expansion of Human Granzyme B–Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties. *J.I. ji2000335*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000335>
- Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A., Souillou, J.-P., Giral, M., Degauque, N., Chiffolleau, E., Brouard, S., 2015. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J Am Soc Nephrol* 26, 2588–2598. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040404>
- Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Gallou, S.L., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., Néel, A., Michel, L., Laplaud, D.-A., Degauque, N., Souillou, J.-P., Tarte, K., Brouard, S., 2014. Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients. *American Journal of Transplantation* 14, 144–155. <https://doi.org/10.1111/ajt.12508>
- Cheung, C.Y., Ma, M.K.M., Chak, W.L., Chau, K.F., Tang, S.C.W., 2017. Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplant recipients with de novo cancers. *Oncotarget* 8, 44833–44841. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14908>
- Clipstone, N.A., Crabtree, G.R., 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T.lymphocyte activation 357, 3.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A.A., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
- Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Pellicanò, M., Vitello, S., Lio, D., Candore, G., Caruso, C., 2009. A double-negative (IgD–CD27–) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mechanisms of Ageing and Development* 130, 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.08.003>
- Cooper, D.K.C., Hara, H., Iwase, H., Yamamoto, T., Wang, Z., Jagdale, A., Bikhet, M.H., Nguyen, H.Q., Foote, J.B., Paris, W.D., Ayares, D., Kumar, V., Anderson, D.J., Locke, J.E., Eckhoff, D.E., 2021. Pig kidney xenotransplantation: Progress toward clinical trials. *Clin Transplant* 35. <https://doi.org/10.1111/ctr.14139>
- Croft, M., Duncan, D.D., Swain, S.L., 1992. Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *Journal of Experimental Medicine* 176, 1431–1437. <https://doi.org/10.1084/jem.176.5.1431>
- Croxtall, J.D., Choudhury, Q., Flower, R.J., 2000. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism: Rapid effects of glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology* 130, 289–298. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703272>

- Cupi, M.L., Sarra, M., Marafini, I., Monteleone, I., Franzè, E., Ortenzi, A., Colantoni, A., Sica, G., Sileri, P., Rosado, M.M., Carsetti, R., MacDonald, T.T., Pallone, F., Monteleone, G., 2014. Plasma Cells in the Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease Produce Granzyme B and Possess Cytotoxic Activities. *J.I.* 192, 6083–6091. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302238>
- Danger, R., Chesneau, M., Paul, C., Guérif, P., Durand, M., Newell, K.A., Kanaparthi, S., Turka, L.A., Soulillou, J.-P., Houlgatte, R., Giral, M., Ramstein, G., Brouard, S., 2017. A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney International* 91, 1473–1481. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.020>
- de Andrés, C., Tejera-Alhambra, M., Alonso, B., Valor, L., Teijeiro, R., Ramos-Medina, R., Mateos, D., Faure, F., Sánchez-Ramón, S., 2014. New regulatory CD19+CD25+ B-cell subset in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* 270, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.003>
- de Leur, K., Dor, F.J.M.F., Dieterich, M., van der Laan, L.J.W., Hendriks, R.W., Baan, C.C., 2017. IL-21 Receptor Antagonist Inhibits Differentiation of B Cells toward Plasmablasts upon Alloantigen Stimulation. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00306>
- Delarue, M., Boulé, J.B., Lescar, J., Expert-Bezançon, N., Jourdan, N., Sukumar, N., Rougeon, F., Papanicolaou, C., 2002. Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *The EMBO Journal* 21, 427–439. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.427>
- Dintzis, R.Z., Okajima, M., Middleton, M.H., Dintzis, H.M., 1990. Inhibition of antibody formation by receptor cross-linking: the molecular characteristics of inhibitory haptenated polymers. *Eur. J. Immunol.* 20, 229–232. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200133>
- Divard, G., Goutaudier, V., 2021. Global Perspective on Kidney Transplantation: France. *Kidney360* 2, 1637–1640. <https://doi.org/10.34067/KID.0002402021>
- Doi, T., Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Jun, L., Ono, Y., Hayashi, A., Hibi, T., 2012. IgA plasma cells express the negative regulatory co-stimulatory molecule programmed cell death 1 ligand and have a potential tolerogenic role in the intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425, 918–923. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.010>
- Dubois, F., Limou, S., Chesneau, M., Degauque, N., Brouard, S., Danger, R., 2020. Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells. *Eur J Immunol* 50, 1757–1769. <https://doi.org/10.1002/eji.201948489>
- Durand, J., Huchet, V., Merieau, E., Usal, C., Chesneau, M., Remy, S., Heslan, M., Anegon, I., Cuturi, M.-C., Brouard, S., Chiffolleau, E., 2015. Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in



Rodents. *J.I.* 195, 5035–5044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500429>

- Eldershaw, S.A., Sansom, D.M., Narendran, P., 2011. Expression and function of the autoimmune regulator (Aire) gene in non-thymic tissue. *Clinical and Experimental Immunology* 163, 296–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04316.x>
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2007. Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis. *J Immunol* 178, 7868–7878. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7868>
- Fares, R.C.G., Correa-Oliveira, R., de Araújo, F.F., Keesen, T.S.L., Chaves, A.T., Fiuza, J.A., Ferreira, K.S., Rocha, M.O.C., Gomes, J.A.S., 2013. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. *Parasite Immunol* 35, 214–223. <https://doi.org/10.1111/pim.12038>
- Fecteau, J.F., Côté, G., Néron, S., 2006. A New Memory CD27<sup>-</sup> IgG<sup>+</sup> B Cell Population in Peripheral Blood Expressing V<sub>H</sub> Genes with Low Frequency of Somatic Mutation. *J Immunol* 177, 3728–3736. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3728>
- Fell, B., Smith, A.M., Hill, R.M., Parmar, P.K., Coates, L.C., Mezey, E., Birch, N.P., 2002. Characterisation of Two Serine Protease Inhibitors Expressed in the Pituitary Gland. *Archives of Physiology and Biochemistry* 110, 26–33. <https://doi.org/10.1076/apab.110.1.26.909>
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3, 944–950. <https://doi.org/10.1038/ni833>
- Fink, P., Bevan, M., 1978. H-2 antigens of the thymus determinelymphocyte specificity. *Journal of Experimental Medicine* 148, 766–775. <https://doi.org/10.1084/jem.148.3.766>
- Flavio, V., Robert, K., Susan, L., Ginny, B., Mark, P., Philip, H., John, N., Alan, W., Henrik, E., Robert, G., Lars, B., James, B., 1998. Interleukin-2–Receptor Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation. *The New England Journal of Medicine* 5.
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., Mauri, C., 2013. CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting T<sub>H</sub> 1 and T<sub>H</sub> 17 Differentiation. *Sci. Transl. Med.* 5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G., 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>

- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J., 2005. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol* 174, 1783–1786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1783>
- Goodnow, C.C., Cyster, J.G., Hartley, S.B., Bell, S.E., Cooke, M.P., Healy, J.I., Akkaraju, S., Rathmell, J.C., Pogue, S.L., Shokat, K.P., 1995. Self-Tolerance Checkpoints in B Lymphocyte Development, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 279–368. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60633-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60633-1)
- Grad, I., Picard, D., 2007. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.018>
- Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R., Joëls, M., 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.020>
- Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J., 1999. Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *Journal of Biological Chemistry* 274, 1156–1163. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.1156>
- Grover, P., Goel, P.N., Greene, M.I., 2021. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front. Immunol.* 12, 750542. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750542>
- Grüniger, P.K., Uhl, F., Herzog, H., Gentile, G., Andrade-Martinez, M., Schmidt, T., Han, K., Morgens, D.W., Bassik, M.C., Cleary, M.L., Gorka, O., Zeiser, R., Groß, O., Duque-Afonso, J., 2022. Functional characterization of the PI3K/AKT/MTOR signaling pathway for targeted therapy in B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Gene Ther* 29, 1751–1760. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00491-0>
- Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C., Roufosse, C., Glotz, D., Seron, D., Nankivell, B.J., Halloran, P.F., Colvin, R.B., Akalin, E., Alachkar, N., Bagnasco, S., Bouatou, Y., Becker, J.U., Cornell, L.D., Duong van Huyen, J.P., Gibson, I.W., Kraus, E.S., Mannon, R.B., Naesens, M., Nickleit, V., Nickerson, P., Segev, D.L., Singh, H.K., Stegall, M., Randhawa, P., Racusen, L., Solez, K., Mengel, M., 2018. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* 18, 293–307. <https://doi.org/10.1111/ajt.14625>
- Hagn, M., Belz, G.T., Kallies, A., Sutton, V.R., Thia, K.Y., Tarlinton, D.M., Hawkins, E.D., Trapani, J.A., 2012. Activated Mouse B Cells Lack Expression of Granzyme B. *J.I.* 188, 3886–3892. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103285>
- Hagn, M., Ebel, V., Sontheimer, K., Schwesinger, E., Lunov, O., Beyer, T., Fabricius, D., Barth, T.F.E., Viardot, A., Stilgenbauer, S., Hepp, J., Scharffetter-Kochanek, K., Simmet, T.,

- Jahrsdörfer, B., 2010. CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 40, 2060–2069. <https://doi.org/10.1002/eji.200940113>
- Hagn, M., Panikkar, A., Smith, C., Balfour Jr, H.H., Khanna, R., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., 2015. B cell-derived circulating granzyme B is a feature of acute infectious mononucleosis. *Clin Trans Immunol* 4, e38. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.10>
- Hagn, M., Schwesinger, E., Ebel, V., Sontheimer, K., Maier, J., Beyer, T., Syrovets, T., Laumonier, Y., Fabricius, D., Simmet, T., Jahrsdörfer, B., 2009. Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *J Immunol* 183, 1838–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901066>
- Halloran, P.F., 2004. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine* 351, 2715–2729. <https://doi.org/10.1056/NEJMra033540>
- Halloran, P.F., Madill-Thomsen, K.S., Pon, S., Sikosana, M.L.N., Böhmig, G.A., Bromberg, J., Einecke, G., Eskandary, F., Gupta, G., Hidalgo, L.G., Myslak, M., Viklicky, O., Perkowska-Ptasinska, A., 2022. Molecular diagnosis of ABMR with or without donor-specific antibody in kidney transplant biopsies: Differences in timing and intensity but similar mechanisms and outcomes. *American Journal of Transplantation* 22, 1976–1991. <https://doi.org/10.1111/ajt.17092>
- Hasan, M.M., Nair, S.S., O’Leary, J.G., Thompson-Snipes, L., Nyarige, V., Wang, J., Park, W., Stegall, M., Heilman, R., Klintmalm, G.B., Joo, H., Oh, S., 2021. Implication of TIGIT+ human memory B cells in immune regulation. *Nat Commun* 12, 1534. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21413-y>
- Hasan, M.M., Thompson-Snipes, L., Klintmalm, G., Demetris, A.J., O’Leary, J., Oh, S., Joo, H., 2019. CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> and CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics. *J.I.* 203, 2110–2120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900488>
- Hiebert, P.R., Wu, D., Granville, D.J., 2013. Granzyme B degrades extracellular matrix and contributes to delayed wound closure in apolipoprotein E knockout mice. *Cell Death Differ* 20, 1404–1414. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.96>
- Hill, P., Cross, N.B., Barnett, A.N.R., Palmer, S.C., Webster, A.C., 2017. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004759.pub2>
- Hogan, P.G., 2017. Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell Calcium* 63, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.014>
- Hogquist, K.A., Tomlinson, A.J., Kieper, W.C., McGargill, M.A., Hart, M.C., Naylor, S., Jameson, S.C., 1997. Identification of a Naturally Occurring Ligand for Thymic Positive Selection. *Immunity* 6, 389–399. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80282-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80282-4)

- Hollestelle, M.J., Lai, K.W., van Deuren, M., Lenting, P.J., de Groot, P.G., Sprong, T., Bovenschen, N., 2011. Cleavage of von Willebrand Factor by Granzyme M Destroys Its Factor VIII Binding Capacity. *PLoS ONE* 6, e24216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024216>
- Hosseini, A., Gharibi, T., Marofi, F., Babaloo, Z., Baradaran, B., 2020. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *International Immunopharmacology* 80, 106221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106221>
- Hourmant, M., Figueres, L., Gicquel, A., Kimmel, C., Garandeau, C., 2019. New rules of ABO-compatibility in kidney transplantation. *Transfusion Clinique et Biologique* 26, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2019.06.002>
- Huai, Q., Kim, H.-Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., Ke, H., 2002. Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 12037–12042. [https://doi.org/doi\\_10.1073\\_pnas.192206699](https://doi.org/doi_10.1073_pnas.192206699)
- Hudson, W.H., Youn, C., Ortlund, E.A., 2013. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* 20, 53–58. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2456>
- Huggins, J., Pellegrin, T., Felgar, R.E., Wei, C., Brown, M., Zheng, B., Milner, E.C.B., Bernstein, S.H., Sanz, I., Zand, M.S., 2007. CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27– naive human B cells. *Blood* 109, 1611–1619. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-008441>
- Ibrahim, E.H., Aly, M., Morath, C., Sayed, D.M., Ekpoom, N., Opelz, G., Süsal, C., Daniel, V., 2021. Relationship of transitional regulatory B and regulatory T cells and immunosuppressive drug doses in stable renal transplant recipients. *Immun Inflamm Dis* 9, 1252–1271. <https://doi.org/10.1002/iid3.473>
- 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>
- Jacobson, Harry R., 1991. Chronic renal failure: pathophysiology. *The Lancet* 338, 419–423. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91042-S](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91042-S)
- Jahrsdörfer, B., Blackwell, S.E., Wooldridge, J.E., Huang, J., Andreski, M.W., Jacobus, L.S., Taylor, C.M., Weiner, G.J., 2006. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood* 108, 2712–2719. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-014001>
- Jenne, D.E., Tschopp, J., 1988. Granzymes, a Family of Serine Proteases Released from Granules of Cytolytic T Lymphocytes upon T Cell Receptor Stimulation. *Immunol Rev* 103, 53–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1988.tb00749.x>

- Jensen, C., Sinkeviciute, D., Madsen, D.H., Önnerfjord, P., Hansen, M., Schmidt, H., Karsdal, M.A., Svane, I.M., Willumsen, N., 2020. Granzyme B Degraded Type IV Collagen Products in Serum Identify Melanoma Patients Responding to Immune Checkpoint Blockade. *Cancers* 12, 2786. <https://doi.org/10.3390/cancers12102786>
- Jiang, W., Chai, N.R., Maric, D., Bielekova, B., 2011. Unexpected Role for Granzyme K in CD56<sup>bright</sup> NK Cell-Mediated Immunoregulation of Multiple Sclerosis. *J.I.* 187, 781–790. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100789>
- Kaltenmeier, C., Gawanbacht, A., Beyer, T., Lindner, S., Trzaska, T., van der Merwe, J.A., Härter, G., Grüner, B., Fabricius, D., Lotfi, R., Schwarz, K., Schütz, C., Hönig, M., Schulz, A., Kern, P., Bommer, M., Schrezenmeier, H., Kirchhoff, F., Jahrsdörfer, B., 2015. CD4<sup>+</sup> T Cell-Derived IL-21 and Deprivation of CD40 Signaling Favor the In Vivo Development of Granzyme B-Expressing Regulatory B Cells in HIV Patients. *J.I.* 194, 3768–3777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402568>
- Kasprowicz, D.J., Smallwood, P.S., Tyznik, A.J., Ziegler, S.F., 2003. Scurfin (FoxP3) Controls T-Dependent Immune Responses In Vivo Through Regulation of CD4<sup>+</sup> T Cell Effector Function. *The Journal of Immunology* 171, 1216–1223. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1216>
- Katz, S.I., Parker, D., Turk, J.L., 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251, 550–551. <https://doi.org/10.1038/251550a0>
- Kloc, M., Kubiak, J.Z., Li, X.C., Ghobrial, R.M., 2015. Pericytes, Microvascular Dysfunction, and Chronic Rejection. *Transplantation* 99, 658–667. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000648>
- Kohli, K., Janssen, A., Förster, R., 2016. Plasmacytoid dendritic cells induce tolerance predominantly by cargoing antigen to lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 46, 2659–2668. <https://doi.org/10.1002/eji.201646359>
- Kotb, A., Klippert, A., Daskalaki, M., Sauermann, U., Stahl-Hennig, C., Neumann, B., 2017. Elevated granzyme B<sup>+</sup> B-cell level in SIV-infection correlate with viral load and low CD4 T-cell count. *Immunol Cell Biol* 95, 316–320. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.96>
- Lainé, A., Labiad, O., Hernandez-Vargas, H., This, S., Sanlaville, A., Léon, S., Dalle, S., Sheppard, D., Travis, M.A., Paidassi, H., Marie, J.C., 2021. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin  $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- $\beta$  activation. *Nat Commun* 12, 6228. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26352-2>
- Larkins, N.G., D’Orsogna, L., Taverniti, A., Sharma, A., Chakera, A., Chan, D., Krishnan, A., Wong, G., Lim, W.H., 2022. The Accuracy of Sequence-Specific Oligonucleotide and Real-Time Polymerase Chain Reaction HLA Typing in Determining the Presence of Pre-Transplant Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Total Eplet Mismatches for Deceased Donor Kidney Transplantation. *Front. Immunol.* 13, 844438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844438>
- Latorre, I., Esteve-Sole, A., Redondo, D., Giest, S., Argilagué, J., Alvarez, S., Peligero, C.,

- Forstmann, I., Crespo, M., Pascual, J., Meyerhans, A., 2016. Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transplant Immunology* 35, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2016.01.004>
- Le Berre, L., Chesneau, M., Danger, R., Dubois, F., Chaussabel, D., Garand, M., Brouard, S., 2021. Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Front. Immunol.* 12, 589786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589786>
- Leon, M.A., Wemlinger, S.M., Larson, N.R., Ruffalo, J.K., Sestak, J.O., Middaugh, C.R., Cambier, J.C., Berkland, C., 2019. Soluble Antigen Arrays for Selective Desensitization of Insulin-Reactive B Cells. *Mol. Pharmaceutics* 16, 1563–1572. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01250>
- Li, J., Luo, Y., Wang, X., Feng, G., 2019. Regulatory B cells and advances in transplantation. *J Leukoc Biol* 105, 657–668. <https://doi.org/10.1002/JLB.5RU0518-199R>
- Lindholm, A., Albrechtsen, D., Flatmark, A., Tufveson, G., Persson, N.H., Frödin, L., Groth, C.-G., 1994. A randomized multicenter trial of cyclosporin and prednisolone versus cyclosporin, azathioprine, and prednisolone following primary living donor renal transplantation. *Transplant Int* 7, 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.1994.tb01292.x>
- Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., Lunov, O., Nienhaus, G.U., Simmet, T., Kreienberg, R., Möller, P., Schrezenmeier, H., Jahrsdörfer, B., 2013. Interleukin 21–Induced Granzyme B–Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Res* 73, 2468–2479. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3450>
- Liu, Y., Liu, A., Iikuni, N., Xu, H., Shi, F.-D., La Cava, A., 2014. Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells Promote B Cell Anergy in Murine Lupus. *J.I.* 192, 4069–4073. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302897>
- Maeshima, K., Yamaoka, K., Kubo, S., Nakano, K., Iwata, S., Saito, K., Ohishi, M., Miyahara, H., Tanaka, S., Ishii, K., Yoshimatsu, H., Tanaka, Y., 2012. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon- $\gamma$  and interleukin-17 production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis & Rheumatism* 64, 1790–1798. <https://doi.org/10.1002/art.34329>
- Mahanonda, R., Champaiboon, C., Subbalekha, K., Sa-Ard-Iam, N., Rattanathammatada, W., Thawanaphong, S., Rerkyen, P., Yoshimura, F., Nagano, K., Lang, N.P., Pichyangkul, S., 2016. Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis. *J.I.* 197, 715–725. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600540>
- Matheu, M.P., Othy, S., Greenberg, M.L., Dong, T.X., Schuijs, M., Deswarte, K., Hammad, H., Lambrecht, B.N., Parker, I., Cahalan, M.D., 2015. Imaging regulatory T cell dynamics and CTLA4-mediated suppression of T cell priming. *Nat Commun* 6, 6219. <https://doi.org/10.1038/ncomms7219>

- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., Kurosaki, T., Baba, Y., 2014. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* 41, 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.016>
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., Weigert, M., 1984. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3180–3184. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3180>
- Mehrotra, R., Devuyst, O., Davies, S.J., Johnson, D.W., 2016. The Current State of Peritoneal Dialysis. *JASN* 27, 3238–3252. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010112>
- Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., Fisher, A.G., 1997. How Many Thymocytes Audition for Selection? *Journal of Experimental Medicine* 186, 1149–1158. <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1149>
- Miller, J.F., Vadas, M.A., Whitelaw, A., Gamble, J., 1976. Role of major histocompatibility complex gene products in delayed-type hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2486–2490. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2486>
- Montgomery, R.A., Stern, J.M., Lonze, B.E., Tatapudi, V.S., Mangiola, M., Wu, M., Weldon, E., Lawson, N., Deterville, C., Dieter, R.A., Sullivan, B., Boulton, G., Parent, B., Piper, G., Sommer, P., Cawthon, S., Duggan, E., Ayares, D., Dandro, A., Fazio-Kroll, A., Kokkinaki, M., Burdorf, L., Lorber, M., Boeke, J.D., Pass, H., Keating, B., Griesemer, A., Ali, N.M., Mehta, S.A., Stewart, Z.A., 2022. Results of Two Cases of Pig-to-Human Kidney Xenotransplantation. *N Engl J Med* 386, 1889–1898. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2120238>
- Moreau, A., Blair, P.A., Chai, J.-G., Ratnasothy, K., Stolarczyk, E., Alhabbab, R., Rackham, C.L., Jones, P.M., Smyth, L., Elgueta, R., Howard, J.K., Lechler, R.I., Lombardi, G., 2015. Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 45, 843–853. <https://doi.org/10.1002/eji.201445082>
- Morris, A.B., Farley, C.R., Pinelli, D.F., Adams, L.E., Cragg, M.S., Boss, J.M., Scharer, C.D., Fribourg, M., Cravedi, P., Heeger, P.S., Ford, M.L., 2020. Signaling through the Inhibitory Fc Receptor FcγRIIB Induces CD8+ T Cell Apoptosis to Limit T Cell Immunity. *Immunity* 52, 136–150.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.006>
- Murea, M., Deira, J., Kalantar-Zadeh, K., Casino, F.G., Basile, C., 2022a. The spectrum of kidney dysfunction requiring chronic dialysis therapy: Implications for clinical practice and future clinical trials. *Seminars in Dialysis* 35, 107–116. <https://doi.org/10.1111/sdi.13027>
- Murea, M., Flythe, J.E., Anjay, R., Emaad, A.-R.M., Gupta, N., Kovach, C., Vachharajani, T.J., Kalantar-Zadeh, K., Casino, F.G., Basile, C., 2022b. Kidney dysfunction requiring dialysis is a heterogeneous syndrome: we should treat it like one. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* 31, 92–99.

<https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000754>

- Nambiar, P.H., Doby, B., Tobian, A.A.R., Segev, D.L., Durand, C.M., 2021. Increasing the Donor Pool: Organ Transplantation from Donors with HIV to Recipients with HIV. *Annu. Rev. Med.* 72, 107–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-060419-122327>
- Nankivell, B.J., 2010. Rejection of the Kidney Allograft. *The New England Journal of Medicine*.
- Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>
- Nemazee, D., Russell, D., Arnold, B., Hahmmerling, G., Allison, J., Miller, J.F.A.P., Morahan, G., Buerki, K., 1991. Clonal Deletion of Autospecific B Lymphocytes. *Immunol Rev* 122, 117–132. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1991.tb00600.x>
- Nemazee, D.A., Bürki, K., 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337, 562–566. <https://doi.org/10.1038/337562a0>
- Neta, R., Salvin, S.B., 1974. Specific Suppression of Delayed Hypersensitivity: The Possible Presence of a Suppressor B Cell in the Regulation of Delayed Hypersensitivity. *Journal of Immunology* 113. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.113.6.1716>
- Niang, A., Iyengar, A., Luyckx, V.A., 2018. Hemodialysis versus peritoneal dialysis in resource-limited settings: Current Opinion in Nephrology and Hypertension 27, 463–471. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000455>
- Nishijima, H., Matsumoto, Minoru, Morimoto, J., Hosomichi, K., Akiyama, N., Akiyama, T., Oya, T., Tsuneyama, K., Yoshida, H., Matsumoto, Mitsuru, 2022. Aire Controls Heterogeneity of Medullary Thymic Epithelial Cells for the Expression of Self-Antigens. *J.I.* 208, 303–320. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100692>
- Nissen, R.M., Yamamoto, K.R., 2000. The glucocorticoid receptor inhibits NF- $\kappa$ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *GENES & DEVELOPMENT* 14, 2314–2329. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90396-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90396-v)
- O’Connell, P.J., Brown, M., Chan, T.M., Claire-Del Granado, R., Davies, S.J., Eiam-Ong, S., Hassan, M.H., Kalantar-Zadeh, K., Levin, A., Martin, D.E., Muller, E., Ossareh, S., Tchokhanelidze, I., Trask, M., Twahir, A., Were, A.J.O., Yang, C.-W., Zemchenkov, A., Harden, P.N., 2020. The role of kidney transplantation as a component of integrated care for chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 10, e78–e85. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2019.11.006>
- Oleinika, K., Mauri, C., Salama, A.D., 2019. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 11–26. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0074-7>
- O’Mahony, D., 2006. Monoclonal antibody therapy. *Front Biosci* 11, 1620.



<https://doi.org/10.2741/1909>

- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettré, S., Lozano, J.J., Bataille, R., Devys, A., Cesbron-Gautier, A., Braudeau, C., Larrose, C., Soulillou, J.-P., Brouard, S., 2010. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International* 78, 503–513. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.162>
- Pallikkuth, S., Rogers, K., Villinger, F., Doster II, M., Vaccari, M., Franchini, G., Pahwa, R., Pahwa, S., 2011. Interleukin-21 administration to rhesus macaques chronically infected with simian immunodeficiency virus increases cytotoxic effector molecules in T cells and NK cells and enhances B cell function without increasing immune activation or viral replication. *Vaccine* 29, 9229–9238. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.118>
- Papp, G., Gyimesi, E., Szabó, K., Zöld, É., Zeher, M., 2016. Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5<sup>+</sup> B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjögren's Syndrome. *Mediators of Inflammation* 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/4328372>
- Parlakpınar, H., Gunata, M., 2021. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 43, 651–665. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1966033>
- Parra, M., Weitner, M., Yang, A., Akue, A., Liu, X., Schmidt, T., Allman, W.R., Akkoyunlu, M., Derrick, S.C., 2020. Memory CD73+IgM+ B cells protect against *Plasmodium yoelii* infection and express Granzyme B. *PLoS ONE* 15, e0238493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238493>
- Perl, M., Denk, S., Kalbitz, M., Huber-Lang, M., 2012. Granzyme B: A New Crossroad of Complement and Apoptosis, in: Lambris, J.D., Hajishengallis, G. (Eds.), *Current Topics in Innate Immunity II, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 135–146. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_8)
- Picarda, É., Ossart, J., Bézie, S., Guillonnet, C., 2015. Rôle clé des Treg CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un allopeptide en transplantation. *Med Sci (Paris)* 31, 22–24. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101007>
- Piloni, D., Morosini, M., Magni, S., Balderacchi, A., Inghilleri, S., Cova, E., Oggionni, T., Frangipane, V., Pandolfi, L., Scudeller, L., Meloni, F., 2019. Peripheral CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> B-regulatory cells in lung transplant recipients. *Transplant Immunology* 57, 101245. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2019.101245>
- Platt, J.L., 1992. Mechanisms of Tissue Injury in Hyperacute Xenograft Rejection: *ASAIO Journal* 38, 8–16. <https://doi.org/10.1097/00002480-199201000-00005>
- Porrett, P.M., Orandi, B.J., Kumar, V., Houp, J., Anderson, D., Cozette Killian, A., Hauptfeld-Dolejssek, V., Martin, D.E., Macedon, S., Budd, N., Stegner, K.L., Dandro, A., Kokkinaki, M., Kuravi, K.V., Reed, R.D., Fatima, H., Killian, J.T., Baker, G., Perry, J., Wright, E.D., Cheung, M.D., Erman, E.N., Kraebber, K., Gamblin, T., Guy, L., George, J.F., Ayares, D.,

- Locke, J.E., 2022. First clinical-grade porcine kidney xenotransplant using a human decedent model. *American Journal of Transplantation* 22, 1037–1053. <https://doi.org/10.1111/ajt.16930>
- Rajab, T.K., Tchantchaleishvili, V., 2019. Can tissue engineering produce bioartificial organs for transplantation? *Artif Organs* 43, 536–541. <https://doi.org/10.1111/aor.13443>
- Ramamoorthy, S., Cidlowski, J.A., 2016. Corticosteroids. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 42, 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
- Rampersad, C., Balshaw, R., Gibson, I.W., Ho, J., Shaw, J., Karpinski, M., Goldberg, A., Birk, P., Rush, D.N., Nickerson, P.W., Wiebe, C., 2022. The negative impact of T cell–mediated rejection on renal allograft survival in the modern era. *American Journal of Transplantation* 22, 761–771. <https://doi.org/10.1111/ajt.16883>
- Reim, J.W., Symer, D.E., Watson, D.C., Dintzis, R.Z., Dintzis, H.M., 1996. Low molecular weight antigen arrays delete high affinity memory B cells without affecting specific T-cell help. *Molecular Immunology* 33, 1377–1388. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(96\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(96)00086-7)
- Rhen, T., Cidlowski, J.A., 2005. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med* 353, 1711–1723. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050541>
- Rosser, E.C., Mauri, C., 2015. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42, 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Roufosse, C., Simmonds, N., Clahsen-van Groningen, M., Haas, M., Henriksen, K.J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasińska, A., Rabant, M., Racusen, L.C., Solez, K., Becker, J.U., 2018. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 102, 1795–1814. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366>
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Muller, W., Rudensky, A.Y., 2008. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28, 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.017>
- Rudd, C.E., Schneider, H., 2003. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 544–556. <https://doi.org/10.1038/nri1131>
- Rüegger, A., Kuhn, M., Lichti, H., Loosli, H.-R., Huguenin, R., Quiquerez, C., von Wartburg, A., 1976. Cyclosporin A, ein immunsuppressiv wirksamer Peptidmetabolit aus *Trichoderma polysporum* (L INK ex P ERS.) *Rifai*. *HCA* 59, 1075–1092. <https://doi.org/10.1002/hlca.19760590412>
- Ruggles, S.W., Fletterick, R.J., Craik, C.S., 2004. Characterization of Structural Determinants of Granzyme B Reveals Potent Mediators of Extended Substrate Specificity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 30751–30759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400949200>

- Ryan, K.R., 2005. Fas-mediated death and sensory adaptation limit the pathogenic potential of autoreactive T cells after strong antigenic stimulation. *Journal of Leukocyte Biology* 78, 43–50. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205059>
- Sailliet, N., Brosseau, C., Robert, J.-M., Brouard, S., 2019. Role of JAK inhibitors and immune cells in transplantation. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 47, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.05.002>
- Sakaguchi, S., 2003. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J. Clin. Invest.* 112, 1310–1312. <https://doi.org/10.1172/JCI200320274>
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* 182, 389–400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>
- Salomon, B.L., Leclerc, M., Tosello, J., Ronin, E., Piaggio, E., Cohen, J.L., 2018. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front. Immunol.* 9, 444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00444>
- Sattler, S., Ling, G.-S., Xu, D., Hussaarts, L., Romaine, A., Zhao, H., Fossati-Jimack, L., Malik, T., Cook, H.T., Botto, M., Lau, Y.-L., Smits, H.H., Liew, F.Y., Huang, F.-P., 2014. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (BregIL-33) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *Journal of Autoimmunity* 50, 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.032>
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D., 1989. The V(D)J Recombination Activating Gene, RAG-. *Cell* 59, 1035–1058. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90760-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90760-5)
- Schnell, A., Schwarz, B., Wahlbuhl, M., Allabauer, I., Hess, M., Weber, S., Werner, F., Schmidt, H., Rechenauer, T., Siebenlist, G., Kaspar, S., Ehram, C., Rieger, D., Rückel, A., Metzler, M., Christoph, J., Woelfle, J., Rascher, W., Hoerning, A., 2021. Distribution and Cytokine Profile of Peripheral B Cell Subsets Is Perturbed in Pediatric IBD and Partially Restored During a Successful IFX Therapy. *Inflammatory Bowel Diseases* 27, 224–235. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa054>
- Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J.A., Greenberg, A.H., 1997. Granzyme B (GraB) Autonomously Crosses the Cell Membrane and Perforin Initiates Apoptosis and GraB Nuclear Localization. *Journal of Experimental Medicine* 185, 855–866. <https://doi.org/10.1084/jem.185.5.855>
- Shihab, F., Christians, U., Smith, L., Wellen, J.R., Kaplan, B., 2014. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: Pharmacokinetics, exposure–response relationships, and clinical outcomes. *Transplant Immunology* 31, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2014.05.002>
- Śledzińska, A., Vila de Mucha, M., Bergerhoff, K., Hotblack, A., Demane, D.F., Ghorani, E., Akarca, A.U., Marzolini, M.A.V., Solomon, I., Vargas, F.A., Pule, M., Ono, M., Seddon,

- B., Kassiotis, G., Ariyan, C.E., Korn, T., Marafioti, T., Lord, G.M., Stauss, H., Jenner, R.G., Peggs, K.S., Quezada, S.A., 2020. Regulatory T Cells Restrain Interleukin-2- and Blimp-1-Dependent Acquisition of Cytotoxic Function by CD4<sup>+</sup> T Cells. *Immunity* 52, 151-166.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.007>
- Sood, P., Hariharan, S., 2018. Anti-CD20 Blocker Rituximab in Kidney Transplantation. *Transplantation* 102, 44–58. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001849>
- Sprent, J., Webb, S.R., 1995. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Current Opinion in Immunology* 7, 196–205. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80004-2](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80004-2)
- Stites, E., Renner, B., Laskowski, J., Le Quintrec, M., You, Z., Freed, B., Cooper, J., Jalal, D., Thurman, J.M., 2020. Complement fragments are biomarkers of antibody-mediated endothelial injury. *Molecular Immunology* 118, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.12.011>
- Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M., Chambon, P., 2011. Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist-Liganded Glucocorticoid Receptor. *Cell* 145, 224–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027>
- Swanson, J.A., Watts, C., 1995. Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology* 5, 424–428. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)89101-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)89101-1)
- Tabanelli, V., Santiago-Pacheco, V., Corbellino, M., Calleri, A., Agostinelli, C., Parravicini, C., Pileri, S.A., 2017. Cytotoxic Epstein-Barr virus-positive large B cell lymphoma: a regulatory B cell-derived neoplasia? *Histopathology* 70, 650–656. <https://doi.org/10.1111/his.13109>
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., Akira, S., 1999. Enhanced Th1 Activity and Development of Chronic Enterocolitis in Mice Devoid of Stat3 in Macrophages and Neutrophils. *Immunity* 10, 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80005-9)
- Tan, C., Noviski, M., Huizar, J., Zikherman, J., 2019. Self-reactivity on a spectrum: A sliding scale of peripheral B cell tolerance. *Immunol Rev* 292, 37–60. <https://doi.org/10.1111/imr.12818>
- Thomas, K., Avrion, M.N., 2001. Tolerance and Autoimmunity. *ADVANCES IN IMMUNOLOGY*.
- Tittelbach-Helmrich, D., Bausch, D., Drognitz, O., Goebel, H., Schulz-Huotari, C., Kramer-Zucker, A., Hopt, U.T., Pisarski, P., 2014. Hyperacute Rejection of a Living Unrelated Kidney Graft. *Case Reports in Medicine* 2014, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/613641>
- Trapani, J.A., Sutton, V.R., Thia, K.Y.T., Li, Y.Q., Froelich, C.J., Jans, D.A., Sandrin, M.S., Browne, K.A., 2003. A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *Journal of Cell Biology* 160, 223–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210150>

- Traves, P.G., Murray, B., Campigotto, F., Galien, R., Meng, A., Di Paolo, J.A., 2021. JAK selectivity and the implications for clinical inhibition of pharmacodynamic cytokine signalling by filgotinib, upadacitinib, tofacitinib and baricitinib. *Ann Rheum Dis* 80, 865–875. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219012>
- Turner, C.T., Zeglinski, M.R., Richardson, K.C., Santacruz, S., Hiroyasu, S., Wang, C., Zhao, H., Shen, Y., Sehmi, R., Lima, H., Gauvreau, G.M., Granville, D.J., 2021. Granzyme B Contributes to Barrier Dysfunction in Oxazolone-Induced Skin Inflammation through E-Cadherin and FLG Cleavage. *Journal of Investigative Dermatology* 141, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.05.095>
- Vaeth, M., Gogishvili, T., Bopp, T., Klein, M., Berberich-Siebelt, F., Gattenloehner, S., Avots, A., Sparwasser, T., Grebe, N., Schmitt, E., Hünig, T., Serfling, E., Bodor, J., 2011. Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2480–2485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009463108>
- Vanhove, B., Laflamme, G., Coulon, F., Mougin, M., Vusio, P., Haspot, F., Tiollier, J., Soulillou, J.-P., 2003. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv- $\alpha$ 1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 102, 564–570. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2480>
- Vijayavenkataraman, S., Yan, W.-C., Lu, W.F., Wang, C.-H., Fuh, J.Y.H., 2018. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 132, 296–332. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.004>
- Walker, L.S.K., Abbas, A.K., 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2, 11–19. <https://doi.org/10.1038/nri701>
- Walters, G.D., Vinuesa, C.G., 2016. T Follicular Helper Cells in Transplantation. *Transplantation* 100, 1650–1655. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001217>
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I.M., Mahdi, R.M., Dolinska, M., Sergeev, Y.V., Wingfield, P.T., Kim, S.-H., Egwuagu, C.E., 2014. Interleukin-35 Induces Regulatory B Cells that Suppress CNS Autoimmune Disease. *Nat Med* 20, 633–641. <https://doi.org/10.1038/nm.3554>
- Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., Sato, S., Tedder, T.F., Fujimoto, M., 2010. Regulatory B Cells (B10 Cells) Have a Suppressive Role in Murine Lupus: CD19 and B10 Cell Deficiency Exacerbates Systemic Autoimmunity. *The Journal of Immunology* 184, 4801–4809. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902385>
- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J.P., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., Johnstone, R.W., Trapani, J.A., 2005. A Central Role for Bid in Granzyme B-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 280, 4476–4482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410985200>
- Waugh, S.M., Harris, J.L., Fletterick, R., Craik, C.S., 2000. pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *nature structural biology* 7, 4.

- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., Sanz, I., 2007. A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 178, 6624–6633. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6624>
- Wekerle, T., Grinyó, J.M., 2012. Belatacept: from rational design to clinical application: Belatacept. *Transplant International* 25, 139–150. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01386.x>
- Wiebe, C., Rush, D.N., Gibson, I.W., Pochinco, D., Birk, P.E., Goldberg, A., Blydt-Hansen, T., Karpinski, M., Shaw, J., Ho, J., Nickerson, P.W., 2020. Evidence for the alloimmune basis and prognostic significance of Borderline T cell-mediated rejection. *American Journal of Transplantation* 20, 2499–2508. <https://doi.org/10.1111/ajt.15860>
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* 28, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017>
- Yang, S.-Y., Long, J., Huang, M.-X., Luo, P.-Y., Bian, Z.-H., Xu, Y.-F., Wang, C.-B., Yang, S.-H., Li, L., Selmi, C., Gershwin, M.E., Zhao, Z.-B., Lian, Z.-X., 2021. Characterization of Organ-Specific Regulatory B Cells Using Single-Cell RNA Sequencing. *Front. Immunol.* 12, 711980. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711980>
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., Karin, M., 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205–1215. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90396-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90396-V)
- Yarkoni, Y., Getahun, A., Cambier, J.C., 2010. Molecular underpinning of B-cell anergy: BCR signaling in anergic B cells. *Immunological Reviews* 237, 249–263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00936.x>
- Young, D.A., Lowe, L.D., Booth, S.S., Whitters, M.J., Nicholson, L., Kuchroo, V.K., Collins, M., 2000. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF- $\beta$  from an Altered Peptide Ligand-Specific Th2 Cell Clone Down-Regulate Adoptive Transfer of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164, 3563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3563>
- Zal, T., Volkman, A., Stockinger, B., 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *Journal of Experimental Medicine* 180, 2089–2099. <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2089>
- Zhang, C., Wang, Y., Xun, X., Wang, S., Xiang, X., Hu, S., Cheng, Q., Guo, J., Li, Z., Zhu, J., 2020. TIGIT Can Exert Immunosuppressive Effects on CD8+ T Cells by the CD155/TIGIT Signaling Pathway for Hepatocellular Carcinoma In Vitro. *Journal of Immunotherapy* 43, 236–243. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000330>

- Zhang, X., Ma, J., Li, H., Zhou, L., Liu, Z., Lyu, S., He, Q., Li, X., 2021. Overexpression of fibrinogen-like protein 2 alleviates acute rejection in rat models of liver transplantation. *Ann Transl Med* 9, 408–408. <https://doi.org/10.21037/atm-20-7881>
- Zhao, Yang, Su, H., Shen, X., Du, J., Zhang, X., Zhao, Yong, 2017. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflamm. Res.* 66, 571–578. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1032-8>
- Zhu, J., Zeng, Y., Dolff, S., Bienholz, A., Lindemann, M., Brinkhoff, A., Schedlowski, M., Xu, S., Sun, M., Guberina, H., Kirchhof, J., Kribben, A., Witzke, O., Wilde, B., 2017. Granzyme B producing B-cells in renal transplant patients. *Clinical Immunology* 184, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.04.016>

## Chapitre III

---

### Résultats



---

Caractérisation biologique de molécules originales sur leur activité inhibitrice des  
voies JAK

---

## **Introduction :**

Dans cette première partie des résultats, nous nous intéressons au développement d'inhibiteurs de JAK, et principalement d'inhibiteurs de la signalisation JAK1 dont dépendent l'IL-4 et l'IL-13 (Jiang et al., 2000; Murata et al., 1998). Il a été démontré que dans un complexe de JAKs, la signalisation ne nécessite pas l'activation de chaque JAK. Par exemple, bien que toutes les signalisations dépendantes de TYK2 (Interférons de type I, IL-6, IL-10, IL-12 et IL-23) soient altérées dans un modèle murin KO pour TYK2, l'inhibition spécifique de TYK2 permet uniquement d'inhiber la signalisation de l'IL-12 et de l'IL-23. Ceci est expliqué par le rôle de TYK2 dans l'expression à la surface des différents récepteurs et de JAK1. Son rôle sur les voies cytokiniques autres que l'IL-12 et l'IL-23 est donc principalement structurel (Sohn et al., 2013). Même fonctionnelles, les JAKs peuvent cibler et recruter des STATs différentes avec des sites de transcription distincts, et l'inhibition spécifique d'une seule JAK ne permet pas forcément de bloquer l'ensemble de la signalisation JAK dépendante (Haan et al., 2011). C'est donc dans ce contexte, mettant en relation plusieurs JAKs différentes que l'effet des inhibiteurs doit être analysé.

Contrairement aux modèles sur kinase isolée couramment utilisés, les modèles cellulaires ont l'avantage de renseigner sur la capacité des molécules à traverser la membrane plasmique et à se fixer aux JAKs dans leur environnement (récepteur/couple de JAK). Cela nous permet de mieux comprendre la relation entre la structure des composés et l'inhibition des grandes voies cytokiniques (JAK1/JAK2 ; JAK1/JAK3 ; JAK1/TYK2 ; JAK2/JAK2 ; JAK2/TYK2 ; JAK1/JAK2/TYK2) et d'intégrer l'activité de chaque JAK sur chaque voie analysée.

## **Matériel et Méthodes :**

### **Molécules**

3 séries de molécules originales ont été analysées durant ce travail préliminaire. Chaque série est développée à partir d'un noyau commun capable de mimer l'ATP en faisant deux interactions hydrogène avec la région charnière (Hinge region) de la poche catalytique du domaine kinase (Figure 1). Cette région est très fortement conservée entre les différentes kinases faisant de ce noyau un inhibiteur peu spécifique, en plus d'être de faible affinité (nombre équivalent d'interactions noyau – poche catalytique que ATP – poche catalytique).

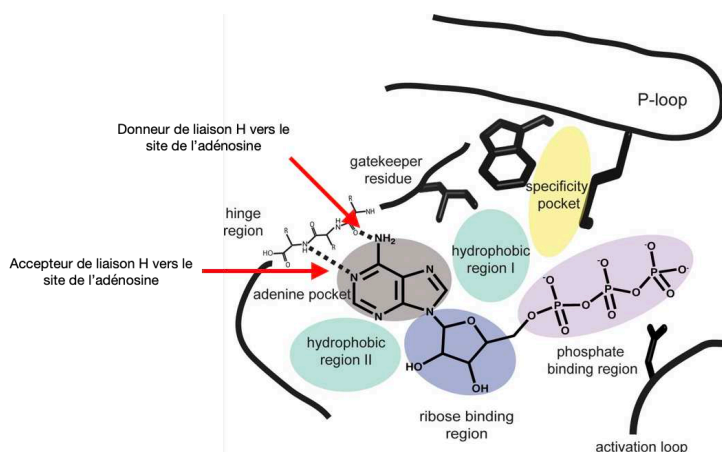


Figure 1 : Schéma de la poche catalytique d'un domaine kinase (avec l'ATP) et sites d'interactions hydrogène.

Différents résidus ont ensuite été greffés à ce noyau afin de former des interactions avec les régions hydrophobes (Hydrophobic region I et II sur la figure 1), qui ont une plus grande variabilité entre les kinases que la région charnière. Au total, ce sont plus de 80 composés qui ont été développés. Les travaux de modélisation moléculaire (études de docking, et prédiction d'activité) ont permis de sélectionner des familles de molécules-sondes pour l'élaboration d'inhibiteurs potentiels. Ainsi, une première série de 26 molécules dérivées d'un pharmacophore de type triazol-4-one a été évaluée. La modulation du scaffold nous a permis de sélectionner une seconde série de 19 molécules dérivées du pyridazinoindole. La compilation des résultats des SAR de ces deux séries avec les données de la littérature concernant les critères d'activité sur JAKs nous a permis d'envisager la conception et la synthèse d'une troisième série de molécules originales, dérivées de la 2,6-diamino-1,3,5-triazine. Toutes les molécules analysées ont été solubilisées dans du DMSO pur à 10mM et conservées à -20°C. Pour limiter l'impact du DMSO dans les résultats, 1/1000<sup>e</sup> de DMSO a été ajouté dans tous les puits contrôles et la concentration a été ajustée à 1/1000 lors des doses réponses. Cette concentration correspond à la plus forte concentration des molécules utilisée (10µM).

La structure exacte des différents composés ne sera pas discutée ici car leur développement n'entre pas directement dans ce travail de thèse.

### **Tests d'inhibition de la phosphorylation des STATs par cytométrie en flux :**

La capacité des molécules à inhiber la signalisation de différentes cytokines a été visualisée par cytométrie en flux en analysant le taux de phosphorylation de STATs suite à des stimulations IL-4 (JAK1/JAK3), IL-12 (JAK2/TYK2).

### **Echantillons**

Les échantillons de sang humain désidentifié ont été obtenus à partir de donneurs sains adultes auprès de l'EFS (Etablissement Français du sang, Nantes, France). Tous les échantillons ont été obtenus sous consentement éclairé et conformément aux politiques de l'EFS.

### **Isolation des PBMC et tri des lymphocytes T CD4+**

L'isolation des PBMC a été réalisée par centrifugation sur gradient de densité de FICOLL. Brièvement, le sang a été dilué en PBS pour obtenir un volume final de 30mL (pour environ 12mL de sang) puis a été déposé délicatement sur une couche de FICOLL (15mL) en falcon 50mL. Après centrifugation de 20 minutes à 1200g sans freinage. Après récupération de l'anneau de PBMC, les érythrocytes résiduels ont été éliminés dans une solution de lyse des globules rouges (Red Blood Cell lysis solution, Miltenyi Cat #130-094-183) pendant 3 à 5 minutes selon le taux d'érythrocytes. Les plaquettes ont été éliminées par centrifugation à 150g pendant 5 minutes. Les lymphocytes T CD4+ ont été récupérés à partir des PBMC par tri magnétique en utilisant le kit d'isolation des lymphocytes T CD4+ humains (CD4+ T cells isolation kit human, Miltenyi Biotec, Cat #130-096-533) suivant le protocole du fabricant. La séparation a été réalisée sur un Automacs Pro separator (Miltenyi Biotec, Cat #130-092-545). Les lymphocytes T fraîchement triés sont ensuite comptés et 100 000 cellules sont déposées par puits dans une plaque 96 puits en RPMI complet seules, en présence des différentes molécules à tester ou d'inhibiteurs contrôles (Tofacitinib, Ruxolitinib, Oclacitinib), pendant 1h.

### **Marquages et stimulation**

L'activation des voies JAK/STAT sont régulées par des rétrocontrôles importants dont nous avons discuté en introduction (Böhmer and Friedrich, 2014; Croker et al., 2008; Niu et al., 2018). Ces rétrocontrôles posent un problème technique car en absence de la cytokine stimulatrice, la phosphorylation des JAK et des STATs est rapidement retirée par des phosphatases. La visualisation des pSTAT nécessite donc quelques ajustements aux protocoles de marquages classiques où les marquages se font après la stimulation. Ici, pour conserver l'état de phosphorylation, les cellules sont fixées immédiatement après la stimulation. Le marquage de viabilité est basé sur l'incapacité des cellules mortes à bloquer l'entrée du

marqueur à son compartiment intracellulaire. Ce marquage doit donc obligatoirement être réalisé avant cette étape de fixation / perméabilisation, qui permet l'entrée du marqueur dans les cellules vivantes.

Le marquage de viabilité est réalisé par dilution au 1/1000 du Live/DEAD™ Fixable Yellow Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, Cat #L34959) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après lavage des cellules, les différentes stimulations sont ajoutées dans les puits à 10ng/mL dans 100µL de RPMI complet (+10% SVF décomplémenté, L-Glu, Pénicilline, Streptomycine) pendant 15 minutes à 37°C. La réaction est immédiatement arrêtée en ajoutant 100µL de Fixation buffer préchauffé à 37°C (BD Biosciences, Cat #554655) pendant 12 minutes à 37°C. Après centrifugation et élimination du surnageant, la perméabilisation est réalisée avec 100µL de Perméabilisation Buffer III froid (BD Biosciences, Cat #558050), optimisé pour l'analyse de la phosphorylation des STATs en cytométrie en flux, pendant 30 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en tampon de marquage (Perm/Wash Buffer, BD Biosciences, Cat #554723) puis marquées avec un anti-pY701 STAT1 – pacific blue (BD Biosciences, Cat #560310, RRID:AB\_1645326), un anti-pY705 STAT3 – pacific blue (BD Biosciences, Cat #560312, RRID:AB\_1645327), un anti-pY693 STAT4 AF647 (BD Biosciences Cat# 558137, RRID:AB\_397052) ou un anti-pY641 STAT6 AF647 ((BD Biosciences Cat# 612601, RRID:AB\_399884) dilués au 1/10 en tampon de marquage pendant 1h à température ambiante à l'obscurité. Après un dernier lavage les cellules sont resuspendues dans 150µL de PBS supplémenté de 0.5% de BSA et de 2mM d'EDTA et analysées sur un FACS Celesta (BD Biosciences).

### **Mesure de l'effet dose sur lignée reportrice**

L'effet dose des molécules sur la voie de l'IL-4 a été réalisé sur une lignée reportrice (HEK-Blue IL-4 SEAP reporter cells, Cellosaurus, Cat #hkb-il413 RRID:CVCL\_A8DA). Cette lignée possède tous les éléments pour transduire le signal de l'IL-4 (chaines du récepteur, JAK1, JAK3, STAT6), et un gène codant pour une forme sécrétée de la phosphatase alcaline régulée par des éléments répondant à STAT6 dans son promoteur. Les cellules sont cultivées en flask de 125cm<sup>2</sup> en DMEM complet (+10%SVF décomplémenté, L-Glu, Pénicilline, Streptomycine, HEPES 1X). Les analyses et le repiquage des cellules se font lorsque les cellules atteignent 70% à 80% de confluence. Les cellules adhérentes sont décollées de la flask en utilisant un grattoir pour éviter la trypsine. Après comptage, 50 000 cellules sont déposées dans une plaque 96 puits à fond conique puis centrifugées pour être reprises dans 198µL de DMEM complet en

présence des à différentes doses pendant 1h puis 2µL d'IL-4 sont ajoutés pour une concentration finale de 1ng/mL. Après une incubation de 24h à 37°C, le p-nitrophényl phosphate (SigmaFast, Sigma Aldrich, Cat #N1891) est préparé selon les instructions du fournisseur et 20µL de surnageant sont mélangés à 180µL de solution de p-nitrophényl phosphate. L'absorbance à 405nm est mesurée après 30 minutes d'incubation à 37°C sur un lecteur de plaques spark (Tecan).

### **Analyses statistiques**

La phosphorylation des STATs est relativement homogène dans les lymphocytes T CD4+ suite à des stimulations IL-4 et IL-12 (Bacon et al., 1995; Reichel et al., 1997). La valeur utilisée pour apprécier l'état de phosphorylation des STATs est l'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Pour diminuer la variance induite par les échantillons, les données brutes de chaque inhibiteur a été rapportée aux niveaux de phosphorylation suite à une stimulation sans inhibiteur, et au niveau de phosphorylation basal des cellules (sans activation).

$$\frac{MFI_{Inhibiteur} - MFI_{Basal}}{MFI_{stimulation} - MFI_{Basal}}$$

L'effet des différentes molécules sur la MFI de la phosphorylation des STATs a été mesurée par une analyse des variances (ANOVA) 1 voie sur échantillons appariées suivi du test de Dunnett pour les comparaisons multiples. Toutes les analyses statistiques et la génération des graphiques a été réalisée sur GraphPad (Prism) v9. Les données sont présentées sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (standard error of the mean, SEM). Les différences sont définies comme statistiquement significatives quand  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) et  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*)

### **Résultats**

#### **Inhibition des voies JAK1/JAK3 dépendantes (IL-4) et JAK2/TYK2 dépendantes (IL-12) par les composés de première et deuxième génération**

Nous avons commencé la caractérisation des différentes molécules sur deux voies cytokiniques opposant les JAK d'intérêt (JAK1 et JAK3) des JAKs dont l'inhibition n'est pas souhaitée (JAK2, et dans une moindre mesure, TYK2). L'IL-4, se fixe sur un récepteur partageant la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs de la famille de l'IL-2 qui, en combinaison avec la chaîne IL-4Rb, permet de recruter JAK1 et JAK3 ainsi que STAT6. L'IL-4 peut se fixer sur un second récepteur composé des chaînes IL-4Rb et IL-13R pour recruter JAK1, TYK2 et STAT6 (Jiang et al., 2000). Cependant, cette seconde voie de signalisation est minoritaire dans les

populations lymphoïdes (Murata et al., 1998). L'IL-12 est une cytokine se fixant sur son récepteur composé des chaînes IL-12RA et IL-12RB recrutant JAK2 TYK2 et STAT4 (Bacon et al., 1995).

Les résultats de phosphorylation des STATs sur ces deux signalisations montrent que parmi les molécules de la première génération (nomenclature 03xxx), seule la 03231 induit une inhibition significative de la signalisation IL-4 tandis que 6 induisent une inhibition significative de la signalisation IL-12 (03285, 03291, 03292, 03299, 03301 et 03312). La structure du composé 03231 nous a poussé à choisir une seconde famille de molécules dérivée de la pyridazinoindole (nomenclatures AQUXX, ASDXXATXX et SKEXX) parmi lesquelles une seule inhibe significativement la voie de l'IL-12 (SKE157) et 5 inhibent significativement la voie de l'IL-4 (AQU13, ASD97, AT98, AT99, et SKE156) (Figure 2). Cependant, bien que l'inhibition soit significative, elle reste bien inférieure à l'inhibition induite par les trois molécules de référence.

### **Inhibition des voies JAK1/JAK3 dépendantes (IL-4) et JAK2/TYK2 dépendantes (IL-12) par les composés de troisième génération**

La troisième génération de molécules que nous avons testé, composée de dérivés de la 1,3,5-triazinediamine. Les résultats montrent que sur 38 molécules de cette série, 5 molécules d'intérêt induisent une forte inhibition de la voie de l'IL-4, significativement comparable à l'Oclacitinib : JM-17.042, JM-17.044, JM-17.046, JM-17.049, JM-17.050 ( $p > 0.05$ ) (Figure 3-A). Parmi ceux-ci, 4 n'induisent pas une inhibition significative de la voie de l'IL-12 JAK2/TYK2 dépendante (Figure «3-B). A 10 $\mu$ M, l'inhibition de la voie de l'IL-4 est saturante et la phosphorylation de STAT6 est indiscernable du bruit de fond. Pour comparer plus finement les effets de ces molécules entre elles, nous avons regardé l'effet de différentes doses de chacun de ces composés (0.01 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M,  $n = 4$ ) sur une lignée cellulaire reportrice de l'activité IL-4/JAK1-JAK3/STAT6 (Figure 3-C). Nous avons mesuré l'IC<sub>50</sub> des 3 molécules permettant une inhibition totale de la signalisation IL-4 : JM-17.042, JM-17.046 et Oclacitinib avec des IC<sub>50</sub> respectives de 0.3198 $\mu$ M, 0.2440 $\mu$ M et 0.3332 $\mu$ M. Nous avons ensuite profité de l'interruption due au COVID pour évaluer la stabilité de ces molécules. Après 4 mois de conservation à -20°C en DMSO, les 5 molécules d'intérêt n'induisent plus une inhibition semblable à l'Oclacitinib (Figure 4).

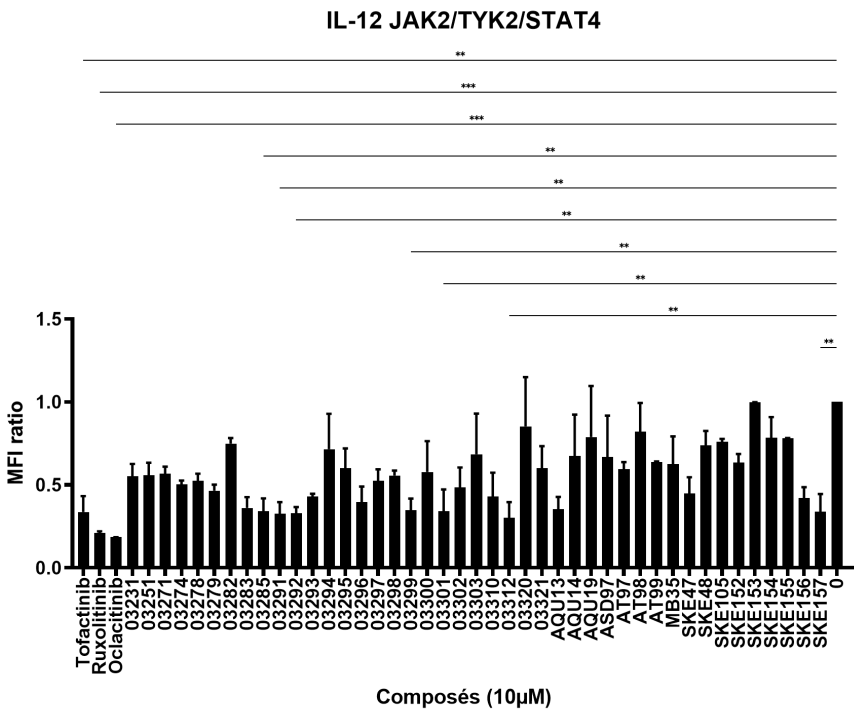
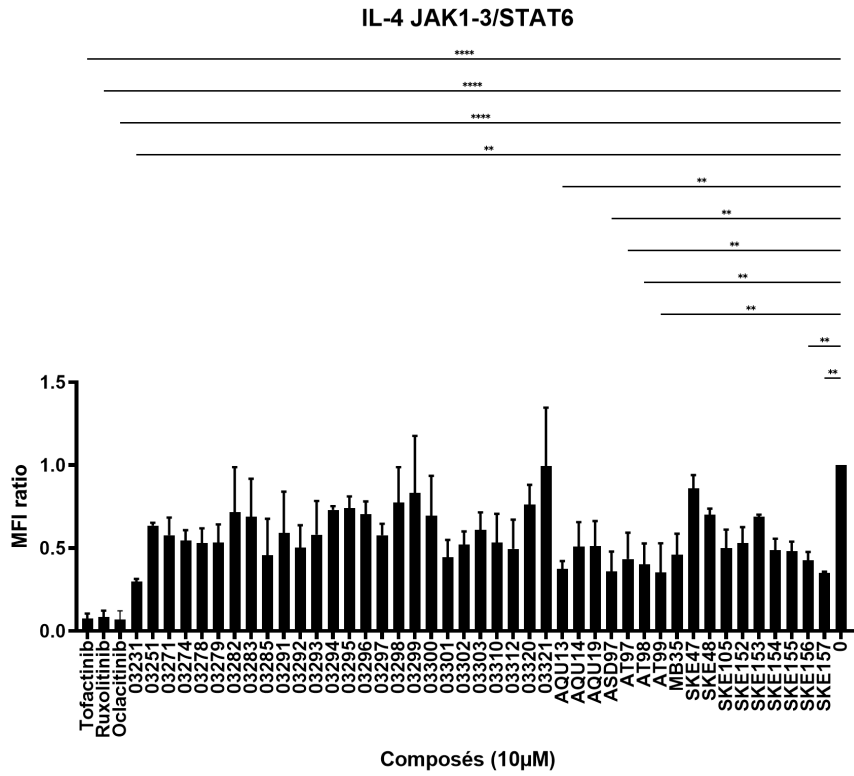


Figure 2 : Inhibition des voies JAK1/JAK3 et JAK2/TYK2 dépendantes par les composés de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération. L'expression de la phosphorylation des STATs a été mesurée par cytométrie en flux suite à des stimulations avec 10ng/ml d'IL-4 ou d'IL-12 chaque mesure a été répliquée sur 4 donneurs indépendants (n = 4). Les données sont présentées sous la forme de la moyenne ± SEM). Les différences sont définies comme statistiquement significatives quand  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) et  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).



## Discussion

Le travail de développement d'inhibiteurs de kinases est largement facilité par des méthodes automatisées de criblage haut débit sur kinase isolée. Ces méthodes peuvent permettre de définir le profil inhibiteur de chaque molécule sur des banques de kinase. Cependant, ces méthodes ont le désavantage du prix et de ne pas prendre en compte le contexte cellulaire (diffusion de la molécule à travers la membrane cellulaire, séquestration sur d'autres composants) ni l'interdépendance des JAKs. La méthodologie que nous avons utilisée repose sur une analyse successive de composés sélectionnés d'abord sur la capacité de leur noyau à fixer faiblement et non spécifiquement la poche catalytique du domaine kinase, puis sur la sélection par modélisation informatique des interactions associées à différents résidus greffés sur ce noyau et sur l'analyse *in vitro* des molécules sélectionnées dans différents modèles cellulaires dépendants des signalisations cytokiniques JAK1/JAK3 et JAK2/TYK2. Nous avons analysé un total de 81 molécules. Ces analyses ont mis en avant une série de 5 composés d'intérêt. Toutefois, cette activité inhibitrice sur JAK1 n'est pas stable dans le temps.

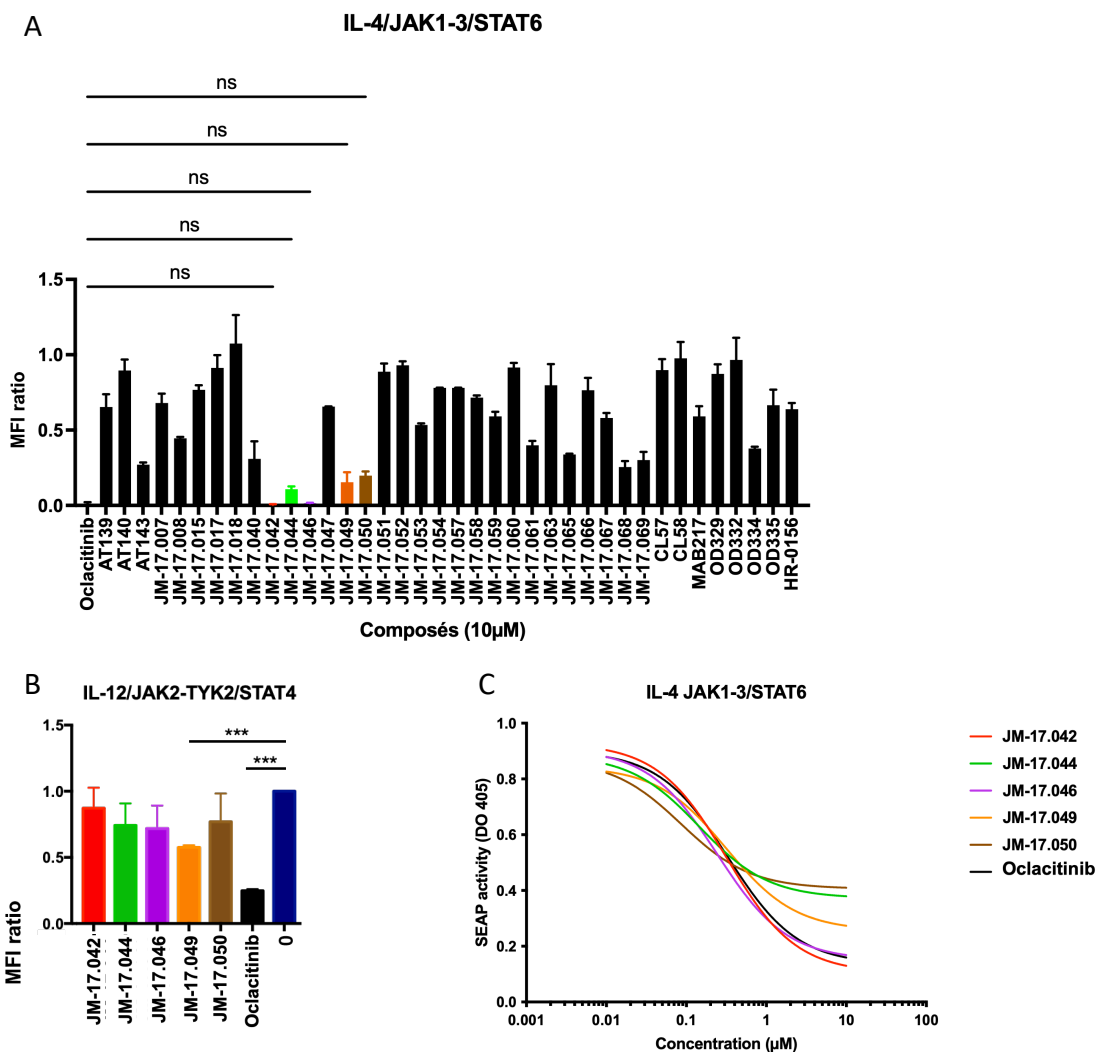


Figure 3 : Inhibition des voies JAK1/JAK3 et JAK2/TYK2 dépendantes par les composés de troisième génération. L'expression de la phosphorylation des STATs a été mesurée par cytométrie en flux suite à des stimulations avec 10ng/ml d'IL-4 (A) ou d'IL-12 (B). Une dose-réponse des 5 composés d'intérêt et de l'oclacitinib a été réalisée sur 6 doses différentes (10µM, 5µM, 1µM, 0.5µM, 0.1µM et 0.01µM). Chaque mesure a été répliquée sur 4 donneurs indépendants (n = 4) (A-B) ou a été répliquée dans 4 puits de culture (C). Les données sont présentées sous la forme de la moyenne ± SEM). Les différences sont définies non significatives lorsque  $P > 0.01$  (ns),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) et  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

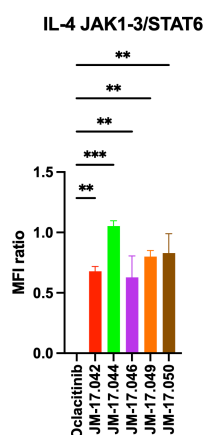


Figure 4 : Inhibition de la voie JAK1/JAK3 dépendante après 4 mois de conservation en DMSO à -20°C. Chaque mesure a été répliquée sur 4 donneurs indépendants (n = 4). Les données sont présentées sous la forme de la moyenne ± SEM). Les différences sont définies non significatives lorsque  $P > 0.01$  (ns),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) et  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

## Références

- Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J., Johnston, J.A., 1995. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J. Exp. Med.* 181, 399–404.
- Böhmer, F.-D., Friedrich, K., 2014. Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *JAK-STAT* 3, e28087. <https://doi.org/10.4161/jkst.28087>
- Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E., 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.07.010>
- Haan, C., Rolvering, C., Raulf, F., Kapp, M., Drückes, P., Thoma, G., Behrmann, I., Zerwes, H.-G., 2011. Jak1 Has a Dominant Role over Jak3 in Signal Transduction through  $\gamma$ c-Containing Cytokine Receptors. *Chemistry & Biology* 18, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.01.012>
- Jiang, H., Harris, M.B., Rothman, P., 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 1063–1070. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107604>
- Murata, T., Taguchi, J., Puri, R.K., 1998. Interleukin-13 Receptor  $\alpha'$  But Not  $\alpha$  Chain: A Functional Component of Interleukin-4 Receptors. *Blood* 91, 3884–3891. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.10.3884>
- Niu, G.-J., Xu, J.-D., Yuan, W.-J., Sun, J.-J., Yang, M.-C., He, Z.-H., Zhao, X.-F., Wang, J.-X., 2018. Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Negatively Regulates the JAK/STAT Pathway by Inhibiting STAT Phosphorylation and Translocation. *Front. Immunol.* 9, 2392. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02392>
- Reichel, M., Nelson, B.H., Greenberg, P.D., Rothman, P.B., 1997. The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression. *J. Immunol.* 158, 5860–5867. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.158.12.5860>
- Sohn, S.J., Barrett, K., Van Abbema, A., Chang, C., Kohli, P.B., Kanda, H., Smith, J., Lai, Y., Zhou, A., Zhang, B., Yang, W., Williams, K., Macleod, C., Hurley, C.A., Kulagowski, J.J., Lewin-Koh, N., Dengler, H.S., Johnson, A.R., Ghilardi, N., Zak, M., Liang, J., Blair, W.S., Magnuson, S., Wu, L.C., 2013. A Restricted Role for TYK2 Catalytic Activity in Human Cytokine Responses Revealed by Novel TYK2-Selective Inhibitors. *J Immunol* 191, 2205–2216. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202859>

---

Développement de méthodes permettant la visualisation des modifications  
immunitaires suite à un traitement anti-JAK chez les patients atteints de DA  
modérée à sévère

---

## Introduction

La dermatite atopique se caractérise immunologiquement par une sécrétion importante de cytokines de type 2 comme l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-31 au niveau des sites inflammatoires (Esaki et al., 2016). Cette sécrétion cytokinique est retrouvée dans le sang à des taux plus faibles (Kanwal et al., 2021; Kaminishi et al., 2002). Les inhibiteurs de JAK sont des traitement immunosuppresseur qui se prennent principalement sous forme orale et peuvent donc agir en systémique (Suga and Sato, 2019). Cependant, bien que ces traitements soient efficaces pour bloquer la signalisation IL-13, on observe en clinique que la production de la cytokine n'est pas abrogée et reste détectable durant les traitements. Ceci est probablement associé au retour rapide des symptômes chez ces patients à l'arrêt des traitements. De nombreuses études ont montré que l'IL-13 est produite par différents types cellulaires dans des pathologies inflammatoires tel que l'Asthme ou la DA (Kaminishi et al., 2002; Hijnen et al., 2013; Malefyt et al., 1995; Machura et al., 2010; Dakhama et al., 2013; Fuschiotti et al., 2013; Richards et al., 2000; Nam et al., 2006; Malefyt et al., 1995). Selon le contexte, l'activation de ces cellules et l'induction de la sécrétion d'IL-13 peut dépendre de signaux dépendant de JAK, notamment via une boucle de rétrocontrôle dépendante de l'IL-4 et de l'IL-13 (Purwar et al., 2006). Mais certaines voies d'induction de l'IL-13 sont indépendantes de ces voies JAK, notamment par l'action de l'alarmine IL-25 (Fort et al., 2001; Shibui et al., 2016; Yang et al., 2013). Pour mieux analyser ces populations et notamment leur rôle dans l'induction de l'IL-13, nous avons réalisé un phénotypage exhaustif des populations immunitaires circulantes impliquées dans la DA selon la littérature. Nous avons ainsi développé deux panels de cytométrie spectrale permettant d'évaluer le phénotype de 30 populations immunitaires. Le premier panel orienté sur les lymphocytes T permet la visualisation de 20 marqueurs phénotypiques en plus des marqueurs de population et le second panel orienté sur les lymphocytes B, NK, mono et cellules dendritiques permet la visualisation de 13 marqueurs phénotypiques en plus des marqueurs de population. Nous avons également développé un panel « fonctionnel » permettant de mesurer les capacités sécrétrices de 6 cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) des principales populations de lymphocytes T, B, NK et monocytes.

## **Matériel et Méthodes**

### **Patients**

Les PBMC venant de 20 patients adultes atteints de DA ont été obtenues en collaboration avec le service clinique de dermatologie du CHU de Nantes. Les PBMC venant de donneurs sains ont été obtenus auprès de l'EFS Centre - Pays de la Loire. Tous les donneurs ayant participé à cette étude ont donné leur consentement éclairé et écrit. Deux groupes de patients ont été définis sur la base du score SCORAD. Ce score, sur 103, est d'autant plus élevé que la maladie est sévère. Le groupe DA modérée correspond à un score compris entre 25 et 50, tandis que le groupe DA sévère correspond à un score supérieur à 50.

### **Isolation des PBMC**

L'isolation des PBMC a été réalisée par centrifugation sur gradient de densité de FICOLL. Les plaquettes ont été éliminées par centrifugation à 150g pendant 5 minutes. Les PBMC ont été congelés à raison de 2 ampoules par donneur à 10m/mL en SVF 10%DMSO en utilisant une CoolCell (Corning) à -80°C pendant 24h puis à -150°C jusqu'à utilisation.

### **Marquages cellulaires**

Après décongélation en tampon CTL 1X (Immunospot, Cat #CTL-AA-001), les PBMC ont été séparés en deux fractions d'un million de PBMC pour le panel « T » et le panel « B, NK, monocytes, DC », et une fraction de 2 millions de PBMC pour le panel « fonctionnel ». Les marquages sur les panels « T » et « B, NK, monocytes, DC » ont été réalisés immédiatement après décongélation. Pour le panel « Fonctionnel », les cellules ont été laissées au repos pendant 2h en RPMI complet (+10% SVF décomplémenté, L-Glu, Pénicilline, Streptomycine) puis pendant 3h30 en présence de 50ng/mL de PMA et de 500ng/mL d'ionomycine pour réactiver les cellules et de 5µg/mL de BFA pour bloquer la sécrétion cytokinique. Les anticorps utilisés et les étapes de marquages pour chacun des panels sont décrits dans les annexes 1 à 3. Les cellules ont été analysées par cytométrie spectrale sur un Aurora (Cytek). Les contrôles qualités et les analyses des données ont été analysées en utilisant le programme OMIQ (Dotmatics). 30 populations immunitaires sont ainsi distinguables par l'utilisation des deux panels phénotypiques (Tableau 1) L'analyse du panel fonctionnel a été réalisé uniquement dans les lymphocytes B, les NK, les monocytes, les lymphocytes T CD4+ folliculaires helper, les lymphocytes T CD4 non naïfs (Effecteurs mémoire, centraux mémoire et Effecteurs mémoire CD45RA<sup>+</sup>), et les lymphocytes T CD8+ non naïfs (Tableau 2).

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des 30 populations analysées par cytométrie spectrale

Populations (Panels « B, NK, mono, DC » et « T »)	Marqueurs
LT CD4+	CD19-CD56-CD3+CD4+
LT CD4+ naïfs	CD19-CD56-CD3+CD4+CD45RA+CCR7+
LT CD4+ EM	CD19-CD56-CD3+CD4+CD45RA-CCR7-
LT CD4+ CM	CD19-CD56-CD3+CD4+CD45RA-CCR7+
LT CD4+ EMRA	CD19-CD56-CD3+CD4+CD45RA+CCR7-
LT CD4+ Folliculaire Helper	CD19-CD56-CD3+CD4+CXCR5+
LT CD4+ régulateur	CD19-CD56-CD3+CD4+CD25+CD127-
LT CD8+	CD19-CD56-CD3+CD8+
LT CD8+ naïfs	CD19-CD56-CD3+CD8+CD45RA+CCR7+
LT CD8+ EM	CD19-CD56-CD3+CD8+CD45RA-CCR7-
LT CD8+ CM	CD19-CD56-CD3+CD8+CD45RA-CCR7+
LT CD8+ EMRA	CD19-CD56-CD3+CD8+CD45RA+CCR7-
LT CD8+ régulateur	CD19-CD56-CD3+CD8+CD25+CD127-
Lymphocytes B	CD3-HLADR+CD19+CD20+
LB transitionnels	CD3-HLADR+CD19+CD20+CD38-CD24+CD38+
LB naïves	CD3-HLADR+CD19+CD20+CD38-IgD+CD27-
LB mémoires unswitched	CD3-HLADR+CD19+CD20+CD38-CD27+IgD+
LB mémoire switched	CD3-HLADR+CD19+CD20+CD38-CD27+IgD-
Plasmocytes	CD3-HLADR+CD19+CD20+CD24-CD38+
NK	CD3-HLADR-CD56+
Early NK	CD3-HLADR-CD56 <sup>dim</sup> CD16+
Mature NK	CD3-HLADR-CD56 <sup>bright</sup> CD16-
Dendritic Cells	CD3-HLADR+CD19-CD14-CD16-
pDC	CD3-HLADR+CD19-CD14-CD16-CD11c-
cDC	CD3-HLADR+CD19-CD14-CD16-CD11c+
Monocytes conventionnels	CD3-HLADR+CD19-CD14+CD16-
Monocytes non conventionnels	CD3-HLADR+CD19-CD14-CD16+
Monocytes intermédiaires	CD3-HLADR+CD19-CD14+CD16+
Granulocytes Basophiles	CD3-HLADR-CD56-CD11b+
ILC CD56-	CD3-HLADR-CD56-CD11b-

Tableau 2 : Marqueurs phénotypiques des 5 populations analysées dans le panel fonctionnel

Population (panel « Fonctionnel »)	Marqueurs
LT CD4+ folliculaires helper	CD19-CD56-CD3+CD4+CXCR5+
LT CD4+ non naïfs	CD19-CD56-CD3+CD4+CXCR5- NON(CD45RA+CCR7+)
LT CD8 non naïfs	CD19-CD56-CD3+CD8+CXCR5- NON(CD45RA+CCR7+)
Monocytes	CD19-CD56-CD3-SSC <sup>high</sup>
NK	CD19-CD56+CD3-
LB	CD19+CD56-CD3-

## Résultats

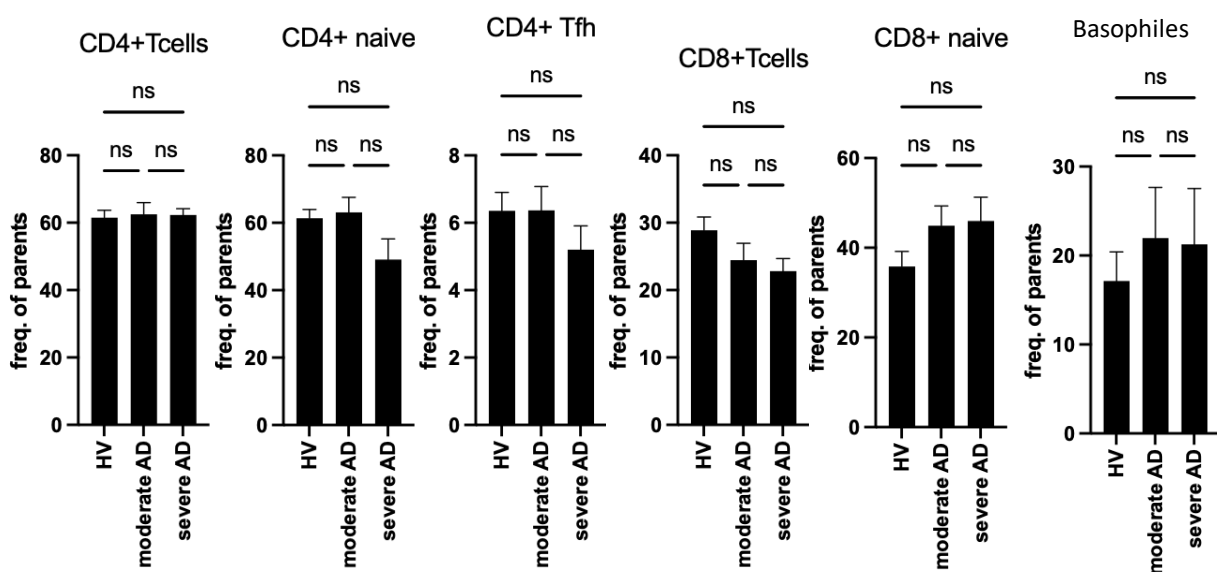
Les échantillons obtenus pour le moment nous permettent d'avoir le phénotype de base des patients atteints de dermatite atopique avant traitement (prise de sang réalisée à leur arrivée à l'hôpital, avant le début des traitements) et serviront de référentiel pour l'analyse des effets des inhibiteurs de JAK.

### Les patients DA sont caractérisés par une diminution des lymphocytes B mémoire et des NK matures en périphérie

Aucune différence significative n'est observée entre le phénotype des cellules périphériques des patients DA modérée et DA sévère ( $p > 0.05$ ). Cependant nous retrouvons des différences significatives entre le phénotype des cellules périphériques des deux groupes de patients DA et des volontaires sains :

Au niveau des NK, la proportion de NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> est augmentée chez les patients atteints de DA modérée et sévère en comparaison des HV ( $P < 0.0001$ ) (Figure 1). Ces NK sont associés à un degré de maturation élevé et un phénotype de cellules activées et fonctionnelles (Romee et al., 2013; Deniz et al., 2015; Abel et al., 2018).

Ces résultats montrent également une diminution de la proportion de lymphocytes B mémoires ayant effectué la recombinaison de classe ou non ainsi que l'augmentation des lymphocytes B naïfs. Cette diminution relative des lymphocytes B mémoire est retrouvée dans la littérature chez des patients atteints de dermatite atopique (Heeringa et al., 2016) mais ne semble pas être commun à toutes les études (Czarnowicki et al., 2016).





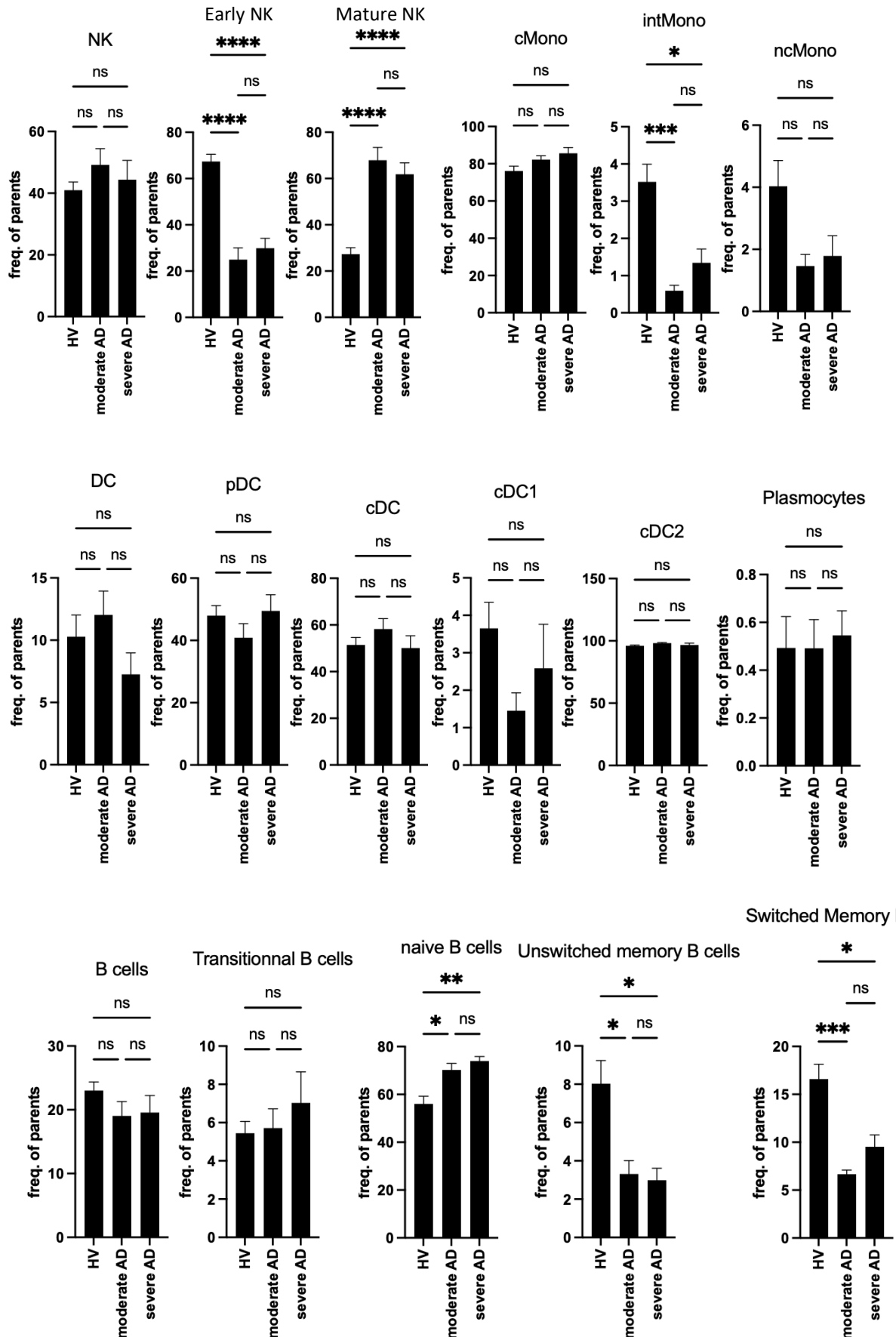


Figure 1 : Profil des principales populations présentes dans le sang des patients atteints de DA modérée à sévère. Les données sont présentées sous la forme de la moyenne  $\pm$  SEM). Les différences sont définies comme statistiquement significatives quand  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) et  $P < 0.0001$  (suite page suivante)

Les lymphocytes B, sont une population dont le profil et la mémoire sont très fortement impactés par les différents événements immunologiques rencontrés par le donneur. Les différences de sévérité de la maladie, le nombre absolu de lymphocytes et la cinétique cellulaire, peuvent expliquer l'écart observé entre les résultats sur de petites cohortes de patients sélectionnés sur des critères différents.

Enfin, ces résultats montrent une diminution significative dans la population de monocytes Intermédiaires (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>), ainsi qu'une diminution non significative des monocytes non conventionnels exprimant le CD16. En relation avec la diminution observée de la population NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup>, il est intéressant de noter que l'on observe une diminution générale de l'expression du CD16 chez les patients atteints de DA, qui ne semble pas dépendre de la sévérité de la pathologie.

#### **Les Cellules productrices d'IL-13 sont distinctes des cellules productrices d'IL-4**

La dermatite atopique se caractérise par une forte production d'IL-13 très bien documentée (Hijnen et al., 2013; Tsoi et al., 2019; Purwar et al., 2006). Comme mentionné en introduction, la sécrétion cytokinique est variable d'une population à l'autre. Nous avons utilisé ces résultats pour visualiser la co-production de six cytokines dans six compartiments : les lymphocytes B, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non naïfs, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> folliculaires helper, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> non naïfs, les cellules NK et les monocytes (Figure 2).

Une analyse en clustering de ces données nous montre tout d'abord l'augmentation des cellules IL-13 positives dans chacune de ces populations chez les patients atteints de dermatite atopique. Ces données nous serviront principalement à caractériser l'effet des inhibiteurs de JAK dans ces populations. D'une façon intéressante, ce n'est pas l'IL-4, mais l'IL-10 qui est fortement coexprimée avec l'IL-13, ce qui rejoint des données sur la forte expression de ces deux cytokines par les cellules périphériques (Aleksza et al., 2002).

En plus de l'analyse des principales populations immunitaires, nous avons ajouté des marqueurs phénotypiques permettant de mieux caractériser chaque cluster, résumés dans le tableau 3. Ces marquages sont illustrés dans les figures 3 à 6. Ces données préliminaires seront plus amplement exploitées pour caractériser l'effet des anti-JAK.

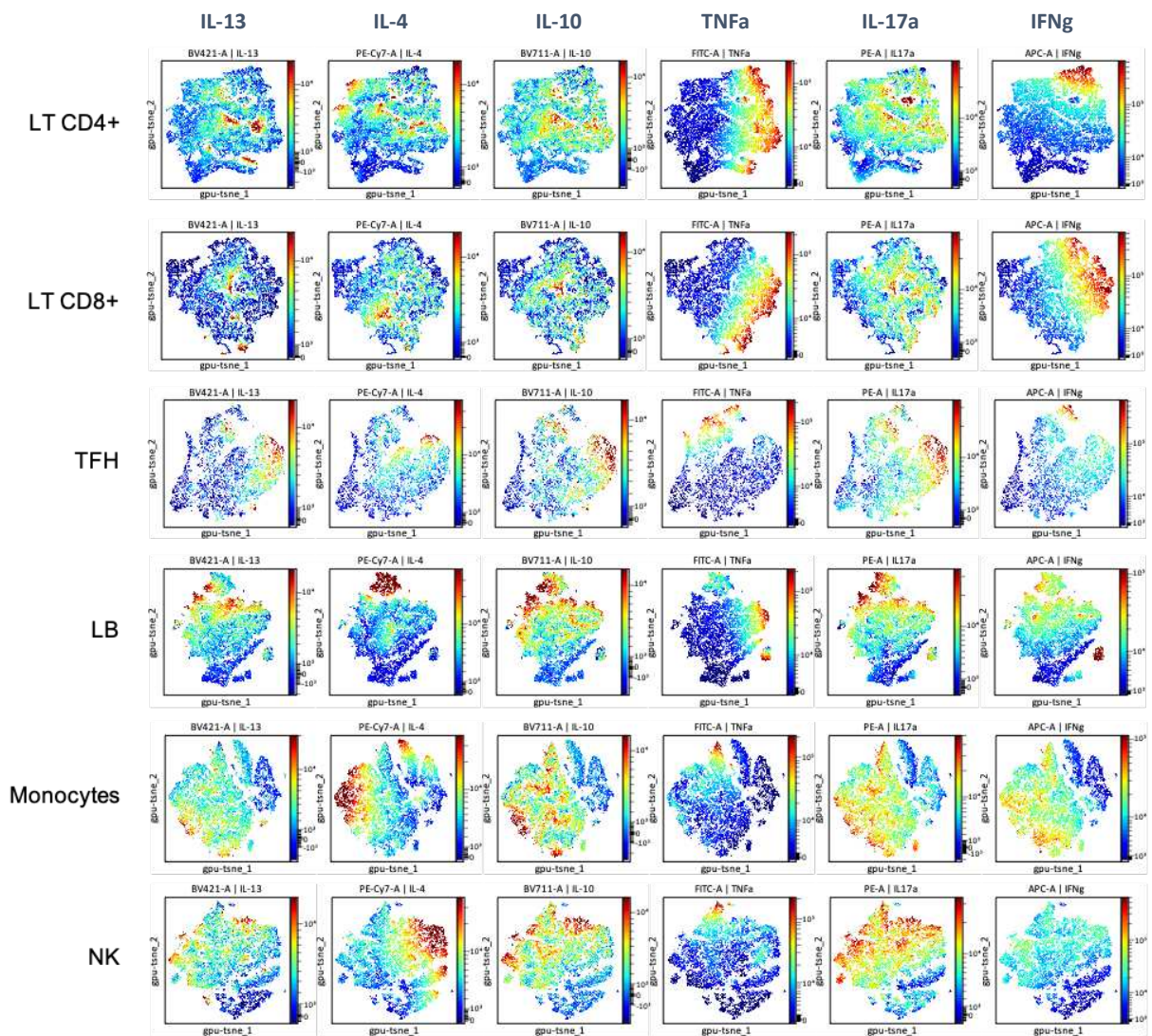


Figure 2 : Profils d'expression cytokinique visualisé par gradient de couleurs en tsne.

Tableau 2 : Marqueurs additionnels analysés dans les différents clusters de chaque population de lymphocytes T, B, NK, monocyte et DC

Cluster	Marqueurs
Lymphocytes T	Ki67, CD69, CD28, CD39, CD57, CCR6, CCR4, CXCR3, CD49a, CD103, PD-1, TIGIT, LAG-3, TIM3, CD137
Lymphocytes B	Ki67, CD9, IL-10, GZMB, PD-L1, IgA, IgM, IgG et IgD
NK	NKG2A, NKG2C, CD158a, CD158b, CD158e1, GZMB, Ki67, IL-10, CD9
Monocytes	Ki67, IL-10, GZMB, PD-L1, CD141, CD11c, CD11b, CD9
DC	Ki67, IL-10, GZMB, CD9, CD11c, CD11b, CD141

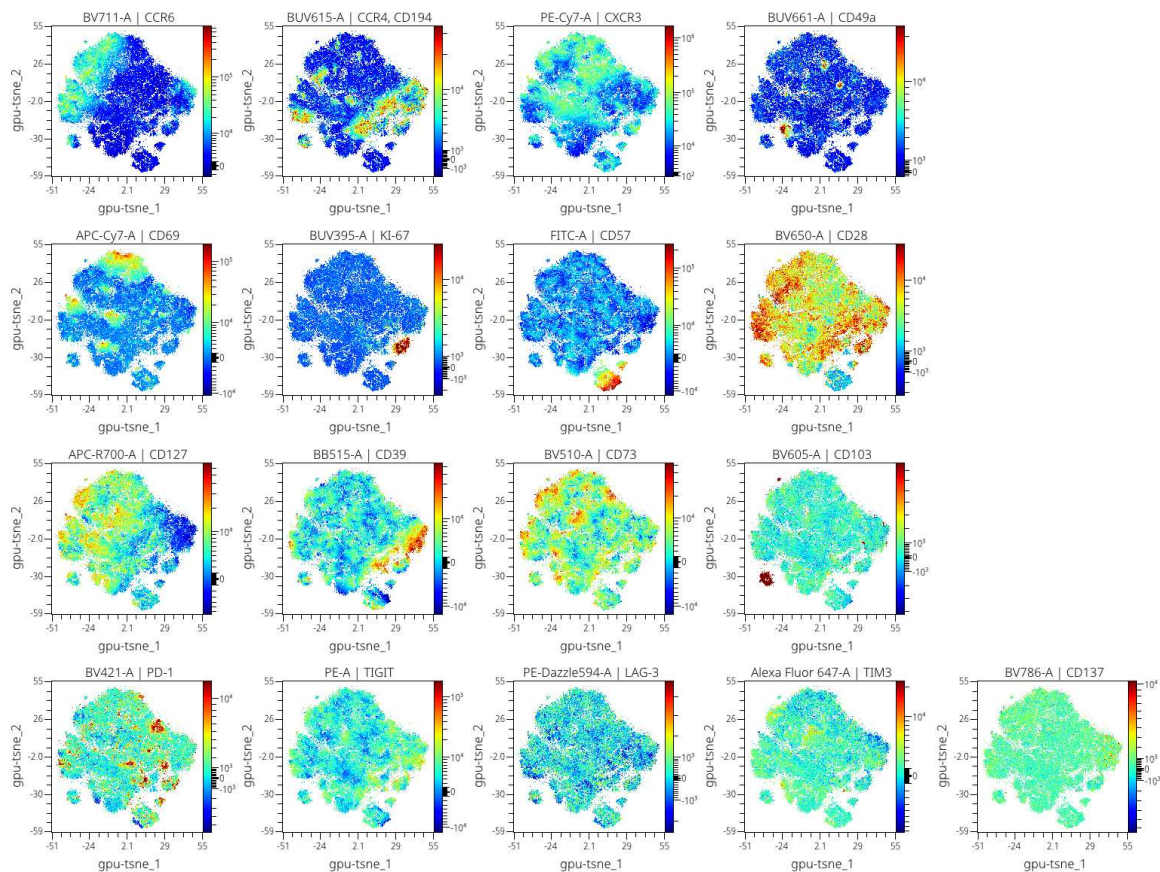


Figure 3 : Exemple des profils d'expression des marqueurs T exprimés ici par les lymphocytes T effecteurs mémoire CD4+ visualisé par gradient de couleur en tsne.

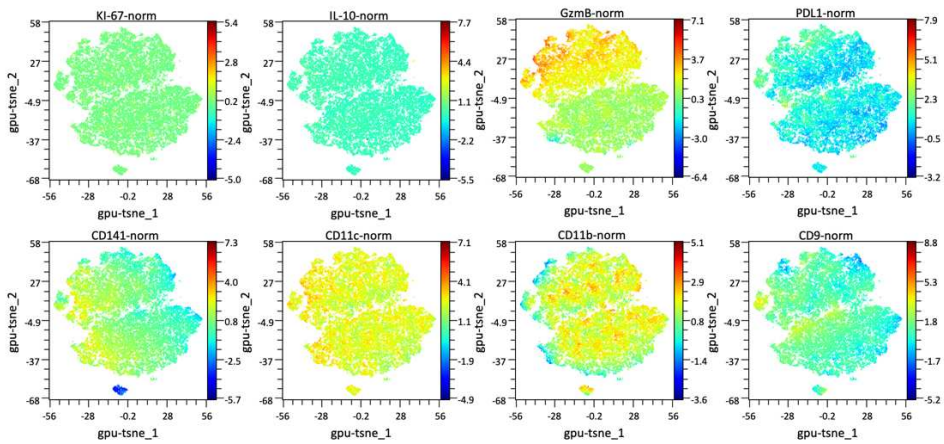


Figure 4 : Exemple des profils d'expression des marqueurs des monocytes exprimés ici par les monocytes conventionnels visualisé par gradient de couleur en tsne.

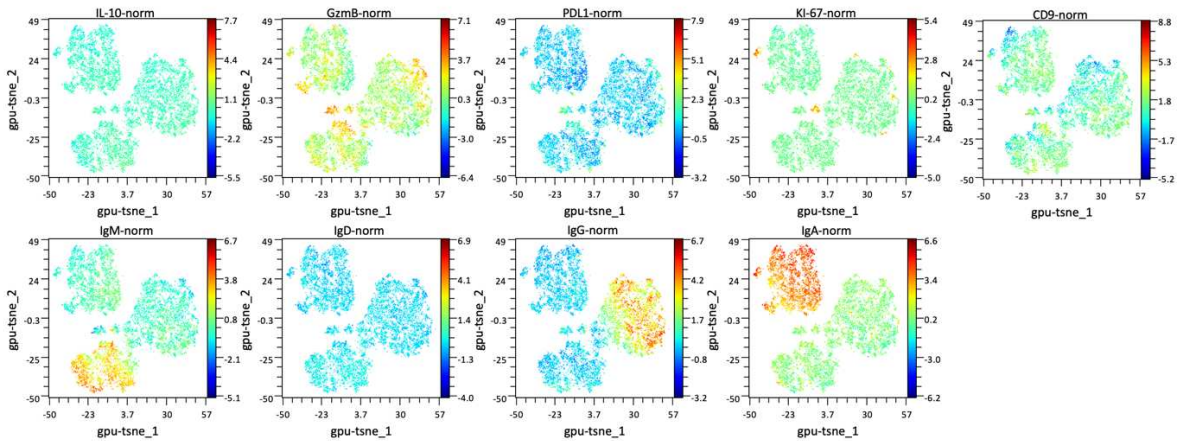


Figure 5 : Exemple des profils d'expression des marqueurs B exprimés ici par le lymphocyte B mémoire ayant effectué une commutation de classe visualisé par gradient de couleur en tsne.

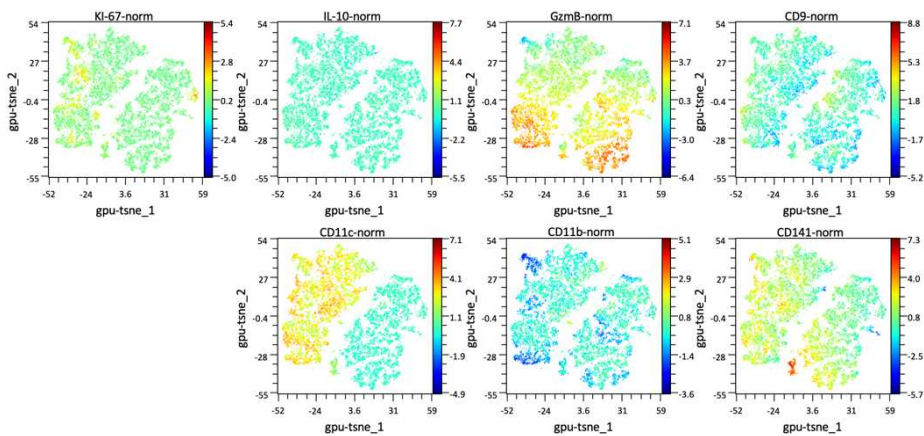


Figure 6 : Profil d'expression des cellules dendritiques visualisé par gradient de couleur en tsne

## Discussion

Nous avons développé un modèle permettant d'observer l'état du système immunitaire au travers de 3 panels de cytométrie spectrale. Deux panels phénotypiques et un panel fonctionnel nous permettent de mesurer l'expression de différents marqueurs impliqués dans la communication cellulaire et l'inflammation avec une précision nous permettant de distinguer la modulation de ces signaux dans des groupes de cellules relativement homogènes. Ce modèle nous permet aussi de retrouver les modulations phénotypiques caractérisées dans la littérature sur la DA à savoir la production d'IL-13 par les lymphocytes T, B, les NK et monocytes et une augmentation du taux de cellules NK matures (CD56<sup>dim</sup>, CD16<sup>-</sup>) dans les NK totaux (Aleksza et al., 2002 ; Romee et al., 2013; Deniz et al., 2015; Abel et al., 2018).

Il existe une forte homologie dans les séquences promotrices de l'IL-4 et de l'IL-13 qui peuvent lier des facteurs de transcription communs tels que les NF-AT, POS1, POS2 et AP-1 (Chomarat and Banchereau, 1998). Cependant, ces deux promoteurs ne sont pas identiques et l'IL-4 et l'IL-13 montrent des réponses différentes suites à l'activation de la protéine kinase C et de la signalisation calcique (Keen et al., 2006). De façon intéressante, dans nos données l'IL-13 et l'IL-4 ne sont pas produits par les mêmes cellules, même au sein des lymphocytes T CD4 qui ont été décrits comme des cellules productrices de ces deux cytokines (Hijnen et al., 2013). Nous arrivons peut-être aux limites de notre modèle nécessitant cette activation PMA/ionomycine (activant la protéine kinase C et la signalisation calcique) pour induire une production cytokinique suffisamment importante pour visualiser la présence d'IL-13 après décongélation. Cependant, cela ne remet pas en cause ce modèle pour caractériser l'effet des inhibiteurs de JAK, puisque cette sécrétion cytokinique nécessite tout de même la polarisation des lymphocytes T dans un axe Th2 pour avoir cette capacité de sécrétion d'IL-4 et d'IL-13. Cette polarisation est dépendante d'une induction plus longue que la restimulation PMA/ionomycine que nous effectuons in vitro (van der Pouw Kraan, et al., 1995; Richards et al., 2000; Nam et al., 2006; Shin et al., 2007). Et c'est cette inhibition de la polarisation dans un axe Th2 par induite par les traitements anti-JAK que nous souhaitons observer avec ce protocole.

## Références

- Abel, A.M., C. Yang, M.S. Thakar, and S. Malarkannan. 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9:1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869.
- Aleksza, M., B. Irinyi, A. Lukacs, P. Antal-Szalmas, J. Hunyadi, and A. Szegedi. 2002. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 147:1135–1141. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.05013.x.
- Chomarat, P., and J. Banchereau. 1998. Interleukin-4 and Interleukin-13: Their Similarities and Discrepancies. *International Reviews of Immunology.* 17:1–52. doi:10.3109/08830189809084486.
- Czarnowicki, T., J. Gonzalez, K.M. Bonifacio, A. Shemer, P. Xiangyu, N. Kunjraiva, D. Malajian, J. Fuentes-Duculan, H. Esaki, S. Noda, Y. Estrada, H. Xu, X. Zheng, J.G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2016. Diverse activation and differentiation of multiple B-cell subsets in patients with atopic dermatitis but not in patients with psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 137:118-129.e5. doi:10.1016/j.jaci.2015.08.027.
- Dakhama, A., M.L. Collins, H. Ohnishi, E. Goleva, D.Y.M. Leung, R. Alam, E.R. Sutherland, R.J. Martin, and E.W. Gelfand. 2013. IL-13-producing BLT1-positive CD8 cells are increased in asthma and are associated with airway obstruction. *Allergy.* 68:666–673. doi:10.1111/all.12135.
- Deniz, G., E. aktas Cetin, N. Akdeniz, S. Baris, Y. Camcioglu, and I.B. Barlan. 2015. Potential Immunoregulatory Roles of Natural Killer Cells in Children with Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 135:AB230. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1685.
- Esaki, H., P.M. Brunner, Y. Renert-Yuval, T. Czarnowicki, T. Huynh, G. Tran, S. Lyon, G. Rodriguez, S. Immaneni, D.B. Johnson, B. Bauer, J. Fuentes-Duculan, X. Zheng, X. Peng, Y.D. Estrada, H. Xu, C. de Guzman Strong, M. Suárez-Fariñas, J.G. Krueger, A.S. Paller, and E. Guttman-Yassky. 2016. Early-onset pediatric atopic dermatitis is T H 2 but also T H 17 polarized in skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 138:1639–1651. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.013.
- Fort, M.M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S.M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S.D. Hurst, G. Zurawski, M.W. Leach, D.M. Gorman, and D.M. Rennick. 2001. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. *Immunity.* 15:985–995. doi:10.1016/S1074-7613(01)00243-6.
- Fuschiotti, P., A.T. Larregina, J. Ho, C. Feghali-Bostwick, and T.A. Medsger. 2013. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism.* 65:236–246. doi:10.1002/art.37706.

- Heeringa, J.J., E. Hajdarbegovic, H.B. Thio, and M.C. van Zelm. 2016. Systemic B-cell abnormalities in patients with atopic dermatitis? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 138:317–318. doi:10.1016/j.jaci.2016.01.038.
- Hijnen, D., E.F. Knol, Y.Y. Gent, B. Giovannone, S. Beijm, T.S. Kupper, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, and R.A. Clark. 2013. CD8<sup>+</sup> T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*. 133. doi:10.1038/jid.2012.456.
- Kaminishi, K., Y. Soma, Y. Kawa, and M. Mizoguchi. 2002. Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN- $\gamma$  expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *Journal of Dermatological Science*.
- Kanwal, S., S.K. Singh, S.P. Soman, S. Choudhury, P. Kumari, P.K. Ram, and S.K. Garg. 2021. Expression of barrier proteins in the skin lesions and inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of atopic dogs. *Sci Rep*. 11:11418. doi:10.1038/s41598-021-90992-z.
- Keen, J.C., A. Cianferoni, G. Florio, J. Guo, R. Chen, J. Roman, M. Wills-Karp, V. Casolaro, and S.N. Georas. 2006. Characterization of a novel PMA-inducible pathway of interleukin-13 gene expression in T cells. *Immunology*. 117:29–37. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02260.x.
- Machura, E., B. Mazur, M. Rusek-Zychma, and M. Barć-Czarnecka. 2010. Cytokine Production by Peripheral Blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells in Atopic Childhood Asthma. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010:1–11. doi:10.1155/2010/606139.
- Malefyt, R. de W., J.S. Abrams, S.M. Zurawski, J.-C. Lecron, S. Mohan-Peterson, B. Sanjanwala, B. Bennett, J. Silver, J.E. de Vries, and H. Yssel. 1995. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>0, T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol*. 7:1405–1416. doi:10.1093/intimm/7.9.1405.
- Nam, K., S. Shin, and H. Lee. 2006. Cross-linking of 4-1BB up-regulates IL-13 expression in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes☆. *Cytokine*. 33:87–94. doi:10.1016/j.cyto.2005.12.003.
- van der Pouw Kraan, T., L. Boeijs, J. Troon, S. Rutschmann, J. Wijdenes, and L. Aarden. 1995. Human IL-13 Production is Negatively Influenced by CD3 Engagement.
- Purwar, R., T. Werfel, and M. Wittmann. 2006. IL-13-Stimulated Human Keratinocytes Preferentially Attract CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T cells: Possible Role in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 126:1043–1051. doi:10.1038/sj.jid.5700085.
- Richards, D.F., M. Fernandez, J. Caulfield, and C.M. Hawrylowicz. 2000. Glucocorticoids drive human CD8<sup>+</sup> T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur. J. Immunol*. 11.
- Romee, R., B. Foley, T. Lenvik, Y. Wang, B. Zhang, D. Ankarlo, X. Luo, S. Cooley, M. Verneris, B. Walcheck, and J. Miller. 2013. NK cell CD16 surface expression and function is



- regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 121:3599–3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397.
- Shibui, A., A. Takamori, M.E.M. Tolba, A. Nambu, E. Shimura, S. Yamaguchi, C. Sanjoba, H. Suto, K. Sudo, K. Okumura, S. Sugano, H. Morita, H. Saito, K. Matsumoto, and S. Nakae. 2016. IL-25, IL-33 and TSLP receptor are not critical for development of experimental murine malaria. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 5:191–195. doi:10.1016/j.bbrep.2015.12.007.
- Shin, S.M., Y.H. Kim, B.K. Choi, P.M. Kwon, H.-W. Lee, and B.S. Kwon. 2007. 4-1BB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 81:1455–1465. doi:10.1189/jlb.1006619.
- Suga, H., and S. Sato. 2019. Novel topical and systemic therapies in atopic dermatitis. *Immunological Medicine*. 42:84–93. doi:10.1080/25785826.2019.1642727.
- Tsoi, L.C., E. Rodriguez, F. Degenhardt, H. Baurecht, U. Wehkamp, N. Volks, S. Szymczak, W.R. Swindell, M.K. Sarkar, K. Raja, S. Shao, M. Patrick, Y. Gao, R. Uppala, B.E. Perez White, S. Getsios, P.W. Harms, E. Maverakis, J.T. Elder, A. Franke, J.E. Gudjonsson, and S. Weidinger. 2019. Atopic Dermatitis Is an IL-13–Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 139:1480–1489. doi:10.1016/j.jid.2018.12.018.
- Yang, Z., V. Grinchuk, J.F. Urban, J. Bohl, R. Sun, L. Notari, S. Yan, T. Ramalingam, A.D. Keegan, T.A. Wynn, T. Shea-Donohue, and A. Zhao. 2013. Macrophages as IL-25/IL-33-Responsive Cells Play an Important Role in the Induction of Type 2 Immunity. *PLoS ONE*. 8:e59441. doi:10.1371/journal.pone.0059441.

---

Caractérisation transcriptomique, phénotypique et fonctionnelle du lymphocyte B  
régulateur exprimant le granzyme B

---

**Les cellules B régulatrices humaines empêchent la prolifération des cellules T CD4+CD25-  
par un mécanisme dépendant du Granzyme B et de la Lymphotoxine- $\alpha$ .**

**Human Regulatory B cells prevent CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism  
dependent from Granzyme B and Lymphotoxin- $\alpha$ .**

Nicolas Sailliet, Hoa Mai, Amandine Dupuy, Gaëlle Tilly, Cynthia Fourgeux, Martin Braud,  
Magali Giral, Jean-Michel Robert, Nicolas Degauque, Richard Danger, Jeremie Poschmann  
and Sophie Brouard

(Article soumis)

**Introduction**

Les lymphocytes B sont des acteurs clés dans différentes situations pathologiques. Grâce à leur capacité à produire des anticorps, des cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à exprimer le CMH et les molécules costimulatrices, ils sont capables de conduire et de maintenir la réponse immunitaire. Cependant, au cours de la dernière décennie, il existe de plus en plus de preuves de l'existence de cellules B ayant des propriétés suppressives, également appelées cellules B régulatrices (Bregs). Les cellules B productrices d'IL-10 ont été les premières à être décrites dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale comme un modulateur des réponses Th1 pathogènes. Ce sous-ensemble de Breg s'est ensuite révélé être protecteur contre la polyarthrite rhumatoïde chez la souris et chez l'homme. In vitro, les cellules B productrices d'IL-10 ont des fonctions suppressives sur différents sous-ensembles de cellules immunitaires, notamment les cellules T, les cellules dendritiques et les monocytes, et en favorisant la prolifération des Tregs. Les cellules B exprimant le granzyme B (GZMB+Bregs) sont une autre population de Bregs, décrite plus récemment chez l'homme dans des situations de cancer, de maladies auto-immunes et d'infection par le VIH. Nous avons rapporté que les GZMB+Bregs étaient augmentés en transplantation dans une situation de tolérance chez l'homme en transplantation rénale et nous avons montré qu'ils jouent également un rôle chez les volontaires sains (HVs) où ils sont impliqués dans l'homéostasie de la réponse immunitaire. Les GZMB+Bregs ont démontré des propriétés suppressives sur les cellules T effectrices CD4+CD25-, en inhibant leur prolifération et leur production de cytokines. En tant que cellules B productrices d'IL-10, elles peuvent produire de l'IL-10 lors

d'une stimulation mais l'IL-10 n'est pas impliquée dans leurs propriétés suppressives. Nous avons rapporté que ce sous-ensemble de cellules Breg était dépendant de la protéine GZMB puisque les inhibiteurs de GZMB ont partiellement restauré la prolifération des cellules T CD4+CD25- dans des essais de coculture. Néanmoins, cette restauration n'était que partielle et aucun marqueur spécifique autre que la GZMB n'a jusqu'à présent été identifié pour ce sous-ensemble comme pour les autres Bregs.

Dans cet article, nous avons caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement la population de GZMB+Bregs dans les HVs. Nous avons analysé le transcriptome des GZMB+Bregs au niveau de la cellule unique et avons constaté qu'ils présentent un profil d'expression génique spécifique et différentiel, principalement associé à la prolifération cellulaire, au profil apoptotique et au métabolisme, un enrichissement en IgG2 et IgG3, une diminution en IgD et IgM et une présentation antigénique altérée en accord avec leur profil de cellules B différenciées. Nous avons analysé l'impact des GZMB+Bregs sur le transcriptome des cellules T effectrices CD4+CD25- après la coculture et avons révélé que les cellules T effectrices étaient caractérisées par une forte régulation des gènes associés à la prolifération des cellules T, à l'apoptose et au métabolisme. Enfin, nous avons identifié et démontré que la Lymphotoxine alpha (LTA) est un nouveau ligand des GZMB+Bregs non seulement impliqué dans l'induction des GZMB+Bregs mais aussi dans leurs propriétés suppressives sur les cellules T.

**Human regulatory B cells prevent effector CD4+CD25- T cell proliferation through a mechanism dependent from granzyme B and lymphotoxin alpha**

Nicolas Sailliet<sup>1</sup>, Hoa Mai<sup>1</sup>, Amandine Dupuy<sup>1</sup>, Gaëlle Tilly<sup>1</sup>, Cynthia Fourgeux<sup>1</sup>, Martin Braud<sup>1</sup>, Magali Giral<sup>1</sup>, Jean-Michel Robert<sup>2</sup>, Nicolas Degauque<sup>1</sup>, Richard Danger<sup>1\*</sup>, Jeremie Poschmann<sup>1\*</sup> and Sophie Brouard<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CHU Nantes, Nantes Université, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology (CR2TI), UMR 1064, ITUN, Nantes, France

<sup>2</sup> Institut de Recherche en Santé 2, Cibles et Médicaments des Infections et de l'Immunité IICiMed-UR1155, Nantes Université, 22, Boulevard Bénoni-Goullin, F-44000 Nantes, France;

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

**Running Title:** GZMB+Bregs single cells analysis

**Key Words:** regulatory B cell, regulation, single cell RNAseq, tolerance, GZMB, LTA

**Abbreviation:**

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

GZMB: Granzyme B

scRNAseq: single cell RNA sequencing

Bregs: Regulatory B cells

GZMB+Bregs: regulatory B cells expressing Granzyme B

HVs: Healthy volunteers

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

CPD: Cell Proliferation Dye

MCP: Modified Citrus Pectin

DEG: Differentially Expressed Gene

NES: Normalized Enrichment Score

LTA: Lymphotoxin alpha

LTB: Lymphotoxin beta

HMGB2: High Mobility Group Box 2

MIF: Macrophage migratory Inhibition Factor

GAL3: Galectin-3

**Acknowledgments:** Nicolas Sailliet was supported by a Cifre contract with CEVA santé animale. This work was supported in the context of the LabEX IGO thanks to French government financial support managed by the National Research Agency via the “Investment into the Future” program (ANR-10-IBHU-005 and ANR-11- LABX-0016-01). We wish to thank the biological resource center for biobanking (CHU Nantes, Nantes Université, Centre de Ressources Biologiques (BB-0033-00040), F-44000 Nantes, France). We also thank Pierre-Emmanuel Imbert and Xavier Lebreton for technical assistance, Louis Boutin (UMR 942) and Christos Chadjichristos (UMR 1155) who kindly donated the MCP. We are most grateful to the Genomics Core Facility **GenoA**, member of Biogenouest and France Genomique and to the Bioinformatics Core Facility **BiRD**, member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support.

**Author Contributions:** SB and NS designed the study. NS, AD, HLM, GT, CF and MB carried out the experiments. NS, SB, JP, RD analyzed the data. ND, SB, JP, RD, MG and JMR drafted and revised the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

**Disclosures:** The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

## **Summary**

Human Granzyme B (GZMB) regulatory B cells (Bregs) suppress CD4<sup>+</sup> effector T cells by a mechanism partially dependent on GZMB. GZMB Bregs may be induced in vitro making them interesting for cell therapy. Herein we characterize this population using single cell transcriptomics. Bregs exhibit a unique set of 149 of genes involved in proliferation, apoptosis, metabolism and altered antigen presentation capacity consistent with their differentiated B cells profile. Bregs or total B cells were co-cultured with T cells and gene expression analysis was used to identify receptor ligand interactions and to reveal gene expression changes in the T cells. Bregs induced a strong inhibition of T cell genes associated to proliferation, activation, inflammation and apoptosis compared to total B cells. Finally, we identified Lymphotoxin alpha (LTA) as new potent Breg ligand implicated in Breg suppressive properties with direct effect on GZMB.



## Introduction

B lymphocytes are key players in different pathological situations. With their ability to produce antibodies (Nutt et al., 2015), pro-inflammatory cytokines (Vazquez et al., 2015) as well as to express MHC and costimulatory molecules (Chen and Jensen, 2008), they are able to drive and maintain immune response (Afzali et al., 2020). However, over the last decade, there are increasing evidences of the existence of B cells with suppressive properties, also known as regulatory B cells (Bregs) (Kim et al., 2015). IL-10 producing B cells were the first to be described in mice model of experimental autoimmune encephalomyelitis as a modulator of the pathogenic Th1 responses (Fillatreau et al., 2002). This Breg subset was later found to be protective against rheumatoid arthritis in mouse (Mauri et al., 2003) and human (Iwata et al., 2011). In vitro, IL-10 producing B cells have suppressive functions on different immune cell subsets including T cells, dendritic cells and monocytes and by promoting Tregs proliferation (Rosser and Mauri, 2015). Granzyme B expressing B cells (GZMB+Bregs) are another population of Bregs, described more recently in human in situations of cancer (Jahrsdörfer et al., 2006; Lindner et al., 2013), auto-immune diseases (Hagn et al., 2010), HIV infection (Kaltenmeier et al., 2015). We reported that GZMB+Bregs were increased in transplantation in a situation of tolerance in human in kidney transplantation (Chesneau et al., 2015) and we showed that they also play a role in healthy volunteers (HVs) where they are involved in the homeostasis of the immune response (Chesneau et al., 2015). GZMB+Bregs have demonstrated suppressive properties on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells, by inhibiting their proliferation and production of cytokines (Chesneau et al., 2015, 2020). As IL-10 producing B cells, they can produce IL-10 upon stimulation but IL-10 is not involved in their suppressive properties. We reported that this Breg cell subset was dependent on GZMB protein since GZMB inhibitors did partially restore CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell proliferation in coculture assays (Chesneau et al., 2015). Nevertheless, this recovery was only partial and no specific marker other than GZMB has so far been identified for this subset as for other Bregs (Chesneau et al., 2015; Dubois et al., 2020a).

In this paper, we phenotypically and functionally characterized the population of GZMB+Bregs in HVs. We analyzed the transcriptome of GZMB+Bregs at single cell level and found that they exhibit a specific and differential gene expression profile, mainly associated with cell proliferation, apoptotic and metabolism profile, an enrichment in IgG2 and IgG3, a decrease

in IgD and IgM and an impaired antigen presentation in accordance with their differentiated B cells profile. We analyzed the impact of GZMB+Bregs on CD4+CD25- effector T cell transcriptome after coculture and revealed that effector T cells were characterized by strong regulation of genes associated with T cells proliferation, activation, IFN pathway, inflammation and apoptosis. Finally, we identified and evidenced that Lymphotoxin alpha (LTA) is a novel ligand of GZMB+Bregs not only involved in induction of GZMB+Bregs but also in their suppressive properties on T cells with a direct induction of GZMB expression.

## **RESOURCE AVAILABILITY**

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar, 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE224461 as of the time of publication. Accession number are listed in the key resources table.

This paper does not report original code.

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

## **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

Deidentified human blood was obtained from healthy adult donors (Etablissement Français du sang, Nantes, France, n = 18). All samples were obtained under informed consent and in accordance with EFS policies. The procedures described in this manuscript were approved by the French « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » (MESR) and « Comité de Protection des Personnes » (CPP) (n°DC-2011-1399).

## **METHOD DETAILS**

### **Samples and cell isolation**

Fresh human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from whole blood from HVs using Ficoll gradient centrifugation using standard procedures. Following red blood cell lysis, cells were frozen in Fetal Calf Serum 10% DMSO in 10m/mL cryovials at -80°C using Corning CoolCell for 24h and at -150°C until experiments.

### **Culture medium preparation**

All cultures were made in RPMI 1640 containing 10% Fetal Calf Serum, 2mM L-Glutamine, 100U/mL penicillin / streptomycin.

### **Induction of GZMB+Bregs**

B cells were enriched using Human B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). Separations were performed on an AutoMACS pro Separator following supplier instructions. GZMB+Bregs being a scarce population in HVs with no specific signature, we separated the B cells in two fractions. The first one was left unstimulated in complete medium without stimulation for 72h at 37°C 5%CO<sub>2</sub>, and the second one was used to induce GZMB expression as previously described (Chesneau et al., 2021) : CpG ODN 2006 [1µg/mL] (Invivogen), soluble rhCD40L [50ng/mL]

(R&D systems), rhIL-2 [50IU/mL] (Proleukine – Novartis), rhIL-21 [10ng/mL] (R&D systems), anti-human IgG/A/M F (ab)<sup>2</sup> [5µg/mL] (Jackson ImmunoResearch)) in complete medium in 6-well plates at 10<sup>6</sup> cells/mL for 72h at 37°C 5%CO<sub>2</sub>. According to this protocol, >95% GZMB+Bregs express GZMB and display suppressive activity (Chesneau et al., 2021). In the following experiments, these cells are thus referred as GZMB+Bregs vs their non-Bregs counterpart.

### **B/T cell Coculture experiments**

Bregs induction protocol was modified not to exceed 4 days of culture as keeping cells without stimulation for prolonged times is deleterious for their survival. On the second day of the induction of GZMB+Bregs culture, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells were enriched from overnight resting PBMCs (10m/mL, 4°C, complete RPMI) by two subsequent negative selections using CD4 T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) and CD25<sup>+</sup> Microbeads II (Miltenyi Biotec). Separations were performed on an AutoMACS pro Separator following supplier instructions. Autologous purified T cells were then activated with anti-CD3/anti-CD28 dynabeads (beads to T cell ratio of 1:1, Invitrogen), and then incubated for 3 days at 37°C 5% CO<sub>2</sub> with or without non-Bregs or GZMB+Bregs washed from their stimulation cocktail. Cocultures were performed in 96-well plate in 150µL with 5.10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells and either 10<sup>5</sup> resting B cells, 10<sup>5</sup> GZMB+Bregs or control media. The suppressive properties of GZMB+Bregs was assessed by the analysis of the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. T cells alone were used also as control for basal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cell transcriptome. For RNAseq studies, we collected 48 wells of T cells alone, 36 wells of T cells/resting B cells and 36 wells of T cells/enriched GZMB+Bregs per donor.

### **Cell multiplexing and single cell RNA sequencing**

scRNAseq using the CITE-seq method (Stoeckius et al., 2018) was essentially carried out as described in Abidi et al. (Abidi et al., 2020). For each experiment, cells were marked with viability dye (Fixable Viability Dye eFluor 450, 1/1000 in PBS without azide or protein, Invitrogen) for 25 min. Living cells were sorted on an ARIA III (BD Biosciences) and marked with conjugated DNA sequences (HashTag Oligonucleotide, HTO, Chromium Single Cell 3' Feature Barcode Kit, PN-1000079) specific of the donor and the experimental condition following CITE-seq protocols (Stoeckius et al., 2018). Cells were then pooled with similar amounts and 20 000 total cells were loaded onto a Chromium controller (10X genomics) (Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit v3.1, ref PN-1000121; Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit, ref PN-1000120). Libraries were then prepared and sequenced on a Nova-Seq

6000 (Illumina) at the GenoBird platform (IRS-UN, CHU Nantes). Raw reads were analyzed using FastQC for quality controls and were then processed using CellRanger pipeline (v3.1.0 with default parameters). Generated FASTQ files were aligned to the reference genome GRCh38 using the aligner STAR.

### **scRNA-seq analysis**

Analysis was performed using R (version 4.0.4) and Rstudio (version 1.3.1056). Data was further analyzed using the Seurat package (Hao et al., 2021) (v4.0.2) for the demultiplexing and pre-processing steps. Briefly, cells with less than 200 genes and more than 4000 genes or 25% of mitochondrial genes were excluded. SingleR v1.4.1 was used to identify cells and clusters according to phenotypes as described in the Human Primary Cell Atlas for cocultures (Aran et al., 2019).

Differential gene expression was calculated with Seurat (Hao et al., 2021) v4.0.2 and MAST (Finak et al., 2015) v1.16.0. To only retain genes that were robustly expressed, differential gene expression was calculated only for genes expressed in at least in 20% of cells in one of the two groups (GZMB+Breg and non-Breg cells) retaining 5901 genes. The rationale for choosing a log<sub>2</sub> foldchange cut-off to define differentially expressed genes (0.58) was to use at least the same or higher log<sub>2</sub> fold change than GZMB expression since this is how these cells were defined in the first place.

Gene ontology analysis was performed with clusterProfiler (Wu et al., 2021). Gene set Enrichment Analysis (GSEA) was performed with all gene sets from the Hallmark, C3, and C5 libraries of the Molecular signature Database from Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). Receptor ligand analysis was performed with nichenet (Browaeys et al., 2020) v1.0.0 using default parameters with B cells as sender cells and T cells as receiver cells.

### **Gene expression validation**

B cells were purified using StraightFrom® Whole Blood CD19 MicroBeads and cultured for 3 days using an activation cocktail ( CpG ODN 2006 [2.5µg/mL], CD40L [50ng/mL], rhIL-2 [50IU/mL], anti-human IgG/A/M F (ab)'2 [2µg/mL]) or a GZMB differentiation cocktail (Chesneau et al., 2020) (CpG ODN 2006 [1µg/mL], CD40L [50ng/mL], rhIL-2 [50IU/mL], rhIL-21 [10ng/mL], anti-human IgG/A/M F (ab)'2 [5µg/mL]). Cell pellets were resuspended in RLT buffer (Qiagen) containing 1% β-mercaptoethanol before subsequent RNA extraction using a RNeasy Micro Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). RNA quality and

quantity were assessed by spectrometry (Nanodrop) and electrophoresis (Agilent RNA 6000 Pico Kit). Transcriptomic profiling was performed using nCounter-Human-Immunology-V2 Panel and nCounter SPRINT Profiler. Gene expression data analysis was performed using the nSolver Analysis Software (v4.0). Only reference genes with expression levels less than 2-fold in as compared to pre-culture settings were used for the normalization (*ABCF1*, *EEF1G*, *POLR2A*, *PPIA*, *RPL19*, *SDHA*, *TBP*).

### **Western blots**

Validation of gene expression in GZMB+Bregs was performed by western blotting from GZMB+Bregs or non-Bregs. After GZMB+Bregs induction cultures, cells were washed 3 times in PBS and lysed in 1X RIPA solution with protease inhibitors (ThermoFisher scientific) on ice for 30 minutes followed by a thermal shock. 10µg total protein samples in 15µ LPBS + 5µL Laemmli buffer 4X (Bio-Rad, Cat#1610747) were heated for 5 minutes at 95°C and then separated by SDS-PAGE with 2.5µL DTT (Bio-Rad, Cat #16106747) 4-20% gels (mini-PROTEAN® TXG™ Precast Protein Gels, Bio-Rad, Cat #4561093). Total proteins were transferred to a nylon membrane using the TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Cat #1704150). Membrane was saturated with a solution of Tris-buffered saline 0.1% Tween 5% milk at 4°C overnight. immunoblotting was then performed for MIF (1:500) (Cat #PA5-81446; Invitrogen), Galectin-3 (1:1000) (Cat #14-5301-81; Invitrogen), lymphotoxin-α (1:500) (Cat #PA5-116055; Invitrogen) and GAPDH (1:10000) (Cat #G8795, Sigma-Aldrich) was performed (2h, room temperature). After 3 washes in TBS-Tween 0.1%, membranes were incubated with secondary antibodies for 1h at room temperature. Revelation was performed with the superSignal West Atto kit (ThermoFisher Scientific, Cat #A38554) on a Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Cat #17001402).

### **LTA and GAL3 inhibition assays**

To evaluate LTA and GAL3 pathways in GZMB+Bregs function, we used the coculture model with CPD-labeled CD4+CD25- effector T cells (CPD eF450, ThermoFisher scientific). T cell proliferation was evaluated as the percentage of CPD<sup>low</sup> T cells on day 3 by flow cytometry. To study the roles of different signaling pathways in the suppressive effect of B cells, different inhibitors, including GZMB inhibitor (GZMB inhibitor IV, Calbiochem Research Biochemicals), Galectin-3 inhibitor (MCP, EcoNugenics, kindly donated by Louis Boutin (UMR 942)), and Lymphotoxin-α inhibitor (Pateclizumab, Absolute Antibody), were added either during the B cell pre-stimulation, during the coculture or in both steps. When not specified, all inhibitors

were used at 10µg/mL. The activity of the inhibitors was also assessed on GZMB expression by B cells expression of GZMB (anti-GZMB PECy7-conjugated antibody, Biolegend) and the proliferation of GZMB+Bcells (CPD eF450, ThermoFisher scientific) in the 3-days culture model.

### **Statistical analysis**

Differentially Expressed Genes (DEG) p values were calculated by the using `seurat` `FindMarkers` function using a hurdle model tailored to scRNAseq data from `MAST` R package ( on R. Cytometry data were analyzed with `flowJo` v10. Western blot data were quantified using `ImageJ` (Schneider et al., 2012). One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons and  $\chi^2$  were performed with `GraphPad Prism 9`. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). P values were adjusted to the number of tests using FDR adjustment. Data are presented as mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEM)

## Results

### **GZMB+Bregs are skewed toward a differentiated plasmablasts/plasma cell phenotype**

We first characterized the transcriptomic phenotype of GZMB+Bregs at the single cell level (Figure 1A). Sorted total B cells were activated with a cocktail specifically triggering B cells toward a GZMB+Breg phenotype (IL-2, IL-21, anti-human IgG+A+M, CpG, CD40L) as previously described (Chesneau et al., 2021) or left unstimulated. After 3 days, scRNAseq was performed on living cells to characterize the transcriptome of enriched GZMB+Bregs (>95% GZMB+Bregs) compared to unstimulated B cells containing more than 99% non-Bregs (Chesneau et al., 2020) (see methods). Experiments were conducted using blood from 4 HVs in three different experiments. After QC and doublet removal, a total of 3,570 cells were used for the analysis. The three datasets were combined using reciprocal PCA to reduce batch effect, read counts were normalized and scaled. After clustering and dimensional reduction using UMAP, batch integration was successful as all three runs were well integrated, i.e., neither of the three batches formed isolated clusters (Figure 1B). Interestingly, 99% of stimulated cells clustered together, with less than 5% of unstimulated cells (Figure 1C) indicating that they display an inherent distinct transcriptomic profile. B cells were manually annotated, based on the proportions of unstimulated total B cells and enriched GZMB+Bregs in each cluster (Figure 1D). To further explore whether there are B cell subtypes present in the two large clusters, additional clustering was performed resulting in 5 non-Bregs clusters (0, 1, 4, 7, 9) and 5 GZMB+Bregs clusters (2, 3, 5, 6, 8) (Figure 1E). Based on marker gene expression, three subpopulations were determined in non-Bregs: naïve B cells expressing *TCL1A* and *IGHD*, coding for the heavy chains for IgD, but not *CD27*; memory B cells expressing *CD27* and the heavy chains for IgG and IgA (*IGHG1* and *IGHA1*, respectively) and a small cluster of plasmablasts/plasma cells expressing *CD27*, *XBP1* and *IRF4* (Figure 1F). The same three subpopulations were identified in GZMB+Bregs, indicating that the three B cell subtypes are present in both, GZMB+Breg and non-Bregs (Figure 1G). We next quantified the relative proportions of the three subtypes in both conditions and revealed that GZMB+ Bregs were highly enriched (Fold change= 4.7, Statistical test  $\chi^2$ , p-value < 0.0001) in plasmablasts/plasma cells, suggesting that GZMB+Bregs are skewed towards a differentiated B cell profile (Figure 1H).



## **GZMB+Bregs harbor a specific transcriptional profile involved in proliferation and metabolism, decreased B cell activation as well as antigen presentation**

To identify what distinguishes the GZMB+Bregs from non-Breg cells a differential gene expression analysis was performed to identify gene signatures associated with GZMB+Bregs (see Methods). 149 genes were differentially expressed between GZMB+Bregs and non-Bregs cells with 104 genes up and 45 down in GZMB+Bregs (FDR Q-value < 0.05, Figure 2A). Top differential genes are shown in the form of violin plots to reveal their distribution of expression across cells (Figure 2B). Among the most downregulated genes, *CD37*, *CD79B* and *CD74* are surface receptors. *PNRC1* and *KLF2* are transcription modulators, all associated to lymphoid cell activation whereas the upregulated genes in GZMB+Bregs (*KI67*, *CCND2*, *HMGB2*, *LGALS1* and) are associated with cell proliferation and chemotaxis. Next, we investigated specifically the differential expression of cell surface markers. Notably, we found 3 (*ENTPD1*, *IL2RA* and *IGHG3*) and 14 (*EVI2B*, *CD37*, *CD52*, *CD74*, *CD79A*, *CD79B*, *TNFRSF13C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DRA*, *IGKC*, *CXCR4*, *FCMR*, *ITM2B*) surface markers genes that were respectively up- and down-regulated in GZMB+Bregs vs non-Breg cells, indicating that the phenotypic display of surface markers is drastically altered in GZMB+Bregs (Figure 2C). We note that B cell markers reported by us and other groups previously described to be associated with different subpopulations of Bregs (Rosser and Mauri, 2015; Lee et al., 2014; Kessel et al., 2012, 25), such as *GZMB*, *IL2RA* coding for CD25, *TGFB1* and *EBI3* (coding for a chain of IL-35) were found significantly overexpressed in GZMB+Breg clusters, showing consistency between prior results and single cell transcriptome (Figure 2D). We note that other previously reported genes such as IL-10, *CD274*, *TIGIT*, and *IL12A* (the other chain of IL-35) were expressed in less than 5% of GZMB+Bregs (Figure 2D), which may be due to technical limitations of scRNA-seq or differences between mRNA and protein expression.

In order to better characterize GZMB+Bregs gene expression, pathway enrichment analysis was performed on the 149 genes specific of GZMB+Bregs focusing on known pathways and functions using gene ontology analysis. The gene ontologies associated with the 104 up- and 45 downregulated genes of the GZMB+Breg signature were reduced in a list of non-redundant terms (Figure S1). Among the most enriched and recurrent terms, GZMB+Breg signature was found to be enriched for cell cycle (*NUSAP1*, *SMC2*, *MKI67*, *PTTG1*, *SMC4*, *RAN*, *UBE2C*, *TPX2*, *CENPF*, *RANBP1*, *UBE2S*), metabolism (*GAPDH*, *TPI1*, *ENO1*, *LDHA*, *DDIT4*, *PGK1*, *ALDOC*), cellular response to interferon-gamma (*ACTG1*, *GAPDH*, *GBP2*, *VIM*, *STAT1*,

*HSP90AB1*) (Figure 2E) whereas downregulated genes were associated with B cell activation (*CD74*, *CD79A/B*, *PRKCB*, *TNFRSF13C*, *ZFP36L2*, *IGKC*, *BANK1*) and MHC class II antigen presentation (*CD74*, *HLA-DRA*, *HLA-DRB1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DMB*) (Figure 2F). To further tease out specific gene expression profiles associated to the three sub-populations, differential gene expression between GZMB+Bregs and non-Breg were performed on the naive, memory and plasmablasts/plasma cell subclusters separately. There was a downregulation of genes associated with antigen presentation, B cell activation and metabolism in all three GZMB+Bregs subtypes. Interestingly, only the genes associated with cell cycle (i.e., nuclear division) were found specifically enriched in the plasmablasts/plasma cells, in accordance with the high proliferative ability of plasmablasts (Figure 2G).

To confirm gene ontology results, transcriptomic signatures of major functions in B cells were assessed using GSEA. GZMB+Bregs were characterized by the downregulation of genes associated with MHC class II antigen presentation (adjusted p-value < 0.001, Normalized enrichment score (NES) = -2.13; Figure S2A), upregulation of genes associated with apoptotic signaling pathway (p < 0.01, NES = 1.44; Figure S2B) and cell proliferation (p < 0.001, NES = 1.50; Figure S2C) compared to non-Bregs. While we found no significant association for genes associated with immunoglobulin production (p=0.06, NES = -1.3) (Figure S2D) and no significant differential expression for *IGHG1*, *IGHG4*, *IGHA1* and *IGHA2* expression between the two B cell clusters (Figure S2E), we found an enrichment in genes coding for IgG2 and IgG3 in naïve, memory and plasmablasts GZMB+Bregs and a decrease in genes coding IgD and IgM in naïve GZMB+Bregs (p<0.0001 vs non Bregs), still in accordance with their enrichment toward plasmablasts/plasma cell profile.

Altogether, we found that regulatory B cells displayed a specific gene expression profile, mainly associated with cell proliferation, apoptosis, and an altered metabolism. In addition, there was a marked enrichment in IgG2 and IgG3 and a decrease in IgD and IgM, with impaired antigen presentation in accordance with their matured differentiation status.

### **GZMB+Bregs mediate their regulatory function by downregulating CD4+CD25- T cells genes implicated in T cell activation, IFN pathway and inflammation during in-vitro coculture**

To characterize the imprint of GZMB+Bregs on effector T cells, purified CD4+CD25- T cells from HVs were activated with anti-CD3/CD28 in the presence of GZMB+Bregs, non-Bregs at a ratio 1:5 B vs T cells or left alone for 3 days (see methods, Figure 3A). Single cell transcriptomics

was then carried out on all living cells in the three culture conditions. In total 19,212 cells (8,131 cells from HV1 and 11,081 cells from HV2) were analyzed after quality controls and exclusion criteria (see methods). Clustering and dimensional reduction using UMAP revealed two major clusters which could be further divided into 5 clusters (Figure 3B). Manual annotation was then carried out, according to their expression of T and B cells phenotypic markers (CD3E, MS4A1) and which show that clusters 0, 1, 2 were T cells and clusters 3 to 5 were B cells (Figure 3C). Quantifications of absolute cell numbers per condition, revealed that lower numbers of CD4+CD25<sup>-</sup> T cells were found when cocultured with GZMB+Bregs (figure 3D), which is in accordance with their suppressive properties and previous reports (. Next, we carried out differential gene expression analysis of the T cells. 750 genes were differentially expressed in CD4+CD25<sup>-</sup> T cells cocultured with GZMB+Bregs vs CD4+CD25<sup>-</sup> T cells alone (Figure 3E, log<sub>2</sub>Fc =0.2, FDR Q-value <= 0.05). 85 genes (25 up- and 60 down-regulated, respectively) were excluded because they were also differentially expressed when CD4+CD25<sup>-</sup> T cells were cocultured with non-Bregs (Figure 3F). 665 genes were thus specifically associated with CD4+CD25<sup>-</sup> T cells in coculture with GZMB+Bregs, with significant downregulation of the activation genes POLR2L, YBX1 and inflammatory genes such as GZMB, IFI6, IFI27, TNFSF10 (Figure 3G).

GSEA analysis was performed to assess the impact of GZMB+Bregs and non-Bregs on T cell pathways. Both GZMB+Bregs and non-Bregs cocultures were associated with a decrease of gene pathways of T cell proliferation (E2F targets, MYC targets, G2M checkpoint, and mitotic spindle), activation (PI3K-AKT-MTOR MTORC1, WNT, IL-6) and metabolic pathways (Fatty acid metabolism, Oxidative phosphorylation) (Figure S3). In contrast, the immune-related gene sets IL-2-STAT5, Interferon- $\alpha$ , - $\gamma$  and KRAS signaling pathways, T cell apoptosis and a set of genes increased during allograft rejection were found down-regulated only when CD4+CD25<sup>-</sup> T cells were cocultured with GZMB+Bregs (Figure 3H). Altogether these data show that effector T cells cocultured with GZMB+Bregs are characterized by a down regulation of genes associated with T cells proliferation, activation, IFN pathway, inflammation and apoptosis.

### **Identification of receptors-ligands involved in CD4+CD25<sup>-</sup> T cells and GZMB+Bregs interactions**

To further characterize how GZMB+Bregs mediate their regulatory effects on CD4+CD25<sup>-</sup> effector T cells, we analyzed receptor-ligand interactions using Nichenet (Browaeys et al.,

2020), which enables to link differentially expressed genes in target cells (i.e. receptors and their known downstream signaling genes) to differentially expressed ligands from source cells using known ligand-receptor interaction data sources. For this, we defined the T and B cells as target and ligand expressing cells, respectively and used the 149 differentially expressed GZMB+Bregs genes as potential ligands (see figure 2) and the 665 differential genes specific to CD4+CD25<sup>-</sup> T cells cocultured with GZMB+Bregs as targets genes (see figure 3). Five differentially expressed ligands were found in GZMB+Bregs to interact with receptors expressed on T cells: Granzyme B (GZMB) interacts with NOTCH1, NOTCH2 and IGF2R. Galectin-3 (*LGALS3* (gene), GAL3 (protein)) interacts with FAS, ITGB1, TGFBR2, TFRC, SPN, SLC1A5, CD6 and NPTN. Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF) interacts with CD74, NPTN and TNFRSF14. High Mobility Group Box 2 (HMGB2) interacts with CD44 and FAS. Lymphotoxin- $\alpha$  (LTA) interacts with TNFRs (TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF14 and TRAF2). This was concomitant with an upregulation of their corresponding in CD4+CD25<sup>-</sup> T cells when cocultured with GZMB+Bregs (Figure 4A). NicheNet identified additional target genes downstream of the receptors in the CD4+CD25<sup>-</sup> T cells indicating that the signaling pathways downstream of the ligand receptor interaction are also altered (Figure 4B). It is noteworthy that the target genes of the different ligands were redundant, indicating that the five ligands may not be implicated in the B / T interactions.

Interestingly, GZMB was one of the five ligands which was found in the GZMB+Bregs. GZMB is expressed in the majority of GZMB+Bregs (95%) independently of their annotation (naïve, memory or plasmablast/plasma cells) and the role of GZMB was already demonstrated notably at the protein level (. Thus, this result acts as proof of concept highlighting that this approach enables the detection of receptor-ligand pairs without prior knowledge. The second ligand, HMGB2 was found to only be upregulated in plasmablasts/plasma cells (Figure S4) and there is currently no specific inhibitor available for this protein, thus HMGB2 was not further investigated in this study. We next aimed to validate the differential gene expression of *LGALS3*, LTA and MIF in independent experiments using q-PCR on B cells isolated from three distinct HV (Figure 4C). We found that indeed, *LGALS3*, MIF and LTA gene expression was upregulated in GZMB+Bregs as compared to freshly isolated B cells (day 0). As this upregulation could merely be due to B cell activation, we also examined *LGALS3*, MIF and LTA expression in activated B cells with goat anti-human IgG/IgA/IgM (H+L) F(ab)<sup>2</sup>, IL-2, CD40L and CpG DNA. These cells are GZMB<sup>low</sup>B cells with low regulatory activity while they are

proliferating (CPD<sup>low</sup>) and expressing high levels of activation markers (CD25) (*data not shown*). Expression was not significantly different between GZMB<sup>low</sup>B cells and GZMB+Bregs, but both *LGALS3* and *LTA* expression was further increased in GZMB+Bregs in the three HV. This indicates that stimulation and regulatory function have an additive effect on the transcriptomics levels of these receptors. Next, we analyzed protein levels of these three ligands within the two B cell populations (GZMB+Bregs and non-Bregs) in three other HVs. While GAL3 (Fold change = 10.3, paired t-test p value < 0.0001) and LTA (Fold change = 17.7, paired t-test p value = 0.0128) were nearly exclusively expressed in GZMB+Bregs, MIF (Fold change = 1.56, paired t-test p value = 0.0497) was also detectable in non-Breg cells making it a poor candidate for GZMB+Breg-specific regulatory function (Figure 4D). In summary, receptor-ligand interaction analysis and subsequent validation experiments identified two new ligands which are promising candidates of regulatory activity in GZMB+Bregs.

#### **GZMB+Bregs function is dependent on LTA**

In a previous study we showed that GZMB blockade only partially recovered the suppressive properties of GZMB+Bregs (Chesneau et al., 2015). We thus investigated whether GAL3 and LTA were also relevant for the suppressive properties of GZMB+Bregs. Different combinations and doses of corresponding inhibitors (Pateclizumab for LTA, Modified Citrus Pectin (MCP) for GAL3) were tested in GZMB+Breg/CD4+CD25- T cell cocultures. Whereas GAL3 inhibitor MCP had no effect (Figure 5A), LTA inhibitor Pateclizumab significantly reduced the inhibition mediated by GZMB+Bregs in a dose dependent manner (Figure 5B). We note that addition of increasing doses of Pateclizumab was not associated with increased B cell mortality (data not shown) and Pateclizumab had no effect on CD3/CD28 activated CD4+CD25-T cells alone, showing that the effect of LTA on T cells was mediated via GZMB+Bregs (Figure 5C). Finally, no additive effect was found with LTA and GZMB inhibitors at all the doses tested (Figure 5D). Since the LTA inhibitor blocked the regulatory activity of GZMB+Bregs, we investigated the transcriptomic impact of LTA on T cells. For this purpose, we investigated the function of the known LTA targets (45 genes, see Figure 4B) which were identified in the receptor-ligand analysis. Gene ontology analysis of these 45 LTA targets genes indicates that they are implicated in proliferation (mononuclear cell proliferation, cell cycle, cell division, and chromosome organization), apoptosis and cell activation (Figure 5E). This indicates that LTA likely mediates its regulatory effects on T cells via the receptors expressed on T cells (TNFRS14,

TNFRS1 and TNFRS1B, see Figure 4A) and their downstream signaling cascade implicated in proliferation and cell cycle. In summary, we characterized LTA as a novel ligand implicated in the regulatory function of GZMB+Bregs cells.

### **LTA modulates GZMB expression on B cells**

To further characterize the role of LTA in GZMB+Bregs we investigated how its gene expression is regulated. Transcription factors (TF) are key regulators of cell fate and differentiation and as of now, none has been associated in the literature with a specific regulatory B cell lineage. To explore this, we used the geneHancer database (Fishilevich et al., 2017) and the TFBSTools R package (Lenhard and Wasserman, 2002) to recover transcription factors known to bind to LTA and GZMB promoters. Among the 278 and 132 TFs associated to the promoter regions of LTA and GZMB respectively, two TFs were also upregulated in the GZMB+Bregs (*BATF*, *CREM*) (FIGURE S5). *BATF* has been shown to act downstream of IL-21R to induce GZMB expression (Topchyan et al., 2021). *CREM* expression was shown to be dependent on CREB phosphorylation in response to receptor activation including TNFR1, one of the receptors for LTA (Gustin et al., 2004). It is thus possible that LTA may be regulating the expression of *CREM* via autocrine activation of TNFR and thus control its own gene as well as the GZMB gene. To test this, we analyzed the effect of Pateclizumab on GZMB protein expression in GZMB+ Bregs when cocultured with CD4+CD25- T cells for 3 days (Figure 6A). Interestingly, LTA inhibition in GZMB+Bregs not only decreased induction of GZMB+Bregs (60% decrease of GZMB+Bregs at 3 days) but also caused a concentration dependent and significant decrease of GZMB expression. It is noteworthy that MPC, the GAL3 inhibitor, had no effect on GZMB protein levels (Figure 6B). GZMB and LTA inhibitors had an additive effect on GZMB inhibition in GZMB+Bregs (Figure 6C). This dependence of GZMB with regards to LTA was further supported by the strong correlation between LTA and *GZMB* gene expression (Pearson  $R^2= 0.91$ ) as measured using the nCounter® SPRINT Profiler (Figure 6D). Taken together, these data indicate that LTA regulates the induction of GZMB in GZMB+Bregs and the expression of GZMB in GZMB+Bregs, possibly via an autocrine feedback loop mediated through the TF *CREM*.

## Discussion

We previously reported that B cells expressing GZMB inhibit the proliferation of effector CD4+CD25- T lymphocytes in a contact and GZMB-dependent manner (Chesneau et al., 2020). Despite several attempts to identify markers specific for regulatory B cells including GZMB+Bregs, no specific nor common markers have been discovered yet (van de Veen et al., 2013; Lin et al., 2014; Bigot et al., 2016; Dubois et al., 2020a), in accordance with their extensive heterogeneity and the absence of identification of specific lineage for this regulatory lymphocyte subset (Rosser and Mauri, 2015). Finally, GZMB+Bregs only represents about 1-2% of circulating B cells in HVs, which makes identification and isolation of such cells very challenging. We and others found methods to enable the induction of such Breg cells while keeping their phenotype and suppressive properties thus offering the possibility to obtain highly purified Breg cells (more than 95% of highly purified GZMB+Breg cells in our hands) and opening the way to potential future clinical applications (Chesneau et al., 2021; Blair et al., 2009; Lee et al., 2022; Rattik et al., 2018). We took advantage of this protocol to better characterize this GZMB+Breg population phenotypically and functionally. In this purpose, we analyzed the transcriptome of GZMB+Bregs in HVs at the single cell level, we analyzed their impact on CD4+CD25- effector T cell transcriptome and identified potential T/ GZMB+Bregs receptor-ligand interactions with a putative role in their suppressive properties.

scRNAseq was preferred because it is particularly appropriate to study the heterogeneity of GZMB+Breg cell populations. Our results indicate that GZMB+Bregs cells are found in all B cell subsets at different stages of B cell differentiation (naïve, memory and plasma cells) with a significant enrichment in more differentiated B cells in accordance with previous publications (Hasan et al., 2019; Braza et al., 2014). This is further supported by the GZMB+Bregs transcriptional profile associated proliferation, cell cycle and metabolism as well as the downregulation of genes linked to B cell activation and antigen presentation.

We previously reported on differentially expressed genes between GZMB+Bregs and non-Bregs using bulk RNAseq in a meta-analysis study (Dubois et al., 2020b). Intersection of these two datasets identified 24 common genes, which were mainly associated to activation. Similarly, the 149 genes specific to GZMB+Bregs found in this study were compared with IL-10+Bregs signatures reported in the literature (van de Veen et al., 2013; Bigot et al., 2016; Lin et al., 2014) but with only 6% overlap of genes mainly associated with proliferation, which is concordant with the low level of IL10+ B cells in GZMB+Bregs. These data further underline

the extensive Breg heterogeneity and the absence of common signatures between these different Breg subsets (Glass et al., 2022).

GZMB+Bregs have been shown by us and other to prevent both T cell proliferation and effector functions (14, 41–43). In accordance, several effector genes such as GZMB, IFI6, MX1 were found downregulated at a transcriptomic level in CD4+CD25- T cells cocultured with GZMB+Bregs. Similarly, CD4+CD25- T cells cocultured with GZMB+Bregs displayed a transcriptional profile associated with inhibition of IL-2-STAT5, KRAS, Interferon- $\alpha$  and - $\gamma$  signaling and also apoptosis pathways whereas these profiles were increased in T cells cocultured with non-Bregs. These data are concordant with the fact that anti-CD3/anti-CD28 stimulation does induce proinflammatory cytokine secretion, KRAS and Activation-induced Cell Death (AICD) (Li and Kurlander, 2010) in T cells, and are prevented by GZMB+Bregs.

The exact mechanisms by which GZMB+Bregs suppress effector T cell response are still unknown. As previously shown, only a restricted proportion of GZMB+Bregs express IL-10, in accordance with the fact that blocking IL-10 does not suppress their function (Chesneau et al., 2020). Similarly, we also found here that TGF- $\beta$  was upregulated in GZMB+Bregs but only in a very small number of GZMB+Bregs and blocking TGF- $\beta$  did not suppress their suppressive function on T cells (Chesneau et al., 2015). Using a prediction model to analyze the interactions between ligands present in GZMB+Bregs and their receptors on T cells, we were able to identify 5 ligands expressed by B cells, LTA, HMGB2, GAL3, MIF and GZMB. Except for GZMB, none of these molecules, until yet, were reported to be involved in B cell regulatory functions independently of the regulatory B cell subtypes. Both LTA, a tumor necrosis factor (TNF) superfamily member, and the GAL3 lectin were then validated to be higher expressed at the transcript and protein levels in GZMB+Bregs, as compared to non-Breg cells and activated B cells. This highlights their potential usefulness as specific biomarkers to detect and isolate GZMB+Bregs.

Interestingly, we found that LTA inhibition blocks induction of GZMB in GZMB+Bregs but also restored T cell proliferation in a dose dependent manner, showing that, in contrast to GAL3, LTA is not only a biomarker for GZMB+Bregs but also involved in their function. LTA is a 22kDa cytokine expressed by lymphoid cells upon activation (Reddy et al., 2001; Luther et al., 2002). When produced as a soluble homotrimer form, LTA has two receptors TNFR1 and TNFR2 (Van Hauwermeiren et al., 2011) and can form a membrane-bound heterotrimer complex with



lymphotoxin beta (LTB) to bind with its receptor LTBR (Van Hauwermeiren et al., 2011). In our dataset, the increased expression of LTA but not LTB likely favors the homotrimer form of LTA in GZMB+Bregs. LTA is involved in numerous pathologies, participating in a variety of activities as evidenced in vitro and in vivo in several studies (Van Hauwermeiren et al., 2011; Naoum et al., 2006; Lock et al., 1999; Kennedy et al., 2014; Calmon-Hamaty et al., 2011). LTA<sup>-/-</sup> mice have been shown to fail to develop specific tolerance to OVA and are associated with altered development of mesenchymal lymph nodes whereas TNFa<sup>-/-</sup> and LTB<sup>-/-</sup> mice also have altered development of mesenchymal lymph nodes and still develop tolerance to OVA (Spahn et al., 2001). Concordant with our results, the adoptive transfer of LTA<sup>-/-</sup> bone marrow cells induces enhanced Th1 responses compared to bone marrow cells from wild type mice, showing that LTA prevents effector response independently of lymph node formation (Yang et al., 2018). Moreover, CREM expression in T cells is associated with the induction of IL-21 production and was shown to be upregulated by TNFR1 signalization (Wen et al., 2010; Ohl et al., 2016; Gustin et al., 2004). We have previously shown that GZMB+Bregs not only produce IL-21 but express high level of IL-21R compared to non-Bregs and this cytokine appears instrumental for their proliferation (Chesneau et al., 2020). These data may suggest a feedback loop in GZMB+Bregs through LTA and IL-21. Moreover, we found a correlation between LTA and GZMB expression in GZMB+Bregs and evidenced an interdependency of these two molecules, with LTA being important in the induction of GZMB+Bregs cells and in their suppressive properties. By cross-comparing the lymphotoxin KEGG pathways with the transcription factors database genehancer (Fishilevich et al., 2017), we found that the transcription factor CREM downstream TNFR1 (LTA binding on TNFR1 was shown to phosphorylate the transcription factor CREB, that induces the transcription of CREM) (Gustin et al., 2004; Wen et al., 2010) is upregulated in GZMB+Bregs and can regulate the transcription of LTA and GZMB, reinforcing the potential link between LTA and GZMB in GZMB+Bregs, as illustrated in our proposed model (Figure 7). Upon inflammatory conditions involving IL-2, IL-21, CD40L, CpG DNA and BCR stimuli, B cells differentiate into a GZMB+ regulatory B cell phenotype. IL-21 stimulation is a potent activator of both pSTAT1 and pSTAT3 in the B cells (Wan et al., 2015). Interestingly, the group of Jahrsdörfer already reported in GZMB+Bregs that IL-21 induced the production of GZMB via a JAK1/3 a mechanism dependent on the activation of pSTAT3 (Hagn et al., 2009). Among the targets of pSTATs, we found LTA, that is upregulated in GZMB+Bregs. LTA binding on its receptor TNFR has multiples effects. First, it increases IL-21 production in T cells thus involving

positive feedback on the GZMB+Bregs which express higher level of IL-21R. This loop requires the presence and the functional activity of the target T cells to produce IL-21. Second, in the GZMB+Bregs, LTA binding on TNFR activates CREM transcription, as shown by its upregulation in GZMB+Bregs. CREM is a transcription factor associated to the promoters of LTA and GZMB, thus associated with LTA and GZMB expression on the GZMB+Bregs. This leads to the suppressive properties of GZMB+Bregs.

Altogether, we report for the first time that LTA is specifically expressed in GZMB+Bregs, which may help to better identify and sort this highly heterogenous B cell subset. More importantly, we show that LTA is involved in the induction as well as the suppression of T cells function via GZMB regulation. The exact mechanism of LTA/GZMB cooperation and to which extent LTA directly participate in GZMB+Bregs regulation of effector T cells remain to be further studied. It is likely that LTA may bind to TNFRs on T cells and induce their inhibition (Van Hauwermeiren et al., 2011; Speiser et al., 1996).

## Références

- Abidi, A., T. Laurent, G. Bériou, L. Bouchet-Delbos, C. Fourgeux, C. Louvet, R. Triki-Marrakchi, J. Poschmann, R. Josien, and J. Martin. 2020. Characterization of Rat ILCs Reveals ILC2 as the Dominant Intestinal Subset. *Front. Immunol.* 11:255. doi:10.3389/fimmu.2020.00255.
- Afzali, S., S. Salehi, A. Shahi, and A. Amirzargar. 2020. B cell modulation strategies in the improvement of transplantation outcomes. *Molecular Immunology.* 125:140–150. doi:10.1016/j.molimm.2020.06.028.
- Aran, D., A.P. Looney, L. Liu, E. Wu, V. Fong, A. Hsu, S. Chak, R.P. Naikawadi, P.J. Wolters, A.R. Abate, A.J. Butte, and M. Bhattacharya. 2019. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol.* 20:163–172. doi:10.1038/s41590-018-0276-y.
- Bankoti, R., K. Gupta, A. Levchenko, and S. Stäger. 2012. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. *J.I.* 188:3961–3971. doi:10.4049/jimmunol.1102880.
- Bigot, J., C. Pilon, M. Matignon, C. Grondin, C. Leibler, A. Aissat, F. Pirenne, J.L. Cohen, and P. Grimbert. 2016. Transcriptomic Signature of the CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> Transitional B Cells Associated With an Immunoregulatory Phenotype in Renal Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 16:3430–3442. doi:10.1111/ajt.13904.
- Blair, P.A., K.A. Chavez-Rueda, J.G. Evans, M.J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2009. Selective Targeting of B Cells with Agonistic Anti-CD40 Is an Efficacious Strategy for the Generation of Induced Regulatory T2-Like B Cells and for the Suppression of Lupus in MRL/ *lpr* Mice. *J Immunol.* 182:3492–3502. doi:10.4049/jimmunol.0803052.
- Blair, P.A., L.Y. Noreña, F. Flores-Borja, D.J. Rawlings, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19+CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity.* 32:129–140. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009.
- Braza, F., J. Chesne, S. Castagnet, A. Magnan, and S. Brouard. 2014. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy.* 69:1454–1463. doi:10.1111/all.12490.
- Browaeys, R., W. Saelens, and Y. Saeys. 2020. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods.* 17:159–162. doi:10.1038/s41592-019-0667-5.
- Calmon-Hamaty, F., B. Combe, M. Hahne, and J. Morel. 2011. Lymphotoxin  $\alpha$  revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 13:232. doi:10.1186/ar3376.

- Chen, X., and P.E. Jensen. 2008. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 56:77–83. doi:10.1007/s00005-008-0014-5.
- Chesneau, M., H.L. Mai, and S. Brouard. 2021. New Method for the Expansion of Highly Purified Human Regulatory Granzyme B-Expressing B Cells. *Methods in molecular biology.* 2270:203–216. doi:10.1007/978-1-0716-1237-8\_11.
- Chesneau, M., H.L. Mai, R. Danger, S. Le Bot, T.-V.-H. Nguyen, J. Bernard, C. Poullaouec, P. Guerrif, S. Conchon, M. Giral, B. Charreau, N. Degauque, and S. Brouard. 2020. Efficient Expansion of Human Granzyme B-Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties. *J.I. j*2000335. doi:10.4049/jimmunol.2000335.
- Chesneau, M., L. Michel, E. Dugast, A. Chenouard, D. Baron, A. Pallier, J. Durand, F. Braza, P. Guerif, D.-A. Laplaud, J.-P. Soullillou, M. Giral, N. Degauque, E. Chiffolleau, and S. Brouard. 2015. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *JASN.* 26:2588–2598. doi:10.1681/ASN.2014040404.
- Chesneau, M., A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S.L. Gallou, D. Baron, M. Giral, R. Danger, P. Guerif, H. Aubert-Wastiaux, A. Néel, L. Michel, D.-A. Laplaud, N. Degauque, J.-P. Soullillou, K. Tarte, and S. Brouard. Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients. *American Journal of Transplantation.* 14:144–155. doi:10.1111/ajt.12508.
- Dubois, F., S. Limou, M. Chesneau, N. Degauque, S. Brouard, and R. Danger. 2020a. Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells. *Eur J Immunol.* 50:1757–1769. doi:10.1002/eji.201948489.
- Dubois, F., S. Limou, M. Chesneau, N. Degauque, S. Brouard, and R. Danger. 2020b. Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells. *Eur J Immunol.* 50:1757–1769. doi:10.1002/eji.201948489.
- Edgar, R. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research.* 30:207–210. doi:10.1093/nar/30.1.207.
- Fillatreau, S., C.H. Sweeney, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology.* 3:944–950. doi:10.1038/ni833.
- Finak, G., A. McDavid, M. Yajima, J. Deng, V. Gersuk, A.K. Shalek, C.K. Slichter, H.W. Miller, M.J. McElrath, M. Prlic, P.S. Linsley, and R. Gottardo. 2015. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* 16:278. doi:10.1186/s13059-015-0844-5.
- Fishilevich, S., R. Nudel, N. Rappaport, R. Hadar, I. Plaschkes, T. Iny Stein, N. Rosen, A. Kohn, M. Twik, M. Safran, D. Lancet, and D. Cohen. 2017. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database.* 2017. doi:10.1093/database/bax028.

- Glass, M.C., D.R. Glass, J.-P. Oliveria, B. Mbiribindi, C.O. Esquivel, S.M. Krams, S.C. Bendall, and O.M. Martinez. 2022. Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Reports*. 39:110728. doi:10.1016/j.celrep.2022.110728.
- Gustin, J.A., R. Pincheira, L.D. Mayo, O.N. Ozes, K.M. Kessler, M.R. Baerwald, C.K. Korgaonkar, and D.B. Donner. 2004. Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 286:C547–C555. doi:10.1152/ajpcell.00332.2002.
- Hagn, M., V. Ebel, K. Sontheimer, E. Schwesinger, O. Lunov, T. Beyer, D. Fabricius, T.F.E. Barth, A. Viardot, S. Stilgenbauer, J. Hepp, K. Scharffetter-Kochanek, T. Simmet, and B. Jahrsdörfer. 2010. CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 40:2060–2069. doi:10.1002/eji.200940113.
- Hagn, M., E. Schwesinger, V. Ebel, K. Sontheimer, J. Maier, T. Beyer, T. Syrovets, Y. Laumonnier, D. Fabricius, T. Simmet, and B. Jahrsdörfer. 2009. Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *J Immunol.* 183:1838–1845. doi:10.4049/jimmunol.0901066.
- Hao, Y., S. Hao, E. Andersen-Nissen, W.M. Mauck, S. Zheng, A. Butler, M.J. Lee, A.J. Wilk, C. Darby, M. Zager, P. Hoffman, M. Stoeckius, E. Papalexi, E.P. Mimitou, J. Jain, A. Srivastava, T. Stuart, L.M. Fleming, B. Yeung, A.J. Rogers, J.M. McElrath, C.A. Blish, R. Gottardo, P. Smibert, and R. Satija. 2021. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*. 184:3573–3587.e29. doi:10.1016/j.cell.2021.04.048.
- Hasan, M.M., L. Thompson-Snipes, G. Klintmalm, A.J. Demetris, J. O’Leary, S. Oh, and H. Joo. 2019. CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> and CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics. *J.I.* 203:2110–2120. doi:10.4049/jimmunol.1900488.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D.J. DiLillo, K. Yanaba, G.M. Venturi, P.M. Szabolcs, S.H. Bernstein, C.M. Magro, A.D. Williams, R.P. Hall, E.W. St Clair, and T.F. Tedder. 2011. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 117:530–541. doi:10.1182/blood-2010-07-294249.
- Jahrsdörfer, B., S.E. Blackwell, J.E. Wooldridge, J. Huang, M.W. Andreski, L.S. Jacobus, C.M. Taylor, and G.J. Weiner. 2006. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood*. 108:2712–2719. doi:10.1182/blood-2006-03-014001.
- Kaltenmeier, C., A. Gawanbacht, T. Beyer, S. Lindner, T. Trzaska, J.A. van der Merwe, G. Härter, B. Grüner, D. Fabricius, R. Lotfi, K. Schwarz, C. Schütz, M. Hönig, A. Schulz, P. Kern, M. Bommer, H. Schrezenmeier, F. Kirchhoff, and B. Jahrsdörfer. 2015. CD4<sup>+</sup> T Cell–Derived IL-21 and Deprivation of CD40 Signaling Favor the In Vivo Development of Granzyme B–Expressing Regulatory B Cells in HIV Patients. *J.I.* 194:3768–3777. doi:10.4049/jimmunol.1402568.

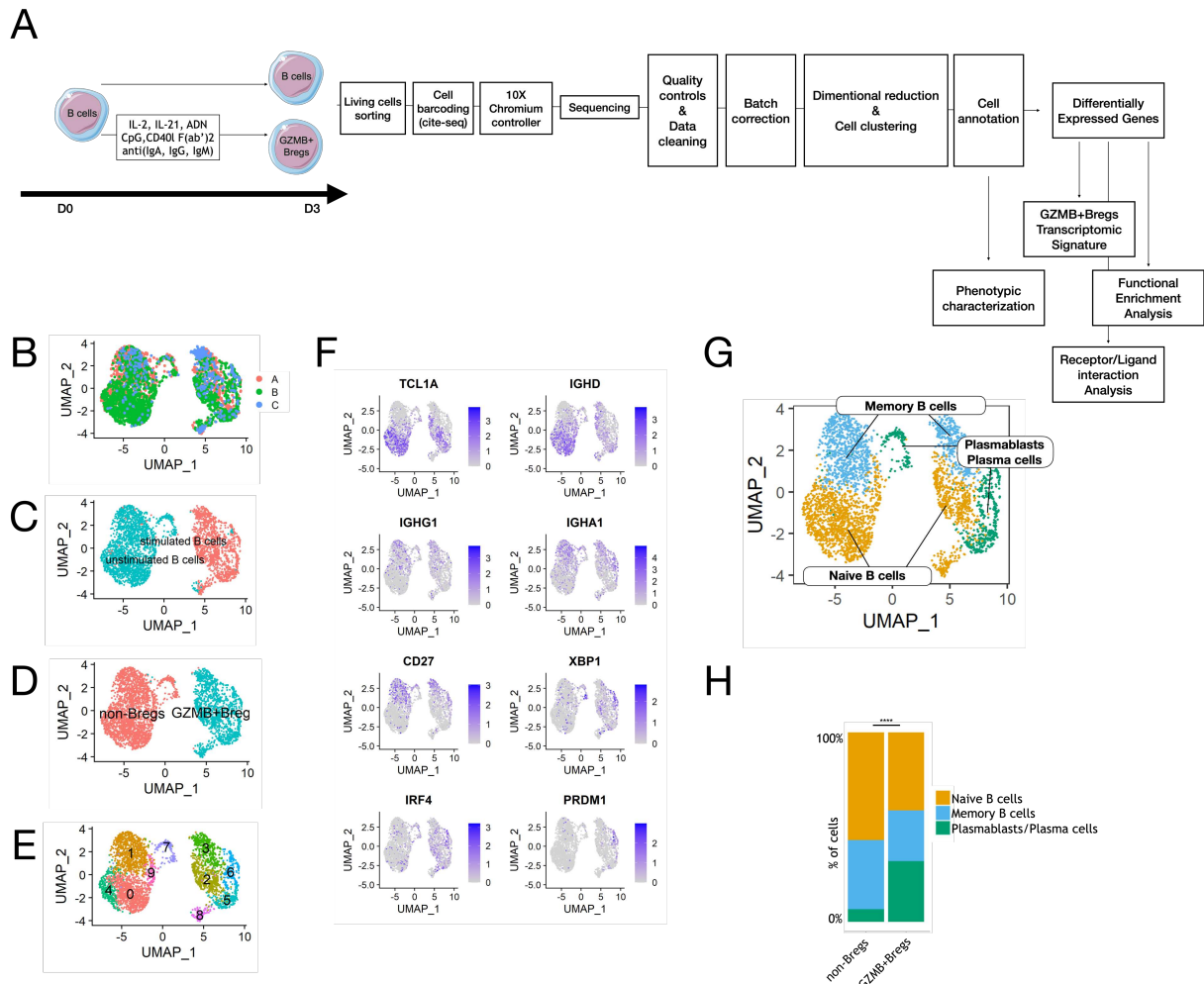
- Kennedy, W.P., J.A. Simon, C. Offutt, P. Horn, A. Herman, M.J. Townsend, M.T. Tang, J.L. Grogan, F. Hsieh, and J.C. Davis. 2014. Efficacy and safety of pateclizumab (anti-lymphotoxin- $\alpha$ ) compared to adalimumab in rheumatoid arthritis: a head-to-head phase 2 randomized controlled study (The ALTARA Study). *Arthritis Res Ther.* 16:467. doi:10.1186/s13075-014-0467-3.
- Kessel, A., T. Haj, R. Peri, A. Snir, D. Melamed, E. Sabo, and E. Toubi. 2012. Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity Reviews.* 11:670–677. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.018.
- Kim, J.I., D.M. Rothstein, and J.F. Markmann. 2015. Role of B cells in tolerance induction. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 20:369–375. doi:10.1097/MOT.0000000000000204.
- Le Berre, L., M. Chesneau, R. Danger, F. Dubois, D. Chaussabel, M. Garand, and S. Brouard. 2021. Connection of BANK1, Tolerance, Regulatory B cells, and Apoptosis: Perspectives of a Reductionist Investigation. *Front. Immunol.* 12:589786. doi:10.3389/fimmu.2021.589786.
- Le Gallou, S., G. Caron, C. Delaloy, D. Rossille, K. Tarte, and T. Fest. 2012. IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK–ERK Signaling. *J.I.* 189:161–173. doi:10.4049/jimmunol.1200301.
- Lee, K.M., Q. Fu, G. Huai, K. Deng, J. Lei, L. Kojima, D. Agarwal, P. Van Galen, S. Kimura, N. Tanimine, L. Washburn, H. Yeh, A. Naji, C.G. Rickert, C. LeGuern, and J.F. Markmann. 2022. Suppression of allograft rejection by regulatory B cells generated via toll-like receptor signaling. *JCI Insight.* doi:10.1172/jci.insight.152213.
- Lee, K.M., R.T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M.M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, S. Deng, H. Yeh, J.F. Markmann, and J.I. Kim. 2014. TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance: Immunomodulation. *European Journal of Immunology.* 44:1728–1736. doi:10.1002/eji.201344062.
- Lenhard, B., and W.W. Wasserman. 2002. TFBS: Computational framework for transcription factor binding site analysis. *Bioinformatics.* 18:1135–1136. doi:10.1093/bioinformatics/18.8.1135.
- Li, Y., and R.J. Kurlander. 2010. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med.* 8:104. doi:10.1186/1479-5876-8-104.
- Lin, W., D. Cerny, E. Chua, K. Duan, J.T.J. Yi, N.B. Shadan, J. Lum, M. Maho-Vaillant, F. Zolezzi, S.C. Wong, A. Larbi, K. Fink, P. Musette, M. Poidinger, and S. Calbo. 2014. Human Regulatory B Cells Combine Phenotypic and Genetic Hallmarks with a Distinct Differentiation Fate. *J.I.* 193:2258–2266. doi:10.4049/jimmunol.1303214.

- Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T.F.E. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G.U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P. Möller, H. Schrezenmeier, and B. Jahrsdörfer. 2013. Interleukin 21–Induced Granzyme B–Expressing B Cells Infiltrate Tumors and Regulate T Cells. *Cancer Res.* 73:2468–2479. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3450.
- Lock, C., J. Oksenberg, and L. Steinman. 1999. The role of TNFalpha and lymphotoxin in demyelinating disease. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 58:i121–i128. doi:10.1136/ard.58.2008.i121.
- Luther, S.A., A. Bidgol, D.C. Hargreaves, A. Schmidt, Y. Xu, J. Paniyadi, M. Matloubian, and J.G. Cyster. 2002. Differing Activities of Homeostatic Chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in Lymphocyte and Dendritic Cell Recruitment and Lymphoid Neogenesis. *J Immunol.* 169:424–433. doi:10.4049/jimmunol.169.1.424.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S.L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki, and Y. Baba. 2014. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity.* 41:1040–1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq, and M. Londei. 2003. Prevention of Arthritis by Interleukin 10–producing B Cells. *Journal of Experimental Medicine.* 197:489–501. doi:10.1084/jem.20021293.
- Naoum, J.J., H. Chai, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao, and C. Chen. 2006. Lymphotoxin-a and cardiovascular disease: Clinical. *Med Sci Monit.* 12:21–124.
- Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology.* 15:160–171. doi:10.1038/nri3795.
- Ohl, K., A. Wiener, R. Lippe, A. Schippers, C. Zorn, J. Roth, N. Wagner, and K. Tenbrock. 2016. CREM Alpha Enhances IL-21 Production in T Cells In Vivo and In Vitro. *Front. Immunol.* 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00618.
- Rattik, S., P.T. Mantani, I. Yao Mattisson, I. Ljungcrantz, L. Sundius, H. Björkbacka, M. Terrinoni, M. Lebens, J. Holmgren, J. Nilsson, M. Wigren, and G. Nordin Fredrikson. 2018. B cells treated with CTB-p210 acquire a regulatory phenotype in vitro and reduce atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Vascular Pharmacology.* 111:54–61. doi:10.1016/j.vph.2018.09.002.
- Reddy, J., P. Chastagner, L. Fiette, X. Liu, and J. Thèze. 2001. IL-2-induced tumor necrosis factor (TNF)- $\beta$  expression: further analysis in the IL-2 knockout model, and comparison with TNF- $\alpha$ , lymphotoxin- $\beta$ , TNFR1 and TNFR2 modulation. *International Immunology.* 13:135–147. doi:10.1093/intimm/13.2.135.
- Rosser, E.C., and C. Mauri. 2015. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity.* 42:607–612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.

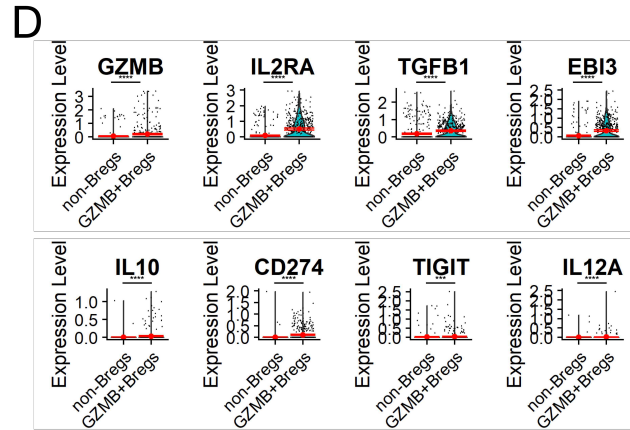
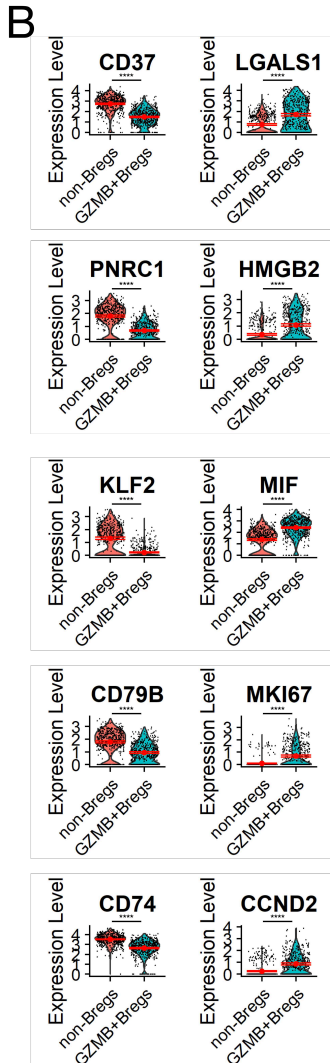
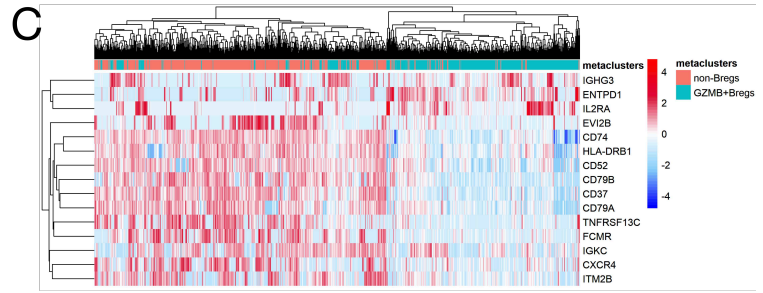
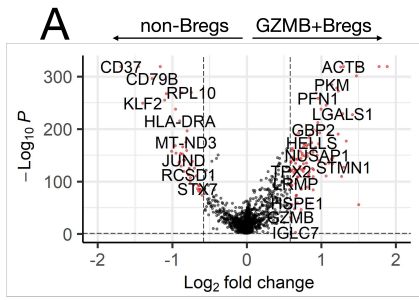
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9:671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Spahn, T.W., A. Fontana, A.M.C. Faria, A.J. Slavin, H.-P. Eugster, X. Zhang, P.A. Koni, N.H. Ruddle, R.A. Flavell, P.D. Rennert, and H.L. Weiner. 2001. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 31:1278–1287. doi:10.1002/1521-4141 (200104)31:4<1278::AID-IMMU1278>3.0.CO;2-A.
- Speiser, D.E., E. Sebзда, T. Ohteki, M.F. Bachmann, K. Pfeffer, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1996. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur. J. Immunol.* 26:3055–3060. doi:10.1002/eji.1830261235.
- Stoeckius, M., S. Zheng, B. Houck-Loomis, S. Hao, B.Z. Yeung, W.M. Mauck, P. Smibert, and R. Satija. 2018. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* 19:224. doi:10.1186/s13059-018-1603-1.
- Topchyan, P., G. Xin, Y. Chen, S. Zheng, R. Burns, J. Shen, M.Y. Kasmani, M. Kudek, N. Yang, and W. Cui. 2021. Harnessing the IL-21-BATF Pathway in the CD8+ T Cell Anti-Tumor Response. *Cancers*. 13:1263. doi:10.3390/cancers13061263.
- Van Hauwermeiren, F., R.E. Vandenbroucke, and C. Libert. 2011. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 22:311–319. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.09.004.
- Vazquez, M.I., J. Catalan-Dibene, and A. Zlotnik. 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*. 74:318–326. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.007.
- van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Söllner, D.G. Akdis, B. Rückert, C.A. Akdis, and M. Akdis. 2013. IgG4 production is confined to human IL-10–producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 131:1204–1212. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.014.
- Wan, C.-K., A.B. Andraski, R. Spolski, P. Li, M. Kazemian, J. Oh, L. Samsel, P.A. Swanson, D.B. McGavern, E.P. Sampaio, A.F. Freeman, J.D. Milner, S.M. Holland, and W.J. Leonard. 2015. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112:9394–9399. doi:10.1073/pnas.1511711112.
- Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller. 2010. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*. 185:6413–6419. doi:10.4049/jimmunol.1001829.
- Wu, T., E. Hu, S. Xu, M. Chen, P. Guo, Z. Dai, T. Feng, L. Zhou, W. Tang, L. Zhan, X. Fu, S. Liu, X. Bo, and G. Yu. 2021. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*. 2:100141. doi:10.1016/j.xinn.2021.100141.

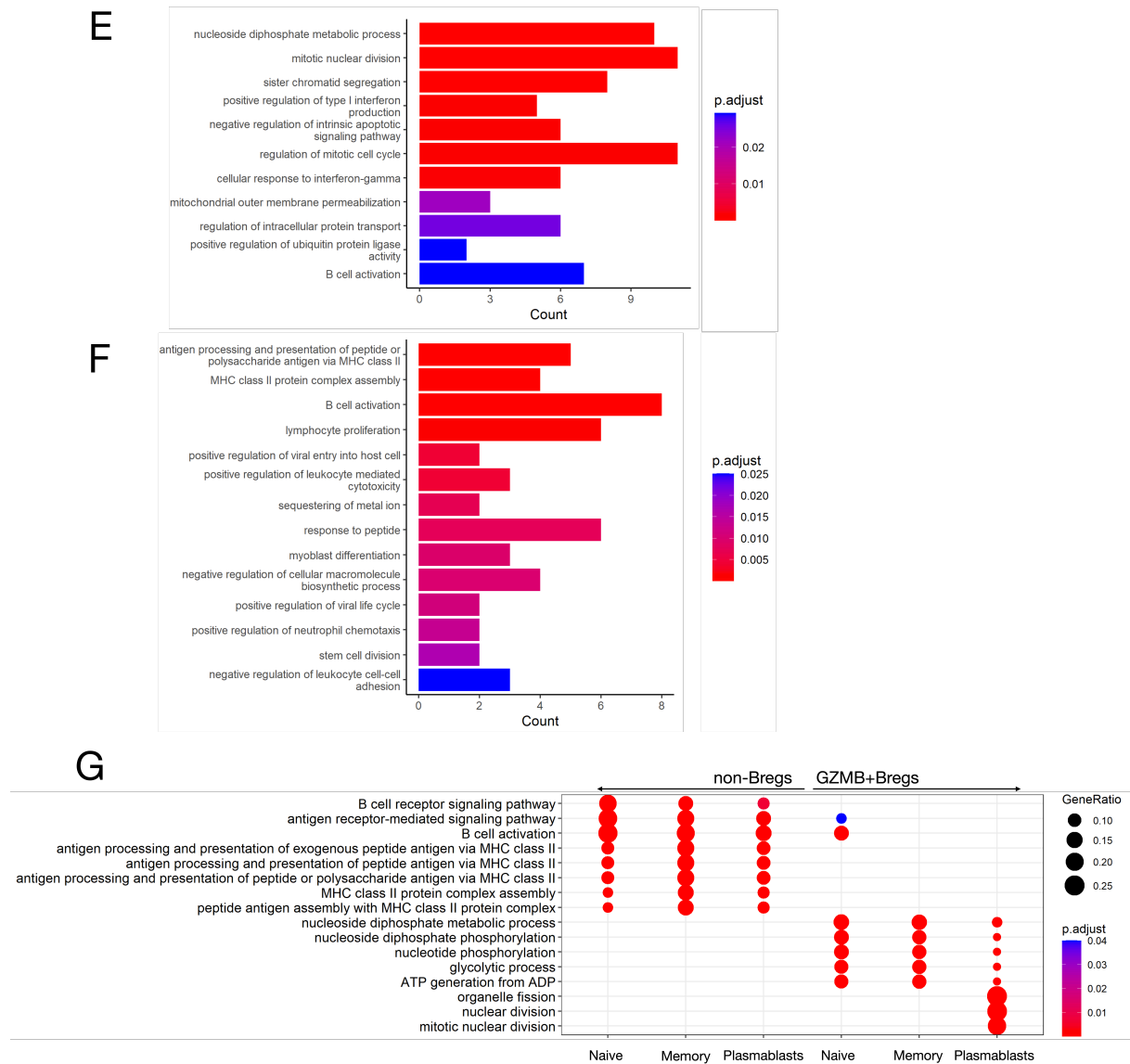


Yang, K., Y. Liang, Z. Sun, L. Liu, J. Liao, H. Xu, M. Zhu, Y.-X. Fu, and H. Peng. 2018. T cell-derived lymphotoxin limits Th1 response during HSV-1 infection. *Sci Rep.* 8:17727. doi:10.1038/s41598-018-36012-z.

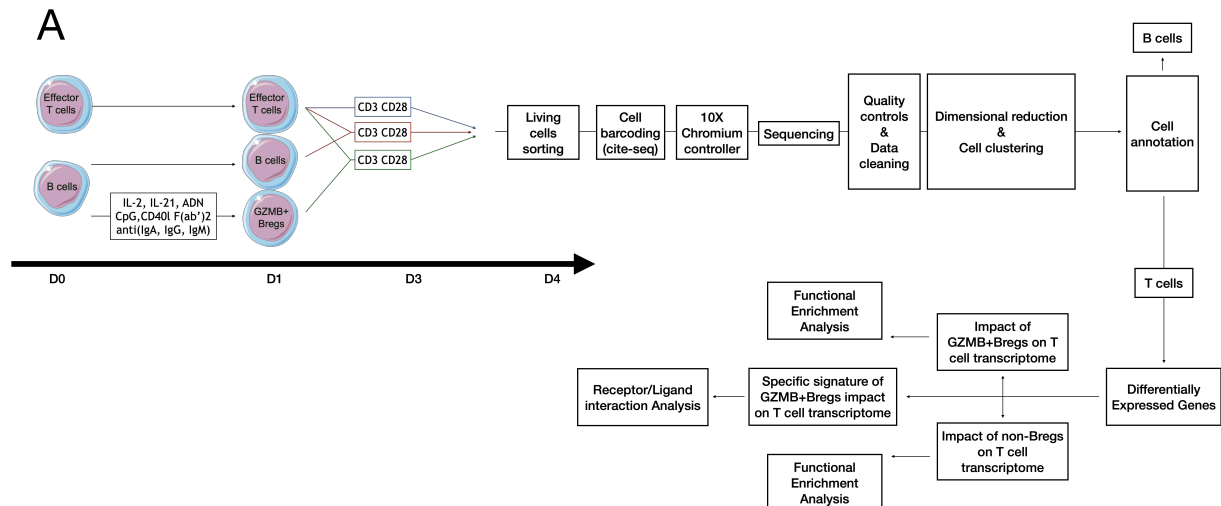


**Figure 1: Clustering and phenotyping of GZMB+Bregs:** Schematic view of the study design from the cell preparation for scRNAseq. GZMB+Bregs or non-Bregs were induced from B cells isolated from PBMC. Living cells were then marked with anti- $\beta$ 2-microglobulin or anti-CD293 conjugated DNA sequences specific of the donor and the experimental condition following CITE-seq protocols. Libraries were then prepared and sequenced on a Nova-Seq 6000 (Illumina) in 3 different runs: 1,989 cells in run 1, 3,919 cells in run 2 and 1,493 cells in run 3. Data were corrected for batch effect and analyzed on R using the Seurat library. After dimensional reduction and cell clustering, cells were annotated based on their expression of phenotypic markers to characterize B cell subpopulations in GZMB+Bregs as compared to non-Bregs. The differentially expressed genes were calculated on the 5901 genes expressed at least in 20% of cells in one of the two compared groups. Only genes with a Log<sub>2</sub> (Fold-change) > 0.58 (corresponding to the Fold-Change of GZMB) and an adjusted p.value < 0.05 were selected for the transcriptomic signature of GZMB+Bregs and functional enrichment analysis (A). Batch effect was corrected by combining cells from the 3 different runs with reciprocal PCA. Transcriptomes of Bregs and non-Bregs cells were analyzed using an unsupervised dimensionality reduction algorithm (UMAP) to identify groups of cells with similar gene expression profiles. Each point represents a cell and is represented in color by its Batch (B). (C-E) Transcriptomes of Bregs and non-Bregs cells from 4 HVs were analyzed using an unsupervised dimensionality reduction algorithm (Seurat) to identify groups of cells with similar gene expression profiles. Each point represents a cell and is represented in color by its stimulated or unstimulated status as characterized by HTO (C), unsupervised (D) or supervised (E) clustering. (F) Expression of markers used for phenotypic classification of naive and immature B cells (TCL1A, IGHD), memory B cells (IGHG1, IGHA1, CD27), and plasmablasts/plasma cells (XBP1, IRF4, PRDM1, CD27). (G) Phenotype of the naive, memory, and plasmablasts/plasma subset of B cells as represented in UMAP. (F) Percentage of naive, memory, and plasmablasts/plasma cells in non-Bregs and GZMB+Bregs metaclusters were analyzed using Chi<sup>2</sup>-test. The plasmablasts were significantly enriched in GZMB+Bregs (p<0.0001)

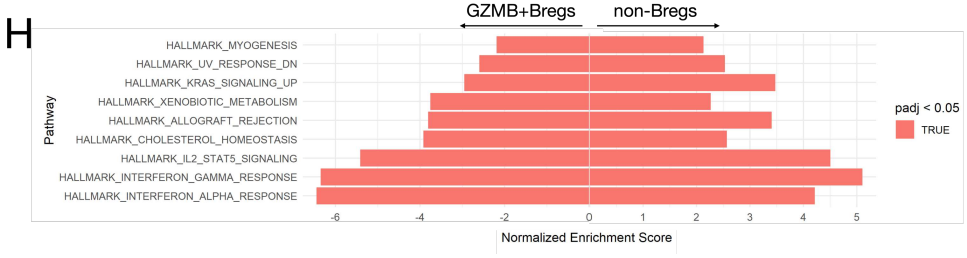
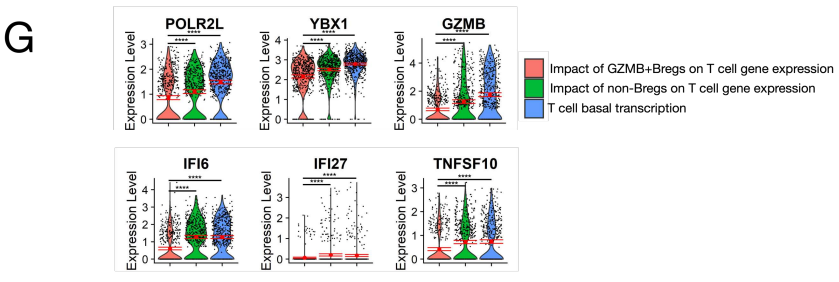
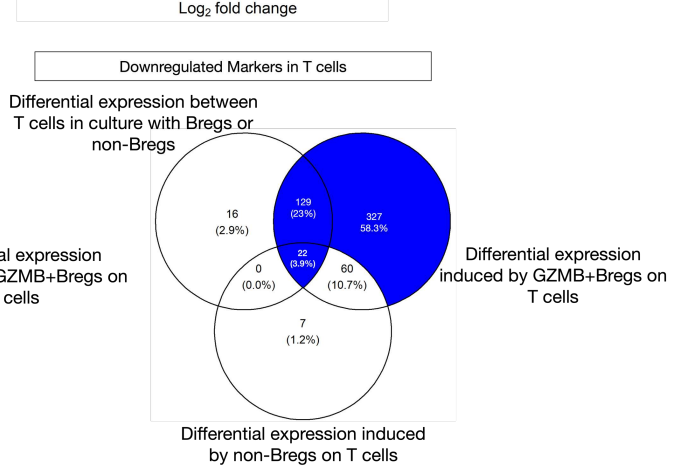
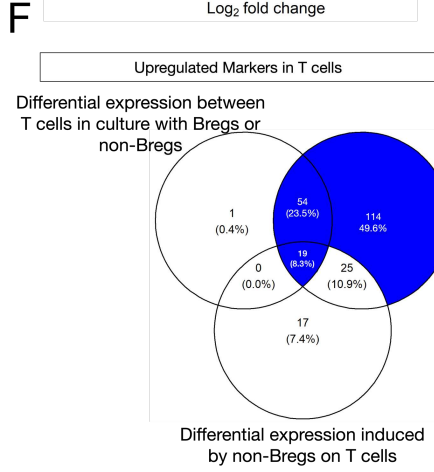
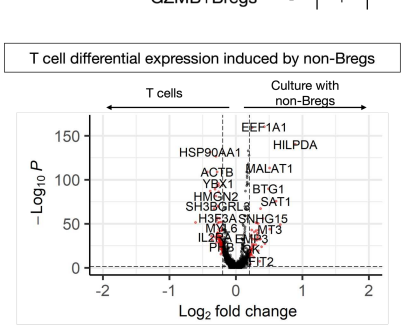
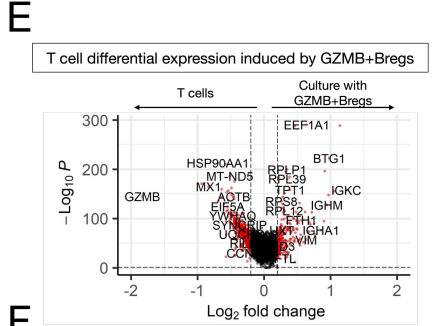
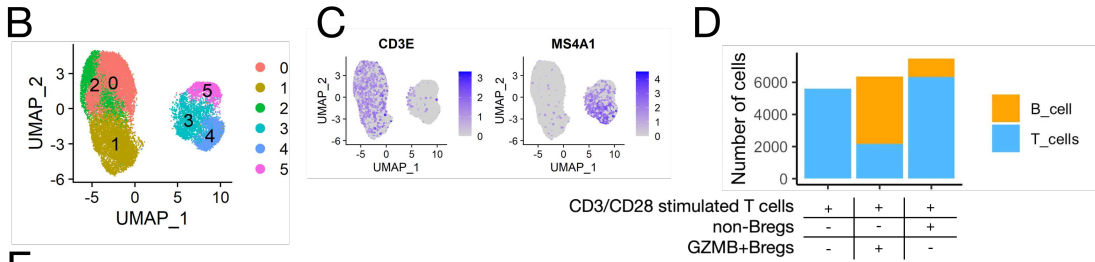


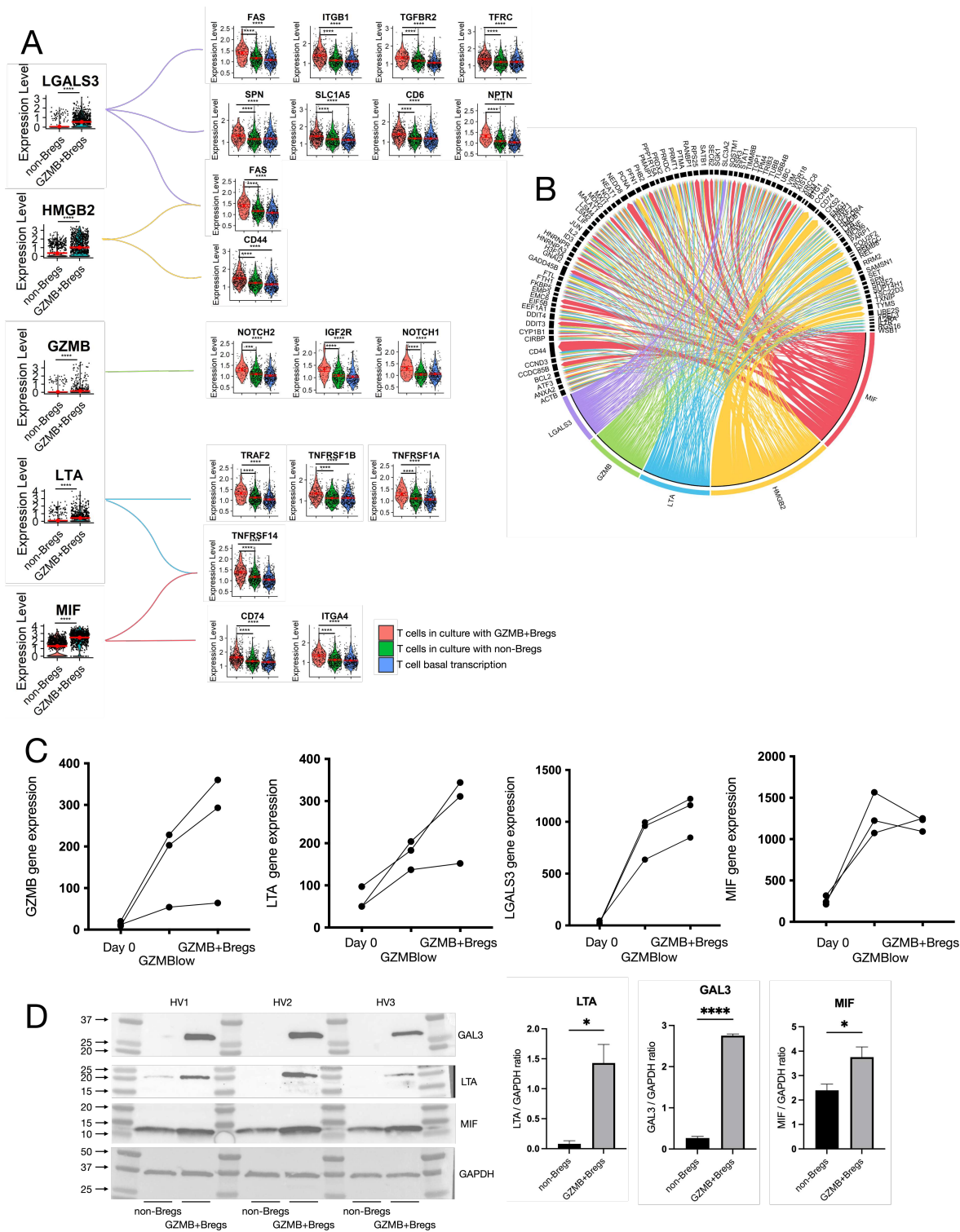


**Figure 2: B cell differential expression:** The two metaclusters of GZMB+Bregs and non-Bregs were analyzed using differential expression methods (Seurat, MAST) to identify DEGs represented in volcano plot. Each point represents a gene by its fold change difference between the two clusters and the adjusted p.value (A). The 5 most up- and down-modulated genes are represented in Violin plots (B). Among the genes with a fold change greater than GZMB, the 15 associated to cell-surface proteins were represented as a heatmap (C). Different Bregs subsets have been characterized by several markers with variable expression in this dataset (D). Gene ontology analysis was performed on the 104 up- and 45 down-regulated DEGs. Redundant terms were then reduced using the rrvgo package (1.8.0). Bar plots represent the adjusted p.value and the number of DEG associated to ontologies enriched (E) or repressed (F) in GZMB+Bregs vs non-Bregs. Only gene sets between 20 and 400 genes were analyzed. (G) Differential gene expression and their ontologies were also analyzed within the naive, memory and plasmablasts/plasma cells and represented in dot plots. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0$ .

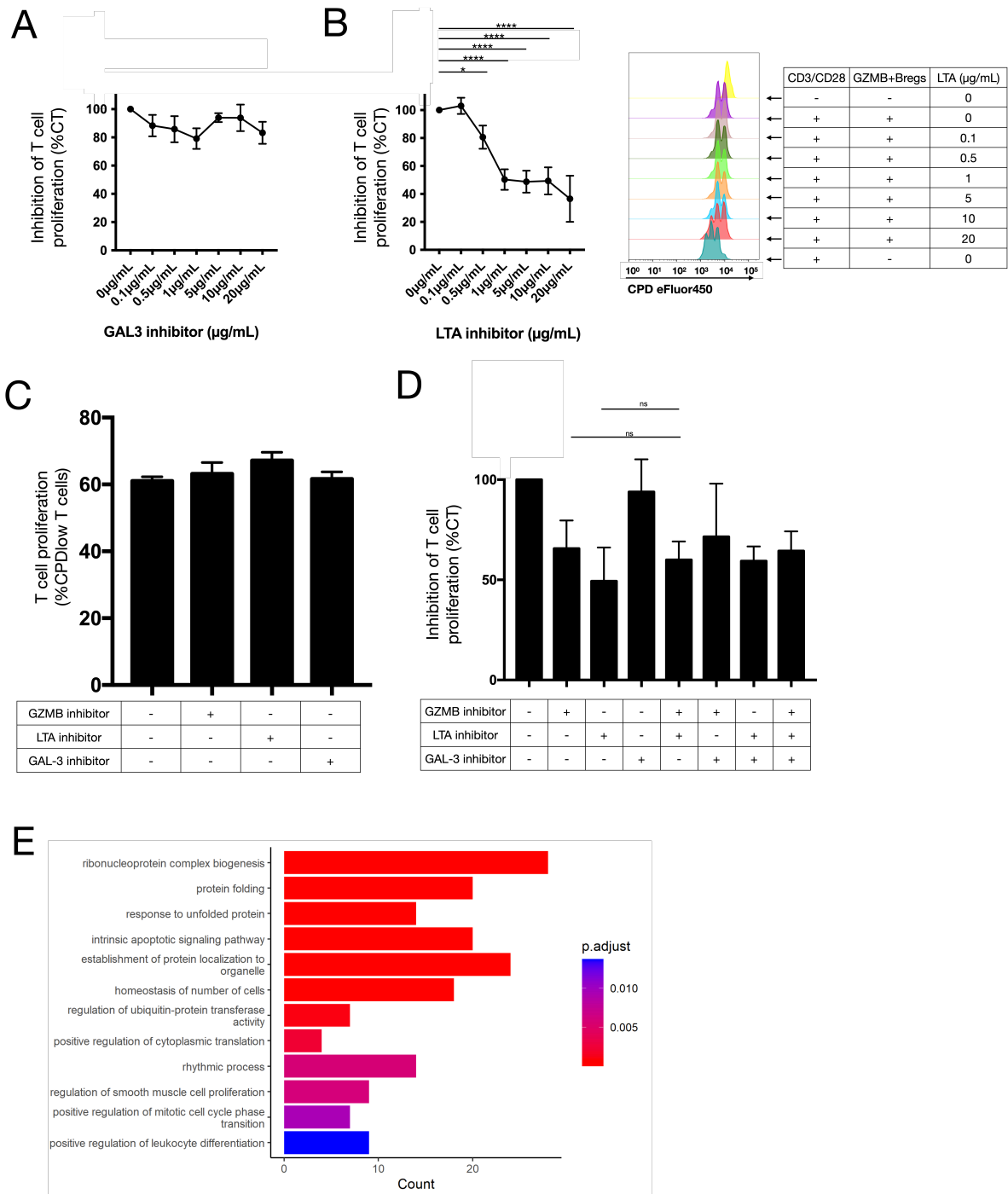


**Figure 3: T cells coculture dataset:** (A) Schematic view of the study design from the cell preparation for scRNAseq. GZMB+Bregs or non-Bregs were induced from B cells isolated from PBMC for 1 day. CD3/CD28 activated T cells were cultivated alone, with non-Bregs or GZMB+Bregs for 3 days. At the end of the cultures, living cells were marked with anti- $\beta$ 2-microglobulin or anti-CD293 conjugated DNA sequences specific of the donor and the experimental condition following CITE-seq protocols. Libraries were then prepared and sequenced on a Nova-Seq 6000 (Illumina). After dimensional reduction and cell clustering, cells were annotated based on their expression of phenotypic markers to characterize B cell and T cells. After 3 days of culture in absence of Bregs induction cocktail, the expression of GZMB was not differential between GZMB+Bregs and non-Bregs. Thus, the B cells were not analyzed. Differentially expressed genes were calculated on the 5901 genes expressed at least in 20% of cells in one of the two compared groups. Only genes with a  $\text{Log}_2$  (Fold-change)  $> 0.2$  and an adjusted p.value  $< 0.05$  were selected for the transcriptomic signature of GZMB+Bregs and functional enrichment analysis. The signature of GZMB+Bregs impact on T cell transcriptome was described as the differentially expressed genes between T cells in culture with or without GZMB+Bregs and not differentially expressed in culture with or without non-Bregs, unless the genes were also differentially expressed in T cells in culture with GZMB+Bregs or non-Bregs. (next page) (B-G) Transcriptomes of Bregs and non-Bregs cells from 2 HVs were analyzed using an unsupervised dimensionality reduction algorithm (Seurat) to identify groups of cells with similar gene expression profiles. Each point represents a cell and is represented in color by its unsupervised clustering (B) and Expression of phenotypic markers CD3E and CD20 (C). The proportions of B and T cells within each condition was represented as a Histogram of the number of B cells and T cells within each condition (D). The imprints of GZMB+Bregs and non-Bregs on T cell transcriptome were analyzed using differential expression methods (Seurat, MAST) to identify DEGs represented in volcano plot. Each point represents a gene by its fold change difference between the two clusters and the adjusted p.value (E). The specific imprint of GZMB+Bregs was determined using Venn diagram to exclude the 85 genes also modulated by non-Bregs with no exacerbated expression between the two conditions of T cells in culture with GZMB+Bregs or non-Bregs (F). The 6 most downregulated genes are represented in violin plots (G). Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). (H) GZMB+Bregs and non-Bregs induce opposite effect on 4 effector-T cell related pathways (IFN- $\alpha$  responses, IFN- $\gamma$  responses, IL-2 STAT5 signaling, and Allograft rejection) and 5 non-immune related cell-activation pathways from the Hallmark library as represented by their Normalized Enrichment Score from GSEA.



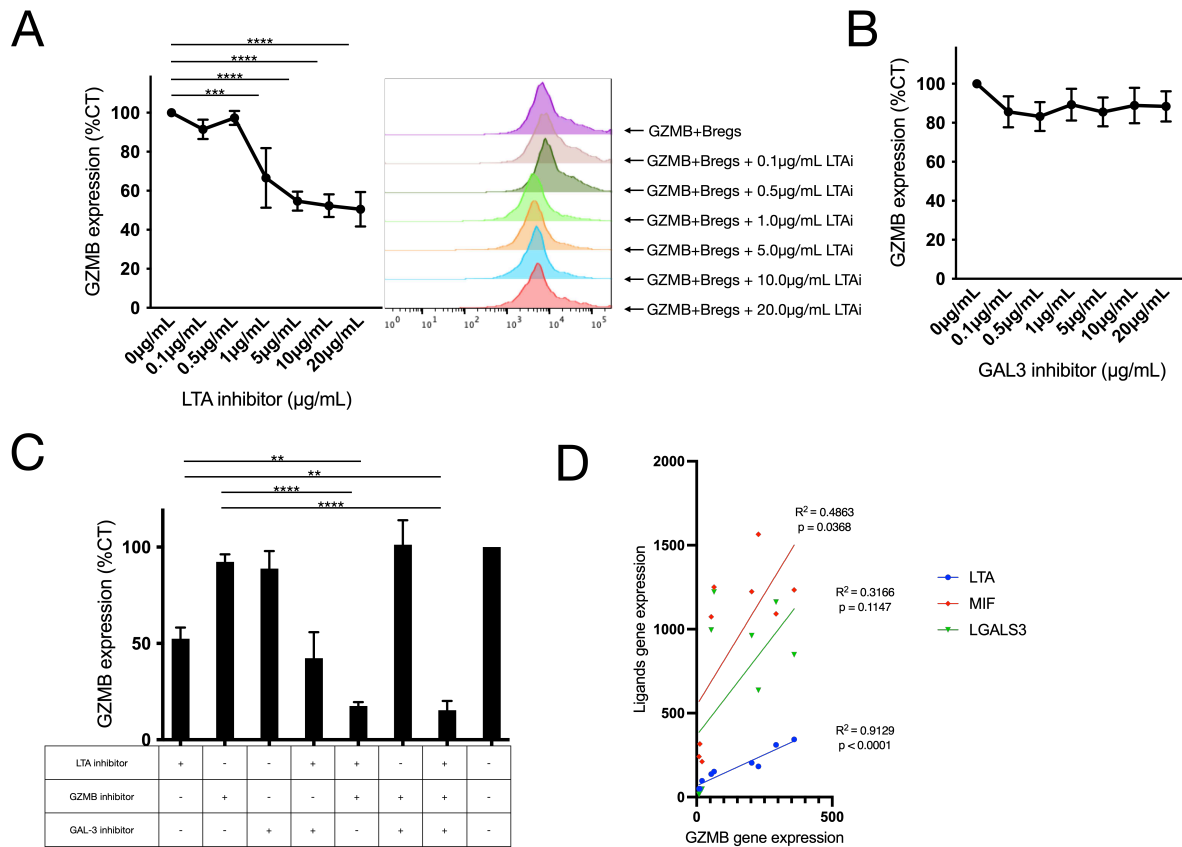


**Figure 4: GZMB+Bregs interactions with T cells:** To understand regulatory B cells mechanisms, we used the nichenet algorithm that predict the interaction of B cell ligands with receptors on the T cell based on T cell DEGs and prior knowledge on the transcriptomic changes downstream receptor-ligand interaction. Among the 149 DEGs in GZMB+Bregs compared to non-Bregs, LGALS3, GZMB, LTA, HMGB2 and MIF were predicted to be potent inducers of T cell differential expression (A) B cell expression of Predicted ligands and their receptors are represented in violin plots. (B) Predicted ligand induced gene transcription is represented as a chord diagram. Arrow widths represents the strength of the interactions. (C-D) LTA, LGALS3 and MIF gene expression were validated using the nCounter® SPRINT Profiler in GZMB+Bregs compared to activated B cells and B cells before the stimulation with the GZMB as a control (C) and at the protein level by western blot (D) with GZMB as a control (B). RNA and protein analysis were independently performed on B cells from 3 HVs. Data represent each independent experiment.

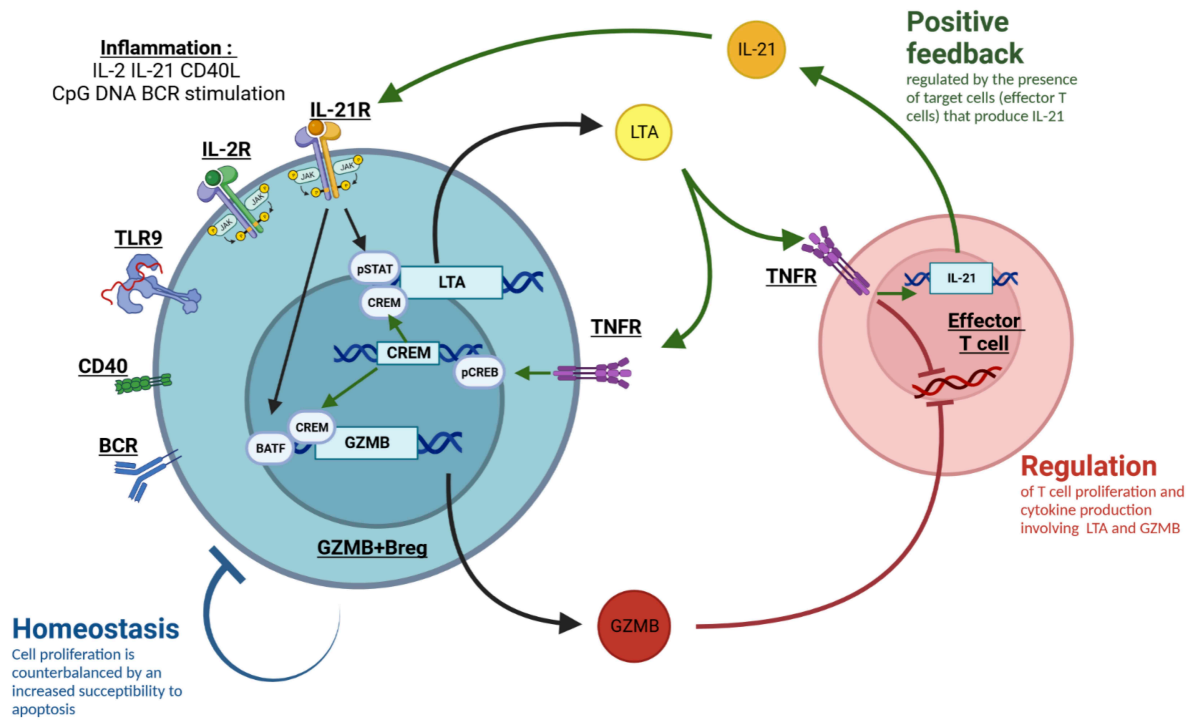


**Figure 5: Ligand activity on CD4+CD25- T cell proliferation:** (A-B) T cell proliferation was measured by flow cytometry (as the percentage of CPD-low T cells) after 3 days-CD3/CD28 stimulation in presence of regulatory B cells in response of increasing doses of galectin 3 inhibitors in coculture assay (A) and LTA inhibitors in coculture assay with cytometry proliferation data for one representative donor (B), on T cells alone (C) and with different combinations of these inhibitors (D) in 6 healthy donors. The values were normalized to the inhibition induced by GZMB+Bregs without any inhibitor. On T cells alone, the proportion of cells that did one or more divisions was around 100% for each condition. That does not permit to visualize a potential proliferation induced by the inhibitors. Thus, we gated on cells that did two divisions or more. No significant difference was found between the CD3/CD28 stimulated T cells alone or with any of the inhibitors. Data represent mean  $\pm$  SEM. ANOVA was performed with Tukey's multiple comparison test. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*). (E) Gene ontology analysis was performed on the 45 genes downregulated in T cells and linked to LTA activity in the receptor-ligand analysis. Bar plots represent the number of gene and the adjusted pvalue associated to the ontologies.





**Figure 6: Ligand activity on regulatory B cells:** (A-C) The expression of GZMB in regulatory B cells in response of different doses of LTA with cytometry data from one representative donor (A) and galectin 3 (B) inhibitors, and different combinations of these inhibitors (C) was assessed by flow cytometry in B cells after the 3-days Bregs induction for 6 healthy donors. For each donor, the mean fluorescent intensity was normalized to the condition without any inhibitor. (D) The correlation between GZMB mRNA expression and ligands mRNA expression (LTA, LGALS3 and MIF) assessed using the nCounter® SPRINT Profiler in different B cell subsets (B cells enriched from blood, activated B cells in non-regulatory phenotype and GZMB+Bregs) in 3 different donors. LTA expression is highly correlated to GZMB ( $R^2 = 0.9129$ ) whereas MIF and LGALS3 were not / weakly correlated to GZMB ( $R^2 = 0.4863$  and  $0.3166$  respectively) Data represent mean  $\pm$  SEM. ANOVA was performed with Tukey's multiple comparison test. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).



**Figure 7: Proposed model of LTA/GZMB interaction in GZMB+Bregs:** Upon inflammatory conditions involving IL-2, IL-21, CD40L, CpG DNA and BCR stimuli, B cells differentiate into a GZMB+ regulatory B cell phenotype. IL-21 stimulation is a potent activator of both pSTAT1, pSTAT3 and BATF. Among the targets of pSTATs, we found LTA, that is upregulated in GZMB+Bregs. LTA binding on its receptor TNFR has multiples effects. First, it directly inhibits T cell proliferation. It also increases IL-21 production in T cells thus involving positive feedback on the GZMB+Bregs that express higher level of IL21R. This loop requires the presence and the functional activity of the target T cells to produce IL-21. Last, in the GZMB+Bregs, LTA binding on TNFR activates CREM transcription through CREB phosphorylation. CREM is a transcription factor associated to the promoters of LTA and GZMB, thus associated with LTA and GZMB expression on the GZMB+Bregs. GZMB is also a direct target of BATF. This leads to the suppressive properties of GZMB+Bregs through GZMB and LTA. To counterbalance the positive feedback, GZMB+Bregs have increased apoptosis susceptibility.

## Chapitre IV

---

### Perspectives

#### A. Perspectives du projet de caractérisation des lymphocytes B régulateurs GZMB+

Grâce à l'analyse transcriptionnelle des lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B et de leurs cellules cibles, nous avons mis en évidence un mécanisme de suppression dépendant de la lymphotoxine alpha. L'inhibition de cette dernière empêche l'induction de lymphocytes B régulateurs en diminuant l'expression du granzyme B et bloque leur action suppressive sur la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Comme discuté dans l'article 1, ces données suggèrent que la liaison d'homotrimères de lymphotoxine alpha sur le TNFR1 est à la fois un mécanisme précoce de l'induction de lymphocytes B régulateurs et un mécanisme direct de régulation sur les cellules cibles. Cependant, dans les modèles de coculture utilisés, les lymphocytes B totaux sont orientés dans leur fonction régulatrice pendant 24h par une stimulation BCR, TLR9, CD40 et cytokinique (IL-2, IL-21). Pour éviter l'action de ces signaux, et notamment des signaux cytokiniques sur les lymphocytes T (Gómez et al., 1997), les lymphocytes B sont lavés avant les cocultures. À 24h, l'expression de granzyme B est encore minime. L'induction du phénotype B régulateur et l'inhibition de la prolifération du lymphocyte T ont donc lieu lors de la même étape de culture. Une des premières réponses à apporter suite à ces travaux sera de déterminer si la lymphotoxine alpha interagit directement avec le lymphocyte T ou non. Pour cela, la solution la plus simple serait de se servir de notre modèle de coculture en utilisant un système de knock-out du gène TNFR1 (type CRISPR-Cas9) sur les lymphocytes T comme décrit dans la littérature (Farhang et al., 2019). Cela nous permettrait d'avoir une signalisation de la lymphotoxine alpha fonctionnelle dans l'induction du phénotype régulateur dans les lymphocytes B, mais sans effets direct sur le lymphocyte T. Si le LTA n'interagit pas avec le lymphocyte T, alors il ne devrait pas y avoir de différences entre la prolifération des lymphocytes T non-modifiés et celle des lymphocytes T TNFR1 KO. Au contraire, si le LTA interagit avec le lymphocyte T via le TNFR1, alors la prolifération des

cellules TNFR1 KO devrait être restaurée. De plus, la lymphotoxine alpha permet l'expression d'IL-21 par les lymphocytes T (Ohl et al., 2016; Wen et al., 2010). il peut aussi être intéressant de regarder la sécrétion de cette cytokine dans ce modèle, pour valider une potentielle boucle de rétrocontrôle de l'induction de lymphocytes B régulateurs.

Ces résultats sur le rôle du LTA dans l'induction de lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B ouvrent de nouvelles perspectives et il serait intéressant de regarder l'effet d'une stimulation IL-21 et LTA, les deux signalisations associées à la transcription du granzyme B, sur l'induction de ces cellules. Cela pourrait permettre de nous affranchir des signaux activateurs non spécifiques de la fonction régulatrice (BCR, TLR9, CD40L) qui sont largement impliqués dans la différenciation et l'activation des lymphocytes B dans des configurations non régulatrices (Marsman et al., 2022). Nous savons que les lymphocytes B régulateurs sont une population hétérogène (Rosser and Mauri, 2015; Yang et al., 2021), pouvant émerger à partir de différents phénotypes de lymphocytes B (transitionnels, naïfs, mémoire, plasmablastes) et il en est de même pour les lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B et l'enrichissement en plasmablastes que nous voyons au niveau transcriptomique a été est confirmé en protéique (Chesneau et al., 2020). Cependant, la fonction régulatrice des différents phénotypes de lymphocytes B régulateurs GZMB+ n'a jamais été regardée dans nos modèles. L'analyse récepteur-Ligand a montré que HMGB2, protéine exprimée uniquement par les plasmablastes, était un des potentiels modulateurs de l'activité transcriptionnelle des cellules cibles. Cependant, dans cette étude, nous sommes partis du postulat que la fonction régulatrice, dépendante partiellement du granzyme B, exprimé par plus de 90% des cellules dans notre modèle, n'était pas spécifique aux plasmablastes. Nous nous sommes donc orientés sur l'analyse des ligands exprimés par les différentes populations B, notamment la lymphotoxine alpha et la galectine-3 en excluant donc HMGB2. Cependant, il va être

nécessaire d'étudier la fonction différentielle des lymphocytes B régulateurs transitionnels, naïfs, mémoires et plasmablastes. Si la population de plasmablastes permet une meilleure inhibition de la prolifération des lymphocytes T, alors nous devons reconsidérer notre postulat, et nous étudierons le rôle d'HMGB2 dans cette fonction.

L'étude que nous avons réalisée se concentre sur des lymphocytes B régulateurs induits à partir d'échantillons de volontaires sains. Cependant, la compréhension des événements qui mènent à la présence de ces cellules dans le sang périphérique des patients tolérants nécessite de visualiser les différences entre ces lymphocytes B issus de patients tolérants et d'autres groupes de patients. Pour cela, nous avons réalisé du scRNAseq sur des lymphocytes B régulateurs induits in vitro sur quatre groupes de donneurs (patients transplantés rénaux avec une fonction rénale stable définie par une créatinine sérique inférieure à 150 micromol/L, une protéinurie < 1g/24h sous traitements immunosuppresseurs (Stables) ou non (Tolérants), Patients transplantés faisant un rejet chronique à médiation humorale et donneurs sains non transplantés). Cependant, si ce protocole fonctionne bien à partir d'échantillons congelés de volontaires sains, de patients transplantés stables et en rejet, nous avons une mortalité excessive suite aux cultures des lymphocytes B issus de patients tolérants. Et à date, nous n'avons obtenu des résultats que chez un seul patient tolérant sur les 9 échantillons que nous avons décongelé. Nous avons montré que les lymphocytes B des patients tolérants sont plus sensibles à l'apoptose que ceux des autres groupes (Chesneau et al., 2014), ce qui peut expliquer la difficulté que nous avons à maintenir ces cellules en culture et à en avoir suffisamment pour en faire le séquençage des ARN. Nous relançons actuellement ces protocoles en les adaptant à des échantillons fragiles, notamment sur les étapes impactant la qualité et la quantité de cellules obtenues à la fin du protocole comme l'ajout d'un temps de

repos après la décongélation dans du tampon CTL, l'utilisation d'un nozzle plus large lors du tri en cytométrie et la réduction des cycles de centrifugation.

Pour l'instant, nos études sur ces lymphocytes B régulateurs ont été faites dans le compartiment sanguin. Nous n'avons jamais été regarder la présence de lymphocytes B régulateurs dans d'autres compartiments tel que le greffon ou les organes lymphoïdes secondaires. Il serait donc intéressant de s'intéresser plus en avant à la capacité migratoire de ces cellules, d'abord en regardant les récepteurs aux chimiokines dans l'analyse en scRNAseq entre les différents groupes de patients puis suivant les résultats, nous pourrions analyser fonctionnellement cette capacité migratoire *in vitro* en utilisant des protocoles de transmigration que nous avons mis au point sur transwell mais aussi *in vivo* en regardant la présence de cellules coexprimant les marqueurs des lymphocytes B régulateurs (CD19, GZMB, LTA) dans des biopsies rénales de patients transplantés. En France, il n'est pas prévu de biopsies pour les patients tolérants. Ces études seront donc réalisées chez les patients transplantés avec une fonction rénale stable et des patients faisant un rejet chronique mixte. Dans une étude chez la souris, les auteurs ont montré que le transcriptome des lymphocytes B régulateurs était variable entre les différents compartiments d'un même individu (Yang et al., 2021). Il sera donc intéressant de comparer les transcrits des lymphocytes B régulateurs infiltrant les différents types de greffons, s'ils existent, à nos résultats de scRNAseq déjà réalisés. Parmi les technologies de transcriptomique spatiale, la plateforme de profilage spatial GeoMx® de Nanostring est une option permettant de sélectionner les zones riches en infiltrat B afin d'identifier les gènes spécifiquement exprimés par ces cellules, avec une résolution comparable à la cellule unique (Wang et al., 2021), pour réaliser une comparaison des signatures de lymphocytes B régulateurs GZMB+ du sang périphérique et infiltrant la greffe. Cette technologie nous permettra aussi d'identifier les cellules avec lesquelles les

lymphocytes B régulateurs interagissent directement. Ceci nous offrira davantage de perspectives sur la compréhension de leurs mécanismes d'action et sur leurs interactions avec leur environnement.

Enfin, la fonction de cette population de lymphocytes B régulatrice GZMB<sup>+</sup> n'est que partiellement dépendante du granzyme B chez l'Homme, et indépendante du granzyme B dans des modèles de rat et de primates non-humains (Alonso-Guallart et al., 2021; Durand et al., 2015; Pallikkuth et al., 2011). Si nous montrons un effet complémentaire entre le LTA et le GZMB chez l'homme, alors il sera intéressant de développer ces modèles animaux pour y caractériser le rôle du LTA.



## B. Perspectives du projet développement d'inhibiteurs de JAK et de la caractérisation de cette inhibition dans la DA

Le développement des inhibiteurs de JAK montre des résultats prometteurs. L'approche informatique par la modélisation des interactions kinase / ligand nous a permis de sélectionner trois séries de molécules. Pour chaque série nous avons obtenu des hits permettant d'inhiber significativement la phosphorylation des STATs par les lymphocytes T CD4+. La structure des composés actifs sur la voie de l'IL-4 (JAK1/JAK3/STAT6) en comparaison de la structure des composés actifs sur la voie de l'IL-12 (JAK2/TYK2/STAT4) a orienté nos choix sur la sélection de la structure globale de la deuxième génération de molécules, puis de la troisième. A chaque itération du processus, nous avons augmenté le nombre de molécules actives sur la voie de l'IL-4 et diminué le nombre de molécules actives sur la voie de l'IL-12. Nous avons obtenu quelques résultats intéressants sur la dernière série, mais heurtés à un défaut de reproductibilité. Après avoir vérifié que la stabilité de ces composés n'était pas en cause, nous nous orientons vers l'étude du profil pharmacocinétique de ceux-ci, dans la mesure où leur physicochimie n'est pas très en faveur d'une bonne disponibilité dans les milieux biologiques. Ceci justifie pleinement une optimisation structurale en vue d'une amélioration, notamment, des paramètres logP et pKa. En parallèle, nous avons envoyé des échantillons pour une analyse sur différentes autres kinases : CDK, GSK, PIM, CK, RIPK, HASPIN, NEK, ABL1, et bien entendu, les JAKs. Ces résultats nous permettront de valider ou non l'intérêt potentiel de ces différentes molécules.

Récemment, l'Upadacitinib et l'Abrocitinib, de meilleure spécificité pour JAK1 que la première génération d'inhibiteurs, ont obtenu des AMM sur le sol européen dans la dermatite atopique pour les patients en échec, contre-indication ou intolérance à la ciclosporine (respectivement en décembre 2021 et Mars 2022). Ces molécules répondent au besoin des inhibiteurs de JAK,

à savoir une inhibition des voies cytokiniques pathogéniques et une inhibition des symptômes, dont une baisse du prurit dans les quelques heures qui suivent le traitement (Blauvelt et al., 2021; Meher et al., 2021). La présence de ces nouvelles options thérapeutiques ne freine pas l'intérêt porté au développement de nouvelles molécules qui peuvent se placer dans une stratégie d'alternance des traitements.

Nous avons initié un projet en collaboration avec le service clinique de dermatologie du CHU de Nantes sur l'étude de l'apparition de papules inflammatoires associées aux traitements par l'Abrocitinib. Cet effet n'a été reporté dans les essais cliniques associés aux autres traitements anti-JAK, et à des degrés moindres dans les autres indications de l'Abrocitinib. Dans cette étude, nous souhaitons étudier ces zones inflammatoires en scRNAseq et les comparer à des régions autologues non lésionnelles. Cette étude ne prévoit pas de biopsier de sites lésionnels caractéristiques de la DA qui sont très largement diminués chez ces patients traités. Nous pourrions réutiliser ces données pour comparer ces zones non lésionnelles avec des données de transcriptomique publiques de tissus non lésionnels de patients atteints de DA ainsi que des tissus lésionnels de patients atteints de DA pour enrichir la caractérisation des effets des traitements par inhibiteur de JAK dans la dermatite atopique (Alkon et al., 2022; Zhang et al., 2023). Les mêmes analyses que celles utilisés dans la caractérisation transcriptomique des Bregs seront réalisées à savoir la caractérisation du type cellulaire en utilisant des données de scRNAseq de référence, l'analyse de DEG et l'implémentation de modèles d'interaction cellulaires.

## Références

- Alkon, N., W.M. Bauer, T. Krausgruber, I. Goh, J. Griss, V. Nguyen, B. Reininger, C. Bangert, C. Staud, P.M. Brunner, C. Bock, M. Haniffa, and G. Stingl. 2022. Single-cell analysis reveals innate lymphoid cell lineage infidelity in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 149:624–639. doi:10.1016/j.jaci.2021.07.025.
- Alonso-Guallart, P., N. Llore, E. Lopes, S. -B. Kofman, S. -H. Ho, J. Stern, G. Pierre, K. Bruestle, Q. Tang, M. Sykes, and A. Griesemer. 2021. CD40L-stimulated B cells for *ex-vivo* expansion of polyspecific non-human primate regulatory T cells for translational studies. *Clin. Exp. Immunol.* 203:480–492. doi:10.1111/cei.13537.
- Blauvelt, A., H.D. Teixeira, E.L. Simpson, A. Costanzo, M. De Bruin-Weller, S. Barbarot, V.H. Prajapati, P. Lio, X. Hu, T. Wu, J. Liu, B. Ladizinski, A.D. Chu, and K. Eyerich. 2021. Efficacy and Safety of Upadacitinib vs Dupilumab in Adults With Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 157:1047. doi:10.1001/jamadermatol.2021.3023.
- Chesneau, M., H.L. Mai, R. Danger, S. Le Bot, T.-V.-H. Nguyen, J. Bernard, C. Poullaouec, P. Guerrif, S. Conchon, M. Giral, B. Charreau, N. Degauque, and S. Brouard. 2020. Efficient Expansion of Human Granzyme B–Expressing B Cells with Potent Regulatory Properties. *J.I.* j2000335. doi:10.4049/jimmunol.2000335.
- Chesneau, M., A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S.L. Gallou, D. Baron, M. Giral, R. Danger, P. Guerif, H. Aubert-Wastiaux, A. Néel, L. Michel, D.-A. Laplaud, N. Degauque, J.-P. Soullillou, K. Tarte, and S. Brouard. 2014. Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients. *American Journal of Transplantation*. 14:144–155. doi:10.1111/ajt.12508.
- Durand, J., V. Huchet, E. Merieau, C. Usal, M. Chesneau, S. Remy, M. Heslan, I. Anegon, M.-C. Cuturi, S. Brouard, and E. Chiffolleau. 2015. Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. *J.I.* 195:5035–5044. doi:10.4049/jimmunol.1500429.
- Farhang, N., M. Ginley-Hidinger, K.C. Berrett, J. Gertz, B. Lawrence, and R.D. Bowles. 2019. Lentiviral CRISPR Epigenome Editing of Inflammatory Receptors as a Gene Therapy Strategy for Disc Degeneration. *Human Gene Therapy*. 30:1161–1175. doi:10.1089/hum.2019.005.
- Gómez, J., D. García-Domingo, C. Martínez-A, and A. Rebollo. 1997. ROLE OF NF-KB IN THE CONTROL OF APOPTOTIC AND PROLIFERATIVE RESPONSES IN IL-2-RESPONSIVE T CELLS. *Frontiers in Bioscience*. 49–60. doi:10.2741/a174.
- Marsman, C., D. Verhoeven, J. Koers, T. Rispens, A. ten Brinke, S.M. van Ham, and T.W. Kuijpers. 2022. Optimized Protocols for In-Vitro T-Cell-Dependent and T-Cell-Independent Activation for B-Cell Differentiation Studies Using Limited Cells. *Front. Immunol.* 13:815449. doi:10.3389/fimmu.2022.815449.

- Meher, B.R., R.R. Mohanty, and B.M. Padhy. 2021. Efficacy and safety of abrocitinib for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Dermatological Treatment*. 1–9. doi:10.1080/09546634.2021.1961997.
- Ohl, K., A. Wiener, R. Lippe, A. Schippers, C. Zorn, J. Roth, N. Wagner, and K. Tenbrock. 2016. CREM Alpha Enhances IL-21 Production in T Cells In Vivo and In Vitro. *Front. Immunol.* 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00618.
- Pallikkuth, S., K. Rogers, F. Villinger, M. DosterII, M. Vaccari, G. Franchini, R. Pahwa, and S. Pahwa. 2011. Interleukin-21 administration to rhesus macaques chronically infected with simian immunodeficiency virus increases cytotoxic effector molecules in T cells and NK cells and enhances B cell function without increasing immune activation or viral replication. *Vaccine*. 29:9229–9238. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.118.
- Rosser, E.C., and C. Mauri. 2015. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*. 42:607–612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.
- Wang, N., X. Li, R. Wang, and Z. Ding. 2021. Spatial transcriptomics and proteomics technologies for deconvoluting the tumor microenvironment. *Biotechnol. J.* 16:2100041. doi:10.1002/biot.202100041.
- Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller. 2010. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*. 185:6413–6419. doi:10.4049/jimmunol.1001829.
- Yang, S.-Y., J. Long, M.-X. Huang, P.-Y. Luo, Z.-H. Bian, Y.-F. Xu, C.-B. Wang, S.-H. Yang, L. Li, C. Selmi, M.E. Gershwin, Z.-B. Zhao, and Z.-X. Lian. 2021. Characterization of Organ-Specific Regulatory B Cells Using Single-Cell RNA Sequencing. *Front. Immunol.* 12:711980. doi:10.3389/fimmu.2021.711980.
- Zhang, B., L.M. Roesner, S. Traidl, V.A.C.M. Koeken, C. Xu, T. Werfel, and Y. Li. 2023. Single-cell profiles reveal distinctive immune response in atopic dermatitis in contrast to psoriasis. *Allergy*. 78:439–453. doi:10.1111/all.15486.

# Annexes

---

## Annexe 1 : Tableau des étapes de marquage pour le panel « T »

Anticorps	Cat	Marqueur	Couleur	Volume / puits (µL)
<b>Etape 1 : Viability (30min)</b>				
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	L34962		Viability dye	0.5
			PBS	1000
			Volume à distribuer :	<b>200</b>
Lavage				
<b>Etape 2 : CCR7 (10min)</b>				
CCR7 APC fire 810	900002706	CCR7	APC fire 810	5
True-Stain Monocyte Blocker	426103	Monocyte Blocker	N/A	5
Purified NA/LE Human BD Fc Block™	564765	Fc Block	N/A	2.5
PBS 0.5% BSA 1mM EDTA			Running Buffer	23.438
<b>Etape 3 : Chémokine (5min)</b>				
Brilliant Stain Buffer Plus	566385	N/A	N/A	10
Brilliant Violet 711™ anti-human CD196 (CCR6) Antibody	353436	CCR6	BV711	5
BD Horizon™ BUV615 Mouse Anti-Human CD194 (CCR4)	613000	CD194	BUV615	2.5
PE/Cyanine7 anti-human CD183 (CXCR3) Antibody	353720	CXCR3	PE Cy7	2.5
BUV563 Rat Anti-Human CXCR5 (CD185)	741316	CXCR5	BUV563	0.625
			Volume à distribuer :	<b>20.63</b>
<b>Etape 4 : TCR (10min)</b>				
TCRγ/δ Antibody, anti-human, REAfinity	130-113-514	TCRgd	PerCPC-vio700	2
BV750 Mouse Anti-Human TCR Va7.2	749487	TCR Va7.2	BV750	0.625
<b>Etape 5 : Marqueurs faibles (10min)</b>				
BD OptiBuild™ BUV661 Mouse Anti-Human CD49a	750628	CD49a	BUV661	10
CD25 Monoclonal Antibody (CD25-3G10), PE-Alexa Fluor 700	MHCD2524	CD25	PE Alexa F700	5
APC-R700 Mouse Anti-Human CD127	565185	CD127	APC-R700	2.5
CD161 Monoclonal Antibody (HP-3G10), eFluor 450, eBioscience™	48-1619-42	CD161	eFluor450	2.5
BD Horizon™ BV510 Mouse Anti-Human CD73	563198	CD73	BV510	2.5
Brilliant Violet 421™ anti-human CD279 (PD-1) Antibody	329920	PD-1	BV421	2.5
PE anti-human TIGIT (VSTM3) Antibody	372704	TIGIT	PE	2.5
BD OptiBuild™ BV786 Mouse Anti-Human CD137	741000	CD137	BV786	1.25
Brilliant Violet 650™ anti-human CD28 Antibody (clone CD28.2)	302946	CD28	BV650	1.25

APC/Cyanine7 anti-human CD69 Antibody	310914	CD69	APC Cy7	1.25
APC anti-human CD27 Antibody	356410	CD27	APC	1.25
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD223 (LAG-3) Antibody	369332	LAG-3	PE Dazzle 594	0.625
HLA-DR PE-Fire810	307674	HLA-DR	PE-Fire810	0.625
BD Horizon™ BB515 Mouse Anti-Human CD39	565469	CD39	BB515	0.5
BD OptiBuild™ BUV496 Mouse Anti-Human CD45RA	750258	CD45RA	BUV496	0.3125
PE/Cyanine5 anti-human CD95 (Fas) Antibody	305610	CD95	PE Cy5	0.313
BV605 Mouse Anti-Human CD103	743652	CD103	BV605	0.313
BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human TIM-3 (CD366)	565558	TIM-3	Alexa 647	0.313
FITC anti-human CD57 Antibody	359604	CD57	FITC	<b>0.15625</b>

**Etape 6 : Marqueurs de Lineage (10min)**

PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19 Antibody	302230	CD19	PerCp 5.5	1.25
cFluor YG584 Anti-Human CD4	R7-20041	CD4	CF568	1.25
PerCP anti-human CD45 Antibody	368506	CD45	PerCP	1.25
CD16 Monoclonal Antibody (3G8), Pacific Orange	MHCD1630	CD16	pacific orange	0.625
BD OptiBuild™ BUV805 Mouse Anti-Human CD3	750970	CD3	BUV805	0.313
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD56	612766	CD56	BUV737	0.313
Spark Blue™ 550 anti-human CD8 Antibody	344760	CD8	spark blue	0.313

Lavage

**Etape 7 : perméabilisation 30min eBioscience™**

**Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set** 88-8824-00

Lavage

**Etape 8 : Marqueurs Intra-cellulaires (30min)**

BD Horizon™ BUV395 Mouse Anti-Ki-67	564071	KI-67	BUV395	0.625
eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)	00-8333-56		Perm buffer	99.375

## Annexe 2 : Tableau des étapes de marquage pour le panel « B, NK, monocytes, DC »

Anticorps	Cat	Marqueur	Couleur	Volume / puits
<b>Etape 1 : Viability (30min)</b>				
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	L34962		Viability dye PBS Volume à distribuer :	0.5 1000  <b>200</b>
Lavage				
<b>Etape 2 : Marqueurs Faibles (10min)</b>				
Brilliant Stain Buffer Plus	566385	Brillant Stain Buffer	N/A	10
CD25 Monoclonal Antibody (CD25-3G10), PE-Alexa Fluor 700	MHCD2524	CD25	PE Alexa F700	5
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD138	612834	CD138	BUV737	2.5
BD Horizon™ BV711 Mouse Anti-Human CD158a	563183	CD158a	BV711	2.5
BD OptiBuild™ BV650 Mouse Anti-Human NKG2A (CD159a)	747920	CD159a	BV650	2.5
BD OptiBuild™ BUV615 Mouse Anti-Human CD159C (NKG2C)	751059	CD159C	BUV 615	2.5
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD24 Antibody	311134	CD24	PEDz594	2.5
BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD274	558017	CD274	PECy7	2.5
CD38 APC-Fire810	303550	CD38	APC-Fire810	2.5
Purified NA/LE Human BD Fc Block™	564765	Fc Block	N/A	2.5
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD11b Antibody	301328	CD11b	PCPCy5.5	1.25
BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD123	563599	CD123	AF647	1.25
BD Horizon™ BB515 Mouse Anti-Human CD141	565084	CD141	BB515	1.25
BD OptiBuild™ BUV563 Mouse Anti-Human CD158b	749480	CD158b	BUV563	1.25
BD OptiBuild™ BV750 Mouse Anti-Human CD158e1 (NKB1)	746889	CD158e1	BV750	1.25
BD Horizon™ BV605 Mouse Anti-Human IgG	563246	IgG	BV605	1.25
Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Human Serum IgA, α chain specific	109-095-011	IgA	FITC	1
APC anti-human CD27 Antibody	356410	CD27	APC	1.25
HLA-DR PE-Fire810	307674	HLA-DR	PE-Fire810	0.625
Alexa Fluor® 700 anti-human IgD Antibody	348230	IgD	AF700	0.625



Brilliant Violet 570™ anti-human IgM Antibody	314517	IgM	BV570	0.625
BV510 Mouse Anti-Human CD9	563640	CD9	BV510	0.313
Brilliant Violet 785™ anti-human CD279 (PD-1) Antibody	329930	PD-1	BV785	0.313
PBS 0.5% BSA 1mM EDTA			Running Buffer	39.3125

**Etape 3 : Marqueurs Extra-cellulaires (30min)**

CD20 Monoclonal Antibody (HI47), Pacific Orange	MHCD2030	CD20	Pacific Orange	5
BD Horizon™ BUV661 Mouse Anti-Human CD11c	612967	CD11c	BUV661	2.5
APC/Fire™ 750 anti-human CD56 (NCAM) Antibody	362554	CD56	APCF750	2.5
Spark Blue™ 550 anti-human CD14 Antibody	367148	CD14	SparkBlue550	0.625
BD Horizon™ BUV496 Mouse Anti-Human CD16	612944	CD16	BUV496	0.625
BD Pharmingen™ PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD3	555341	CD3	PC5	0.625
PerCP anti-human CD45 Antibody	368506	CD45	PerCP	1.25
BD Horizon™ BUV805 Mouse Anti-Human CD19	749173	CD19	BUV805	0.313

Lavage

**Etape 4 : perméabilisation 30min eBioscience™**

**Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set** 88-8824-00

Lavage

**Etape 5 : Marqueurs Intra-cellulaires (30min)**

BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human Granzyme B	561142	Gzm B	PE	0.313
Brilliant Violet 421™ anti-human IL-10 Antibody	501422	IL-10	BV421	1.25
BD Horizon™ BUV395 Mouse Anti-Ki-67	564071	Ki-67	BUV395	0.625
eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)	00-8333-56		Perm buffer	97.8125

## Annexe 3 : Tableau des étapes de marquage pour le panel « Fonctionnel »

Anticorps	Cat	Marqueur	Couleur	Volume / puits
<b>Etape 1 : Viability (30min)</b>				
LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	L34962		Viability dye PBS	0.5 1000
Volume à distribuer par puits :				<b>200</b>
Lavage				
<b>Etape 2 : CCR7 (10min)</b>				
CCR7 APC fire 810	900002706	CCR7	APC fire 810	5
PBS 0.5% BSA 1mM EDTA			Running Buffer	95.00
<b>Etape 3 : Chémokine (5min)</b>				
Brilliant Stain Buffer Plus	566385	N/A	N/A	10
BUV563 Rat Anti-Human CXCR5 (CD185)	741316	CXCR5	BUV563	0.625
<b>Etape 4 : TCRgd (10min)</b>				
TCRγ/δ Antibody, anti-human, REAfinity	130-113-514	TCRgd	PerCPC-vio700	2
<b>Etape 5 : Marqueurs Extra-cellulaires (20min)</b>				
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19 Antibody	302230	CD19	PerCP Cy5.5	1.25
cFluor YG584 Anti-Human CD4	R7-20041	CD4	CF568	1.25
PerCP anti-human CD45 Antibody	368506	CD45	PerCP	1.25
CD16 Monoclonal Antibody (3G8), Pacific Orange	MHCD1630	CD16	Pacific Orange	0.625
BD OptiBuild™ BUV496 Mouse Anti-Human CD45RA	750258	CD45RA	BUV496	0.3125
BD OptiBuild™ BUV805 Mouse Anti-Human CD3	750970	CD3	BUV805	0.313
BD Horizon™ BUV737 Mouse Anti-Human CD56	612766	CD56	BUV737	0.313
Spark Blue™ 550 anti-human CD8 Antibody	344760	CD8	spark blue	0.313
Lavage				
<b>Etape 6 : perméabilisation 30min eBioscience™</b>				
88-8824-00				
<b>Intracellular Fixation &amp; Permeabilization Buffer Set</b>				
Lavage				
<b>Etape 7 : Marqueurs Intra-cellulaires (30min)</b>				
APC Mouse Anti-Human IFN-γ	554702	IFNγ	APC	5

BV711 Rat Anti-Human and Viral IL-10	564050	IL-10	BV711	5
BV421 Rat Anti-Human IL-13	563580	IL-13	BV421	5
IL-17A Monoclonal Antibody (eBio64DEC17), PE, eBioscience	12-7179-42	IL-17a	PE	5
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human IL-4	560672	IL4	PE Cy7	2.5
TNF-α Antibody, anti-human, FITC	130-120-490	TNFa	FITC	1.25
eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)	00-8333-56		Perm buffer	76.25



Contents lists available at ScienceDirect

## Cytokine and Growth Factor Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytogfr](http://www.elsevier.com/locate/cytogfr)



### Role of JAK inhibitors and immune cells in transplantation

Nicolas Sailliet<sup>a,b</sup>, Carole Brosseau<sup>a,b</sup>, Jean-Michel Robert<sup>c</sup>, Sophie Brouard<sup>a,b,\*</sup>



<sup>a</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>b</sup> Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>c</sup> Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Cibles et Médicaments du Cancer et de l'Immunité IIGIMed-AE1155, Institut de Recherche en Santé 2, Nantes, France

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Cytokine  
JAK inhibitor  
JAK  
Transplantation  
Immunosuppressive treatment

#### ABSTRACT

Immunosuppressive challenge after transplantation has dual objectives, namely, to efficiently inhibit immune populations involved in acute, chronic, humoral or cellular transplant rejection while minimizing the effect on immune integrity toward pathogens. The current immunosuppressive strategies show limited efficacy and remain associated with strong side effects, and thus, it is essential to develop new strategies. The use of Janus kinase (JAK) inhibitors is one of the new strategies focusing on cytokine pathways. Specifically, the first-generation JAK inhibitors (JAKis) showed low specificity toward the four known JAK molecules and did not exhibit better effects than calcineurin inhibitors, which constitute the standard treatment posttransplantation. However, because the new generation of JAKis present higher specificity, we are gaining further insights on the response of cells to these inhibitions. This review focuses on the impact of JAKis on different immune cell subsets, focusing on their role in transplantation.

#### 1. Drug development in transplantation.

Kidney transplantation is followed by years of immunosuppressive treatments to prevent transplant rejection, but the currently used strategies induce notable toxicity or secondary disorders [1,2]. At present, calcineurin inhibitors are the most common drug used posttransplantation. However, cyclosporine can affect the cardiovascular, renal, endocrine and metabolic systems and increase the risk of developing skin and lymphoproliferative malignancies [3]. The challenge associated with the development of immunosuppressive therapies is thus clear: in addition to the life-long treatments required for the prevention of graft rejection, we need to introduce new immunosuppressive strategies that exhibit improved efficacy with minimal side effects.

Decreased side effects can be achieved by combining different drugs that inhibit different pathways, which would allow us to reduce the dosage of each drug. A second strategy is to focus on new drugs whose effects are strictly limited to immune cells. Over the last decade, new strategies have emerged, and the first commercialized molecules are already available in the market [1]. These strategies focus on cytokine pathways, which are major components of immune cell communication.

#### 2. JAK family and pathways.

Cytokine signal transduction is mediated by different kinase

pathways, and the main one is the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activators of transcription (STAT) pathway [4]. The JAK family comprises four tyrosine kinases (JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2), which are composed of a kinase domain with enzymatic activity, a pseudokinase domain that regulates the kinase activity and two binding domains, namely, SH2-like and 4.1 ezrin radixin moesin (FERM), which associate with the intracellular domains of 60 cytokine or hematopoietic growth factor receptors [5,6] (Fig. 1). In the JAK/STAT pathway, two or three JAKs form a complex, which results in the autophosphorylation of the JAK molecules and in turn the phosphorylation of their substrate; subsequently, the intracellular domain of the receptor undergoes a conformational change to provide access to the docking site for STATs, which are then phosphorylated upon binding [7,8]. Once activated, STATs dimerize and translocate to the nucleus, where they act as transcription factors to shape the immune response [8] (Fig. 2). However, the JAK-STAT pathway is not the only signal transduction pathway downstream of JAK. Through its SH2 domain, a JAK protein also binds to proteins that recruit MAP kinases or PI3K-AKT through pathways that do not interact with JAK/STAT signaling to induce a different transcriptional profile [9,10]. JAK inhibitors (JAKis) are designed as selective ATP competitive inhibitors that prevent the phosphorylation of STAT without altering its binding abilities [11].

Numerous studies have characterized the JAK-STAT pathways. JAK1 is associated with interferons [12], the IL-6 family (IL-6, IL-11,

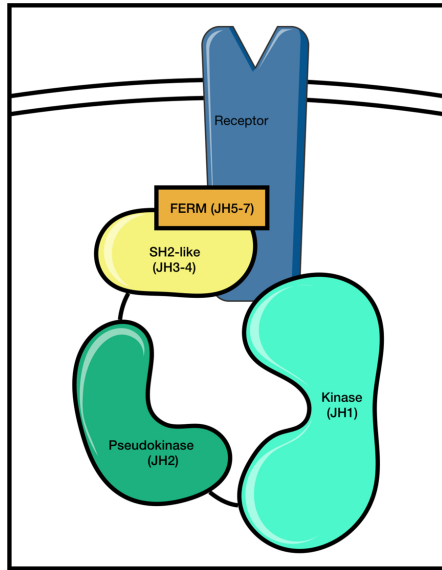
\* Corresponding author at: Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR1064, 30 bd Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 1, France.  
E-mail address: [sophie.brouard@univ-nantes.fr](mailto:sophie.brouard@univ-nantes.fr) (S. Brouard).

<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.05.002>

Received 16 March 2019; Accepted 9 May 2019

Available online 11 May 2019

1359-6101/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



**Fig. 1.** Structure of the JAK. Janus kinases are composed of 7 JAK homology domains (JH1-7) associated with the different functions of the molecule: The carboxyl-terminal kinase domain (JH1) carry the enzymatic activity together with the catalytic sites for ATP and substrates. Most JAK inhibitors are competitive inhibitors of ATP. The pseudokinase domain (JH2) has an autoregulatory activity through the phosphorylation of the kinase domain. SH2-like domain (JH3-4) has a similar structure with SH2 domains but does not interact with phosphotyrosines. Associated with the 4.1 Ezrin Radixin Moesin (FERM) domain (JH 5–7), the two N-terminal domains are the receptors binding sites.

ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), cardiotrophin 1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC), and IL-27 [13], the IL-2 family (IL- 2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21) [14] and the IL-10 family (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, and IL-26) [15]. JAK2 is associated with growth factors and hormones (i.e., erythropoietin, thrombopoietin, growth hormone, prolactin,

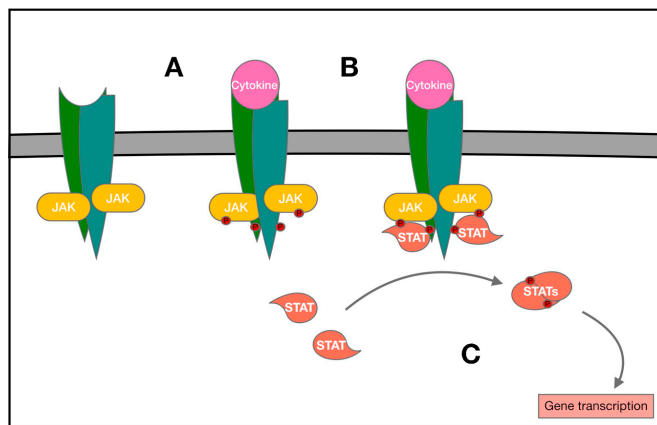
epidermal growth factor, G-CSF, GM-CSF), interferon (IFN)  $\gamma$ , IL-3, IL-5, the IL-6 family and the IL-12 family (IL-12, IL-23, and IL-27) [16–19]. In contrast, JAK3 is only associated with the  $\gamma c$  chain in lymphoid cells and is thus specific to the IL-2 family [20], and TYK2 is associated with type I interferons (IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ ) and the IL-6, IL-10 and IL-12 families [19,21–23,15].

### 3. Clinical relevance of JAK inhibitor development.

JAKis are small molecules marketed or in development for the treatment of bowel or skin autoimmune diseases (Crohn’s disease, ulcerative colitis, psoriasis, rheumatoid arthritis), hematological malignancies and graft loss prevention [24]. These molecules are designed to act as ATP competitive inhibitors and show different types of inhibition toward JAKs with more or less stringent specificities. Although treatment with JAKis, such as tofacitinib or baricitinib, has shown efficacy in disease-modifying antirheumatic drug (DMRAD)-unresponsive rheumatoid arthritis [25,26], clinical trials with the low-specificity JAKi tofacitinib have shown a high frequency of infections due to the broad immunosuppressive state [27]. Thus, this JAKi is not superior to cyclosporine in the context of transplantation. After development of the first-generation JAKis, studies have identified new drugs with a more specific profile toward JAKs and a response with the desire to limit the effects to the deficient cells.

JAK1- or JAK2-knockout (KO) mice are perinatally lethal, and JAK3 or TYK2 KO leads to important immune defects [28–30,8]. The role of JAKs in cell signaling makes these kinases important for the biology of several cell types [31]. The administration of therapeutic doses of tofacitinib (approximately 3  $\mu$ M) to high-fat diet-fed C57BL/6 mice exerts limited effects and does not alter the body weight or composition (muscle mass and body fat mass), whereas the administration of this JAKi to JAK2-KO, high-fat diet-fed mice results in glucose intolerance and insulin resistance [31]. The administration of tofacitinib to patients with rheumatoid arthritis does not affect the muscle mass but significantly increases the body fat mass [32]. The effects of tofacitinib or another JAKi on another nonhematopoietic disorder have not been described [27].

Different transplant dysfunctions do not present the same immune profile, and the immune profile depends on not only the grafted organ but also the initiation of inflammation, which leads to graft loss. In this paper, we review the effects of JAK/STAT inhibition on different immune cells and their involvement in graft loss prevention. All JAKis reviewed in this paper are listed in Fig. 3 (Fig. 3).



**Fig. 2.** Cytokine signal transduction through JAK/STAT pathway. A- Cytokine binding to the receptor results in the autophosphorylation of the Janus Kinases (JAK) which subsequently phosphorylate the intracellular regions of the receptor. B- These phosphorylations reveal docking sites for Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) both on the JAKs and on the receptor subunits. C- STATs are then phosphorylated upon binding. Phosphorylated STATs dimerize and translocate to the nucleus where they act as transcription factors to shape the immune response.

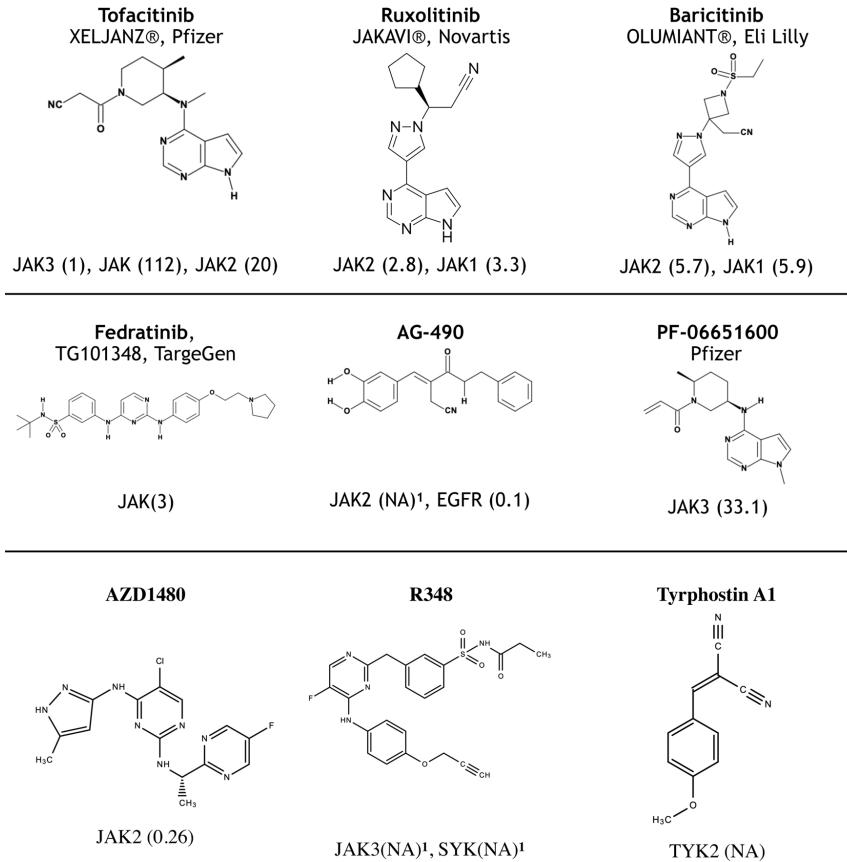


Fig. 3. List of JAK inhibitors reviewed in this paper.

JAK inhibitors as described in the literature (name, commercial name, structure and half max inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) (nM),  $IC_{50}$  were obtained from selleck.com).<sup>(1)</sup>:  $IC_{50}$  was not assessed (NA) in a cell-free assay.

#### 4. Hematopoietic stem cells.

The differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) to immune cells is a multi-step program, and the fate of the cells at each intermediate state is tightly regulated by the levels of several cytokines in the environment (interferons and colony-stimulating factors), particularly those associated with the JAK2 pathways, which serve as both stimulatory and inhibitory factors. Therefore, the long-term action of JAKis on bone marrow resident cells impacts all immune cells with low specificity.

The JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib results in 20% inhibition of JAK2 and STAT5 phosphorylation in CD34+ HSCs from chronic myeloid leukemia patients [33], and this inhibition is characterized by a slight increase in cell death and reduced cell proliferation. After 72 h without treatment, CD34+ cells exhibit an increased recovery over the baseline level (140%). In contrast, the administration of ruxolitinib at clinically relevant doses has a low impact on mesenchymal stem cell proliferation and survival in healthy patients and does not affect their clonogenicity [34]. JAKis exert a potent inhibitory effect on HSCs through the inhibition of JAK2. Ruxolitinib has been approved for the treatment of myeloproliferative neoplasms. The inhibition of HSCs or

other early-stage hematopoietic progenitors is an effective strategy for inhibiting a broad range of unspecific populations of immune cells as well as erythrocytes and platelets [35]. Thus, the blockage of these early populations is not desirable unless these progenitors are involved in the disease (i.e., myelofibrosis).

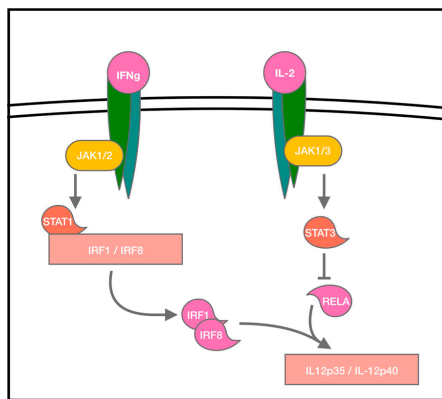
#### 5. JAKis efficiently inhibits $IFN\gamma$ + CD40L-stimulated DCs but not LPS-stimulated DCs.

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (in addition to B-cells and macrophages) and act as initiators of the adaptive immune response. Pathogen and danger detection through pattern recognition receptors (e.g., Toll-like receptors) or intrinsic activation (e.g., CD40 L and  $IFN\gamma$ ) induce DC migration to lymph nodes and their functional maturation (decrease of pathogen detection, increase of costimulatory ability and secretion of inflammatory cytokines) [36]. There are two main subsets of DCs: plasmacytoid DCs (pDCs) and conventional DCs (cDCs). pDCs are involved in antiviral or intracellular bacterial responses and induce abundant secretion of type I IFN and other cytokines, such as IL-12 (Th1 activation) and IL-15 (positive feedback), whereas cDCs play important roles in T-cell activation with

higher antigen-presentation activity [37]. Monocytes can also differentiate into a specific DC subset, namely, moDCs, which can efficiently activate the proliferation, cytotoxicity and cytokine production of natural killer (NK) cells and the proliferation and cytokine secretion of Th1 cells through the secretion of IL-2 and IL-12 [37].

In the context of organ transplantation, ischemia reperfusion injury (IRI) is a leading cause of graft failure that involves the induction of alloimmune-specific responses to the graft. Ischemia upregulates several inflammatory cytokines and chemokines and enhances MCH-II and adhesion molecule expression on DCs and epithelial cells. Moreover, dying cells constitute an important source of danger-associated molecular patterns (DAMPs) [38]. In healthy kidney transplanted patients, donor resident DCs in the graft are replaced within 7 days by host DCs, which are responsible for T-cell activation. Even in healthy tissues, host DCs might present alloantigens through cross dressing with donor DCs (donor CHM-peptide presented by recipient DC) [39]. Thus, the post-transplantation graft environment favors DC activation during both the acute and chronic phases of activation, which is necessary for subsequent T-cell activation, and thus, DCs play a role at the early stage of transplant rejection. DCs also have the potential to delay allograft rejection through the secretion of IL-10 and the inhibition of allogenic T- and B-cell proliferation and effector activity when stimulated with mesenchymal stromal cells [40]. Thus, it is important to block intrinsic DC activation without perturbing the generation of naïve DCs.

In IFN $\gamma$  + CD40L-stimulated moDCs, JAK1 inhibition (using siRNA or ruxolitinib) leads to the downregulation of IL-12 production, whereas in cells stimulated with LPS (TLR4) + IL-1 $\beta$ , JAK1 inhibition leads to increased expression of IL-12 [41]. On the one hand, JAK1 directly transduces IFN $\gamma$  signaling through JAK1/JAK2-mediated STAT1 phosphorylation, and this signaling results in the induction of IRF1 and IRF8 transcription and thereby in the induction of IL-12p35 and IL-12p40 transcription. On the other hand, IL-2-stimulated DCs induce STAT3 phosphorylation through the JAK1/JAK3 pathway. STAT3 forms a complex with the transcription factor RELA, and this complex inhibits the transcription of RELA-dependent genes, including IL-12p35 [41] (Fig. 4). Other studies have described tofacitinib as a potent inhibitor of the IFN $\alpha$  pathways because it inhibits its production by single-stranded RNA (TLR7)-stimulated pDCs and the action of IFN $\alpha$  on effector cells [42,43]. These data highlight the potential of JAK1 inhibitors to inhibit DC subsets in the context of transplantation, in



**Fig. 4.** JAK inhibition may impact opposite pathways. JAK are overused kinases for cytokine signal transduction. The redundancy between JAK and STAT association led to the implication of the same JAK in both activation and inhibition of a gene transcription. In dendritic cells, JAK1 inhibitors may downregulate IFN $\gamma$  mediated IL-12 transcription and upregulate its transcription in presence of IL-2.

which DCs are activated by the release of DAMPs combined with proinflammatory cytokines in the graft environment.

## 6. JAKs mainly affect T-cells through $\gamma$ C signaling.

T-cells are a wide and heterogeneous population involved in adaptive immunity and play an important role in graft rejection. Moreover, upon activation, T-cells secrete numerous proinflammatory cytokines and chemokines, and these activate other effector cells, thereby amplifying the immune response to the graft.

### 6.1. Important role of JAK in CD8 + T-cell activation with only minor implications on cell survivability.

CD8 + T-cells are an effector population involved in adaptive cellular immunity. CD8 + T-cell cytotoxicity is mediated through the interaction of FAS with FASL in combination with perforin and granzyme secretion.

The specificity of T-cells is not absolute, and a single TCR can recognize both different peptides and MHC molecules. In the context of transplantation, this cross-reactivity leads to the interaction of TCRs with allogeneic cells in a manner similar to that observed with syngeneic cells. EBV- or CMV-specific memory CD8 + T-cells frequently exhibit cross-reactivity toward allogeneic MHC class I complexes [44]. IRI induces a massive infiltration of the graft environment by effector-memory CD8 + T-cells that mediate direct and severe injuries [45]. Thus, memory T-cells are a high-priority target of immunosuppressive treatments after transplantation.

A JAK2 inhibitor (AZD1480) has been shown to prevent the IFN $\gamma$ -induced upregulation of MHC class I in mice and humans and thus reduces the probability of donor cells stimulating alloreactive CD8 + T-cells. In a murine model of autoimmune insulinitis, this inhibition leads to reduced accumulation of CD8 + T-cells in islets [46]. Clinical studies on the effect of tofacitinib in renal allograft recipients observed that this drug has a low impact on the CD8 + cell count and strongly inhibits IL-2 and IL-15 signaling [47,48]. Tofacitinib-induced JAK1/JAK3 inhibition strongly affects  $\gamma$ C cytokine-induced STAT5 phosphorylation in CD8 + cells, an effect that is highly reversed after the treatment is stopped, whereas JAK2 inhibition blocks interferon responses. These data suggest an important role for JAK in CD8 + cell activation with only minor implications on cell survivability.

### 6.2. JAKi efficiently inhibits effector CD4 + T-cells but not regulatory CD4 + T-cells.

CD4 + T-cells are a highly heterogeneous population that includes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 cells, regulatory CD4 + T-cells (Tregs) and follicular helper T-cells (Tfh cells) differentiated from TCR-activated naïve CD4 + T-cells (Th0 cells). The characteristics of the activated cells depend on the cytokine environment after TCR engagement. CD4 + T-cells play a central role in adaptive immunity, leading to the activation of effector cells depending on the recognized pathogens [49].

#### 6.2.1. Implication of all four JAKs in Th1 functions.

Th1 cells are stimulated by IL-12 and IFN $\gamma$  produced by innate cells (NK cells, DCs and macrophages) [49]. This cytokine stimulation leads to the activation of STAT1, which in turn activates a second transcription factor, T-bet [50]. Th1 cells are a source of IFN $\gamma$  and IL-2, which serve as diverse mediators of inflammation by increasing IgG production [51] and the proliferation and activation of cytotoxic lymphoid cells [52,53], macrophages [54] and DCs [55]. All four JAKs play important roles in the development of Th1 cells in a nonredundant manner through the IL-2, IL-12 or IFN $\gamma$  pathways.

The implication of Th1 cells in transplant rejection has been widely assessed [56–58]. Alloreactive Th1 cells produce IL-2 to enhance the proliferation of primed cytotoxic CD8 + T cells, which in turn induce

positive feedback through the production of IFN $\gamma$ . Different types of JAKis efficiently block CD4+ IFN $\gamma$ + (Th1) cell differentiation. Tofacitinib reduces IFN $\gamma$  mRNA production in human CD4+ T-cells stimulated in vitro with anti-CD3/anti-CD28 antibodies and IL-2 [59]. Tofacitinib also significantly reduces Th1 differentiation in the spleen of arthritis rats [60]. The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib reduces the expression of the Th1-related cytokines IFN $\gamma$  and IL-12 in a rheumatoid arthritis rat model by 55–80% [61]. The more selective JAK3 inhibition obtained with PF-06651600 or R348 has also been shown to block Th1-mediated IFN $\gamma$  production in healthy human volunteers [62] and in a murine cardiac allograft model [63].

#### 6.2.2. Pan-JAKi, but not JAK3i, inhibits Th2 cell generation.

Th2 cells are stimulated in the presence of IL-2 and IL-4 and are an important source of IL-4, IL-5 and IL-13, which are mediators of humoral immunity (immunoglobulin (Ig) class switch to IgM, IgA, and IgE, eosinophil activation, and T-cell proliferation [64]. Th2 stimulation is also dependent on different JAKs: both IL-2R and IL-4R activation engage JAK1 and JAK3, whereas IL-5 activation is dependent on JAK2 [65]. In addition, the IL-13 receptor is associated with JAK1, JAK2 and TYK2, but only JAK1-specific inhibition leads to the down-regulation of STAT6 phosphorylation [66]. Clinical studies in kidney transplantation have shown that during acute rejection, only 2% of CD4+ T-cells that invaded the graft show a Th2 secretion profile [67], indicating a minimal role for Th2 cells in acute rejection compared with that of Th1 cells. However, an analysis of mRNA collected from kidney biopsies exhibiting chronic rejection reveals a preference toward a Th2 over a Th1 profile [68]. Because the differentiation to Th2 cells is mediated by IL-2 and IL-4, which requires the  $\gamma$ c chain and the JAK1/JAK3 dimer, their inhibition with tofacitinib efficiently modulates the generation of Th2 cells in healthy individuals [69]. However, the specific inhibition of JAK3 by R348 fails to significantly inhibit IL-4 secretion in a murine cardiac allograft model [63]. These data highlight the dominant role of JAK1 over JAK3 in  $\gamma$ c cytokine signal transduction, as described by Haan [70].

JAK3is reduce FoxP3 expression, resulting in cells with still a regulatory phenotype and JAK2is enhance regulatory functions.

Tregs are suppressive cells characterized by the transcription factor forkhead box P3 (FoxP3) [71] that act as a negative feedback for immune responses through the production of IL-10 and TGF $\beta$  (i.e., FoxP3) [71], an antiproliferative effect, and the downregulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines, MHC II and costimulatory molecules [72]. Tregs constitute a heterogeneous population. Natural (n) Tregs acquire their regulatory phenotype through thymic development, whereas adaptive Tregs are generated in the periphery from Th0 cells in the presence of TGF $\beta$  [73]. IL-2 reinforces this signal through pSTAT5 induction, which in turn enhances FoxP3 production, and IL-10 is known to induce STAT3 phosphorylation and regulate Th17 pro-inflammatory responses [74,75]. The specific in vitro inhibition of JAK2 achieved with TG101348 increases the ratio of Tregs to effector T-cells in healthy human donors [76]. An in vitro assay of mouse autoimmune arthritis revealed that AG-490, a JAK2 inhibitor, enhances FoxP3 expression under inflammatory conditions (anti-CD3, anti-CD-28, anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-4, TGF $\beta$  and IL-6) [77]. JAK2 mediates STAT3 phosphorylation, which negatively regulates STAT5 phosphorylation. JAK2 inhibitors have been shown to eliminate STAT3 activity mediated by inflammatory cytokines (IL-6) [77,78] to potentially increase IL-2 and subsequent Treg activity. In type 1 diabetic NOD mice, specific inhibitors of JAK3 efficiently inhibit IL-2 signaling and significantly reduce the nTreg (CD25+ FoxP3+) population, confirming the essential role of the IL-2/JAK3/STAT5 pathway in Treg activation [79]. However, the cells generated in the absence of IL-2 signaling in pro-Treg conditions (IL-10 and TGF $\beta$ ) secrete elevated levels of TGF $\beta$  and IL-10, which are two common Treg cytokines [79]. Overall, JAKis do not affect the in vivo activity of Tregs, which show active production of their signature cytokines.

#### 6.2.3. JAKi preferentially inhibits pathogenic IL-23, IL-6 and IL-1 $\beta$ -induced Th17.

Th17 cells can be stimulated by TGF $\beta$  and IL-6 but can also be produced in the presence of IL-23, IL-6 and IL-1 $\beta$  [80]. The cells can secrete IL-2, IL-17A-F and IL-22, but more than 2000 genes are differentially expressed. This difference shows that IL-23-, IL-6- and IL-1 $\beta$ -generated Th17 cells show increased pathogenicity. In both conditions, IL-23 is required for the secretion of IL-17 and IL-22 by Th17 cells [80]. Th17 cells participate in acute transplant rejection by recruiting neutrophils into the graft through the secretion of IL-17 via a JAK-independent pathway [81]. TGF $\beta$ -induced Th17 cells show less dependency on Tregs upon JAK activation. Experimental results from mice administered tofacitinib revealed an increased proliferation of TGF $\beta$ - and IL-17-producing cells after stimulation with both TGF $\beta$  and IL-6. This increase in Th17 differentiation is explained by the inhibition of the IL-2 pathway, which effects a negative feedback effect on this population. In contrast, tofacitinib suppresses the generation of Th17 cells generated in the presence of IL-23, IL-6 and IL-1 $\beta$  [50]. A high concentration of the Tyk2 inhibitor tyrphostin A1 (50 mg/kg) in a mouse model significantly reduces IL-23 and IL-17 production [82].

#### 6.2.4. IL-22 and IL-9 inhibit JAK dependent proinflammatory cytokines.

Th22 cells are a less-known T-cell population defined as CD4+ T-cells that produce IL-22 and TNF $\alpha$  but not IL-17, IL-4 or IFN $\gamma$  and exhibit skin-homing properties [83]. Naïve CD4+ T-cells differentiate into Th22 cells in the presence of IL-6 and TNF $\alpha$  [83,84]. There is little information on the importance of Th22 cells compared with other IL-22-producing cells in transplant rejection. Th22 cells are dependent on TNF $\alpha$ , which has been implicated in the pathogenesis of acute and chronic transplant rejection [85,86], but no Th22 cells have been shown to infiltrate transplanted organs. IL-22 is secreted by many cell types, including Th22 cells and other helper T-cells (Th1, Th2, and Th17), innate lymphoid cells (ILCs), monocytes and macrophages. IL-22-knockdown mice show accelerated rejection of heart allografts, revealing the anti-inflammatory role of this cytokine in transplantation [87]. The anti-inflammatory properties of IL-22 have been described in an autoimmune myocarditis rat model [88]. IL-22 inhibits the IL-1-mediated upregulation of prostaglandin synthetases, IL-6, COX2, MIP-2, MCP-1 and CINC-2. The inhibition of IL-22 signaling by JAKis reinforces the action of IL-1 but does not induce direct damage to the graft [89–92]. The information associated with Th9 cells is similar to that associated with Th22 cells. Few studies have focused on Th9 cells in the context of transplantation, and their role is thus uncertain. Th9 cells are one of many IL-9-secreting cells, similarly to Th2 and Th17 cells, Tregs, NKT cells and mast cells [93]. Similar to IL-22, IL-9 inhibition during IRI significantly augments the structural damage in the kidneys of transplanted mice [94]. IL-9 is a member of the IL-2 family of cytokines that share the  $\gamma$ c chain and requires JAK1/JAK3 signaling [93]. IL-9 and IL-22 are thus tolerogenic cytokines through the inhibition of several pro-inflammatory factors whose activation is also dependent on JAKs. Thus, the overall activator or inhibitory role of JAKis in these factors should be investigated.

#### 6.2.5. Tfh cells constitute an effective strategy for inhibiting B-cell generation in germinal centers.

Tfh cells are generated from primed naïve T-cells in the presence of IL-6 and IL-21 but are negatively regulated by IL-2 and IL-7 through IL-6Ra downregulation [95]. Other cytokines, such as IL-12 and TGF- $\beta$ , have been shown to potentiate Tfh differentiation [96,97]. The expression of CXCR5 induces their migration in the germinal centers (GCs) of lymphoid organs [98]. Tfh cell activation in GCs is dependent on TCR engagement and costimulatory signals provided by cognate B-cells [99]. Tfh cells are involved in B-cell-mediated immunity by activating B lymphocyte differentiation into plasmablasts and IgG and IgM production through the secretion of IL-21 and IL-4 [100,101]. Three months after kidney transplantation, the number of peripheral Tfh cells



remains stable in patients with no pre-existing donor-specific antigens (DSAs), whereas the T<sub>H</sub> count in sensitized patients is increased [102]. A previous study showed that B-cells require the direct binding of T<sub>H</sub> cells with donor antigen-presenting cells to efficiently induce IgG and IgM production in B-cells [103]. The inhibition of B-cells by CD20 inhibition does not increase the transplant survival rate of model mice [104], whereas treatments targeting T<sub>H</sub> cells with CD40, IL-21 or IL-21R antagonists efficiently reduce DSA production [100,102,105]. T<sub>H</sub> cells have regulatory equivalents (T<sub>fr</sub> cells) derived from Tregs expressing CXCR5 [106]. These results indicate the potential of JAKis for inhibiting B-cell activation in the context of transplantation through the establishment of a tolerogenic background in lymph node GCs.

The blockade of STAT3 significantly reduces both the count and the activity of T<sub>H</sub> cells *in vivo*, resulting in impaired activation of B-cells and the production of Ig [107]. Thus, JAKis might act on these cells. Tofacitinib downregulates the T<sub>H</sub> cell count and activity without inhibiting the T<sub>fr</sub> cell population in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [108].

Altogether, these data show the importance of JAK-dependent cytokines in the biology of T-cells. All T-cells are dependent on IL-2 to proliferate and express their defining transcription factors. Thus, JAK1 and JAK3 inhibitors efficiently block non-specific T cell activation.

### 7. JAKis do not affect Naïve B-cell generation.

B-cells comprise the main population of cells involved in adaptive humoral immunity by producing soluble Ig molecules, which are also known as antibodies and specifically target threatening antigens [109]. Their development from a common lymphocyte progenitor in the bone marrow requires the expression of three JAK-dependent cytokines, namely, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-7 and stem cell factor (SCF) [110–112]. The main function of B-cells is the release of antigen-specific antibodies that can activate the complement system and antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) [113,114]. In addition, B-cells can also internalize pathogens recognized by their B-cell receptor (BCR) and then present peptides on MHC II to activate cognate T cells [114,115]. Once generated in the bone marrow, immature B-cells migrate to secondary lymphoid organs to form naïve marginal zone B-cells (MZB) or follicular B-cells. Despite the implication of several IL-2 family cytokines in B-cell development, JAK3 loss-of-function mutations inhibit T-cell development but do not affect B-cell compartments [29].

#### 7.1. T-cell-independent activation is not increased in transplantation.

T-cell independent antigens activate BCR signaling in MZB cells. The signaling downstream of BCRs and TLRs/IL-1 induces strong IgM secretion independent of JAK [116,117]. Thus, JAKis should not target bacterial and viral TLR-dependent responses [118]. These T-cell-independent B-cell stimulations remain minor in allograft transplantation [119].

#### 7.2. Follicular and memory B-cells generate plasma cells in transplantation.

T-cell-dependent antigens activate follicular B-cells [118]. In the context of transplantation, host naïve circulating B-cells recognize DSAs from graft endothelial cells [120]. Primed B-cells internalize DSAs through phagocytosis and present them via MHC class II. These cells re-enter the B-follicle, and through cytokinic crosstalk with T<sub>H</sub> cells (IL-4, IL-5, IL-6, IL-21 and BAFF) and cell-cell interactions, the cells undergo massive proliferation to form long-lived memory cells in GCs and antibody-secreting plasma cells. [121,122]. Plasma cells secrete DSA-specific Ig that cause injury to the endothelium through the complement pathway, antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) and the recruitment of inflammatory cells (monocytes/macrophages, NK cells and neutrophils) by binding to the Fc portion of DSAs [123,119].

Memory B cells are long-lived quiescent cells that are generated

from activated GC cells during the primary immune response and are programmed through epigenetic mechanisms to rapidly differentiate into antibody-secreting plasma cells [118]. Donor-specific memory B-cells can be expressed by recipients after pre-graft sensitization (blood perfusion, during pregnancy or from a previous transplantation) [124,120]. Thus, it is more important to block memory B-cell activation than to block their generation. The differentiation of memory B-cells to plasma cells is restricted to the expression of Blimp1, the absence of the memory subset and the inhibition of BACH2, which repress the transcription of Blimp1 [125].

### 7.3. Plasma cell-determining genes are downregulated by JAKis.

Plasma cells are terminally differentiated, nondividing B-cells that arise from activated naïve or memory B-cells that produce high amounts of antibodies. The activation of both naïve and memory cells requires BCR, CD40 L and cytokine signals (IL-21) that converge to activate Blimp1 [126]. However, the cytokinic threshold is lower in the memory subset than in the naïve subset. Thus, higher concentrations of the inhibitor are required to efficiently block memory B-cell activation [127,100]. The JAKis baricitinib and tofacitinib efficiently induce dose-dependent inhibition of the transcription of plasmablast-determining genes (Blimp-1, Xbp-1 and IRF-4) downstream of STAT3 in humans and inhibit the production of IL-6 [128,129].

Class switching is an important feature of B-cells, which allows diversification of the effector functions of the generated antibodies (cell surface receptor binding, polymerization, and tissue diffusion). Class switching is initiated by CD40 L and/or TLR stimulation, and the isotype is determined by the cytokine background [130]. In mice, class switching to IgG or IgA is not affected by tofacitinib *in vitro* [129].

### 7.4. The JAK2 inhibitor suppresses the secretion of IL-10 from tolerogenic regulatory B-cells (Bregs).

Bregs are a regulatory cell population capable of producing anti-inflammatory cytokines such as IL-10 [131], granzyme B [132], IL-35 [133] and TGF- $\beta$  [134]. Bregs regulate inflammation through various mechanisms, such as the induction of FoxP3 expression in CD4 + T-cells to promote the T-reg phenotype [135] and the induction of effector T- and B-cell apoptosis [136,137]. Lee et al. showed the role of Bregs in graft tolerance through the adoptive transfer of anti-CD45RB plus anti-TIM-1-treated B-cells exhibiting regulatory activity into B-cell-deficient mice, which resulted in an increased graft survival to more than 100 days, whereas the adoptive transfer of naïve B-cells had no effect [138]. Clinical evidence from human trials associates tolerance with increased frequencies of circulating Bregs [139,140]. The induction of IL-10-producing Bregs requires interaction with CD40 [141]. Among the CD40-induced signals, the JAK3-STAT3 pathway is known to induce IL-10 gene expression [142]. Autocrine IL-10-induced JAK1/JAK2-STAT3 signaling is also important for sending positive feedback signals to Bregs [143]. The JAKi AG490 suppresses the generation of CD40 + hiCD5 + Bregs [143]. TYK2 is phosphorylated in response to IL-10 stimulation, but TYK2<sup>-/-</sup> mice are responsive to IL-10 [144]. In conclusion, the use of JAKis that inhibit the JAK3-STAT3 or JAK1/JAK2-STAT3 pathways is not a good strategy in the context of transplantation because these pathways induce the generation of both effector plasma cells and tolerogenic Bregs. In contrast, the use of TYK2 inhibitors would be more appropriate to avoid impacting the secretion of IL-10 by Bregs [144].

### 8. JAKis block innate lymphoid cell (ILC) differentiation from progenitors and ILC1 but not ILC2 and ILC3 function.

ILCs constitute a broad lymphocyte population that can be considered an antigen-independent version of T-cells with similar transcription factors, cytokine activation and secretion profiles. NK cells are

the innate counterpart of CD8 + T-cells and the most studied ILC. Three groups of ILCs called ILC1, ILC2 and ILC3 reproduce the action of Th1, Th2 and Th17 cells because they show similar cytokine activation and secretion profiles [145]. NK cells are a subpopulation of ILC1, the innate counterpart of CD8 + T-cells and the most studied ILCs [146].

NK cells constitute the main cytotoxic population of the innate immune system that has been implicated in malignant and virus-infected cell recognition and death. NK cell cytotoxicity is dependent on the balance between numerous NK receptors (NKR), which dictate NK cell-targeted lysis. Inhibitory receptors allow the avoidance of cytotoxicity toward self-cells such that NK cells can differentiate self from nonself (increased activation of activating receptors) and missing-self (decreased activation of inhibitory receptors). These receptors are independent of JAKs, but the response of NK cells needs to be triggered by interactions with IL-12 and IL-15 from activated macrophages or DCs [147]. In addition to their cytotoxic role, NK cells are important due to their ability to produce cytokines (mainly IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) during the early phases of infections that connect innate and adaptive immunity. IFN $\gamma$  production by NK cells is dependent on both IL-12 and TLR stimulation [148]. NK cells are one of the immune populations that were first associated with transplant rejection in both cell- and antibody-mediated rejection [149]. In rat models of heart transplant rejection, NK cells infiltrate the graft environment within 3 h after reperfusion [150]. In humoral rejection, NK cells are an important source of IFN $\gamma$  for B-cell differentiation, and NK cell-B-cell interactions trigger Ig class switching and secretion in the absence of any other stimulation [151]. In addition to this B-cell activator role, NK cells directly induce microvascular injuries through ADCC [152].

Tofacitinib significantly reduces the peripheral NK cell number in kidney transplanted patients [153]. JAK3 KO or the use of the JAK3s tofacitinib and PF-06651600 is associated with the blockade of pre-NK cell progenitors and ILC progenitor maturation in a mouse model, and this deficiency has been attributed to a loss of IL-15 signaling [154]. Experimental evidence shows that tofacitinib inhibits the ILC1 production of IFN $\gamma$  and yields better results than the JAK3-specific inhibitor, indicating synergy between JAK3 and JAK1 or JAK2 inhibition. Tofacitinib exerts no effect on ILC2 and ILC3 function (i.e., IL-5 production by ILC2 and IL-22 production by ILC3) [154].

#### 9. JAKs can efficiently block neutrophils and eosinophils but not basophils.

Neutrophils are the first population of cells to infiltrate transplanted organs, and this infiltration occurs within 30 min after reperfusion [155]. These cells are recruited by cytokines (IL-1 $\beta$  and CXCL8 in humans) secreted by resident macrophages, and this recruitment combined with DAMPs induces the expression of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils that directly participate in graft damage [155]. In addition to direct damage, neutrophils also participate in T-cell stimulation: they migrate to lymph nodes and express MHC and costimulatory signals to present antigens to CD8 + or CD4 + T-cells [156]. In murine transplantation models, neutrophil depletion induces slower cellular rejection, showing the importance of these cells in promoting alloimmune T-cell responses [157]. Another study using a murine model of transplantation revealed the same role for neutrophils in acute antibody-mediated rejection with prolonged graft survival [158]. In chronic rejection, neutrophilia might be explained by the activation of IL-17-producing cells, which are known to be potent drivers of both neutrophil recruitment and activation. Tofacitinib and ruxolitinib reduce inflammation and the neutrophil percentage in rats and humans with neutrophilic asthma [159,160].

Eosinophils are one of the ADCC effector cells that also participate in plasma cell maintenance through cytokine secretion. In transplantation, eosinophils are recruited by IL-5 secreted from Th2 cells and are associated with graft fibrosis [161], and eosinophilia has been shown to be a poor prognosis factor [162]. However, murine models of

eosinophil-depleted heart transplantation show no reduction in DSA secretion [163]. Thus, these data suggest that eosinophils have a more important role in cellular rejection than in antibody-mediated rejection. The activation and survival of eosinophils are dependent on IL-5 and IFN $\gamma$ , which are JAK2-dependent cytokines that are efficiently inhibited by AG-490 or ruxolitinib in humans and mice with eosinophilic asthma [164,160].

An analysis of murine cardiac allografts revealed that basophils induce fibrosis in the allografts [165]. Fibrosis is associated with two features of basophils: histamine release and IL-4 secretion. Thus, the depletion of basophils induces a reduction in fibrotic organ remodeling [165,166], but a clinical trial of the pan-JAK1 tofacitinib did not show a dose-dependent basophil reduction after 12 weeks of psoriasis treatment [167].

#### 10. JAK1/STAT1 inhibition favors pro-regenerative M2 macrophages over inflammatory M1 macrophages.

Macrophages are tissue-infiltrating antigen-presenting cells derived from circulating monocytes whose main function is phagocytosis. Two different activation states have been described: M1 macrophages are induced by IFN $\gamma$ , LPS and TNF $\alpha$ , which show pro-inflammatory and cytotoxic activity, and M2 macrophage differentiation is induced by IL-4 and IL-13, which show anti-inflammatory activity. Previous studies have implicated macrophages in both acute and chronic rejection [168,169]. Other studies [170–173] have also shown the importance of M2 macrophages in graft regeneration after IRI in both mouse models and humans. In human macrophages, ruxolitinib inhibits 61.4% of LPS-induced genes, including IL-6 and TNF $\alpha$ , but not IL-12B, GM-CSF, CCL20, CXCL2 and IL-1 $\beta$ . This inhibition is not directly associated with LPS signaling, but IFN $\beta$  autocrine secretion most likely enhances the expression of LPS-induced genes [174]. The effects of JAKs on M2 macrophages have not been described, but suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)-mediated JAK1/STAT1 inhibition has been shown to favor the M2 phenotype [175].

#### 11. Ruxolitinib inhibits proinflammatory secretion from mast cells.

Mast cells are epithelium-resident effector cells that have been implicated in bacterial and parasitic infections and allergic reactions. Mast cell activation by IgE through Fc $\epsilon$ RI or PRR triggers their degranulation in association with a massive release of immune mediators, including histamine. Mast cell responses can be positively modulated by various inflammatory mediators, including hypoxia and cytokines (SCF, IL-3, IL-4, IL-9 and, to a lesser extent, IL-5, IL-6 and GM-CSF) [176]. Mast cells can in turn secrete various cytokines depending on the immunological environment, such as the levels of IL-1 $\beta$ , IL-3-6, IL-10 and IL-13, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , GM-CSF, FGF and TGF $\beta$ . Thus, through their secretory profile, mast cells participate in both inflammation and regulatory processes. Mast cells show increased activation in lung transplantation than in other solid organ transplantation due to the constant exposure of the lungs to airborne antigens. Several studies have noted a role for mast cells in IRI [177,178]. The treatment of human mast cell lines with ruxolitinib in the presence of substance P or codeine efficiently inhibits their degranulation and production of IL-6, TNF $\alpha$  and CCL2 in a dose-dependent manner [179]; however, the researchers did not assess the impact of ruxolitinib on the anti-inflammatory profile of mast cells.

#### 12. Conclusions

This review summarizes the role of immune cell populations in transplantation and their modulation by JAKs. The literature does not cover the impact of each specific JAK inhibition on all populations, and thus, even if JAKs form part of major signaling pathways in these cells,

it is nearly impossible to predict their role. Indeed, we have to consider the redundancy of the interactions among cytokine receptors, JAK and STAT combined with the massive interplay between all types of immune cells. JAKi-driven immunosuppression is a promising strategy for the treatment of conventional DMRAD-resistant diseases. Thus, the characterization of the immunosuppressive profiles induced by different types of JAKis is an essential step for obtaining a better understanding of the treatments and for proposing the most appropriate immunosuppressive strategies according to each pathology. To the best of our knowledge, although some families of JAK1 inhibitors have been described in the literature, there are no data on the effects of JAK1-specific inhibitors on immune cells [180,181]. JAK2 inhibition, alone or combined with the inhibition of JAK1 by ruxolitinib, mainly interacts with hematopoietic progenitors and myeloid cells (neutrophils, eosinophils, macrophages and mast cells) and mostly affects the Th1 subset and IFN pathways. JAK3 is the only tissue-specific JAK, but the effects of its inhibition are not limited to lymphoid cells. JAK3 inhibitors efficiently block helper T-cell activation through IL-2 and IL-4 and thus inhibit the subsequent production of cytokines, including IFN $\gamma$  and IL-5, required by myeloid cells. Tyk2 is a less-studied JAK whose action is more limited, particularly to IL-12/IL-23 and type I interferons.

As shown in B-cells, the activation of effector and tolerogenic regulatory cells might be induced through the same JAK/STAT pathways. Under these conditions, it is impossible to select a JAKi that will act on only one subset to favor graft tolerance. Reduced JAKi doses can reduce their impact on regulatory subsets by inducing only partial direct inhibition of B-regs. In effector subsets, reduced JAKi doses combine partial direct inhibition with the inhibition of upstream signaling such as Tfh and Tfr cells.

The ultimate goal in transplantation is to achieve graft tolerance in the most effective way possible, which involves the selection and inhibition of alloimmunity without interrupting the anti-pathogen defense responses. These two mechanisms are mediated by the same cells, and higher sensitivity is associated with reduced specificity to alloimmune responses. In this review, we highlight the implication of nearly all effector subsets in cellular or humoral graft rejection. The inhibition of JAK disrupts cell communication without affecting effector functions, which results in the strong recovery of the latent immune populations after drug elimination [182]. This lack of cell communication induces apoptosis in immune cells. JAKi-mediated apoptosis is inhibited in TLR-stimulated antigen-presenting cells [42], showing that the JAK/STAT pathways and JAKis play less important roles in TLR-mediated bacterial and antiviral responses than in cytokine-stimulated cell activation.

#### Authorship and conflict-of-interest statements

All authors participated in the writing of this review. This review was written in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Acknowledgment

This work was carried out with the support of CENTAURE foundation grant.

#### References

- [1] Philip F. Halloran, Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *New England J. Med.* 351 (December (26)) (2004) 2715–2729.
- [2] Dominic C. Borie, John J. O'Shea, Paul S. Changelian, JAK3 inhibition, a viable new modality of immunosuppression for solid organ transplants, *Trends Mol. Med.* 10 (November (11)) (2004) 532–541.
- [3] J. Dantal, E. Pohanka, Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need, *Nephrol. Dial. Transplant.* 22 (March (Supplement 1)) (2007) i4–i10.
- [4] Alejandro V. Villarino, Yuka Kanno, John J. O'Shea, Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system, *Nat. Immunol.* 18 (April (4)) (2017) 374–384.
- [5] Rhiannon Morris, Nadia J. Kershaw, Jeffrey J. Babon, The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway, *Protein Sci.* 27 (December (12)) (2018) 1984–2009.
- [6] Andrea C. Pfeiffer, Jens Timmer, UrsulaKlingmüller, Systems biology of JAK/STAT signalling, *Essays Biochem.* 45 (September) (2008) 109–120.
- [7] Emira Boussoik, Hamidreza Montazeri Aliabadi, "Do We Know Jack? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway, *Front. Oncol.* 8 (July) (2018).
- [8] Kamran Ghoreschi, Arian Laurence, John J. O'Shea, Janus kinases in immune cell signaling, *Immunol. Rev.* 228 (March (1)) (2009) 273–287.
- [9] Linda A. Winston, Tony Hunter, JAK2, Ras, and raf are required for activation of extracellular signal-regulated Kinase/Mitogen-activated protein kinase by growth hormone, *J. Biol. Chem.* 270 (December (52)) (1995) 30837–30840.
- [10] Didier Bouscary, Frederic Pene, Yann-Erick Claessens, Odile Muller, Stany Chre tien, Michaela Fontenay-Roupie, Sylvie Gisselbrecht, Patrick Mayeux, Catherine Lacombe, Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation, *Blood* 101 (May (9)) (2003) 3436–3443.
- [11] Robert Roskoski, Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes, *Pharmacol. Res.* 103 (January) (2016) 26–48.
- [12] Olli Silvennoinen, James N. Ihle, Joseph Schlessinger, David E. Levy, Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases, *Nature* 366 (December (6455)) (1993) 583–585.
- [13] P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem. J.* 334 (September (Pt 2)) (1998) 297–314.
- [14] James A. Johnston, Chris M. Bacon, M.C. Riedy, John J. O'Shea, Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency, *J. Leukoc. Biol.* 60 (October (4)) (1996) 441–452.
- [15] Ruud H.P. Wilbers, Debbie R. van Raaij, Lotte B. Westerhof, Jaap Bakker, Geert Smant, Arjen Schots, Re-evaluation of IL-10 signaling reveals novel insights on the contribution of the intracellular domain of the IL-10 $\alpha$  chain, *PLoS One* 12 (October (10)) (2017).
- [16] K. Igarashi, G. Garotta, L. Ozmen, A. Ziemiecki, A.F. Wilks, A.G. Harpur, A.C. Larner, D.S. Finbloom, Interferon- $\gamma$  induces tyrosine phosphorylation of interferon- $\gamma$  receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor, *J. Biol. Chem.* 269 (May (20)) (1994) 14333–14336.
- [17] Maria F. Brizzi, Maria G. Aronica, Arturo Rosso, Gian Paolo Bagnara, Yosef Yarden, Luigi Pegoraro, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93, STAT1 p91, and STAT3 p92 in Polymorphonuclear Leukocytes, *J. Biol. Chem.* 271 (February (7)) (1996) 3562–3567.
- [18] Bruce A. Witthuhn, Frederick W. Quelle, Olli Silvennoinen, Taolin Yi, Bo Tang, Osamu Miura, James N. Ihle, JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin, *Cell* 74 (July (2)) (1993) 227–236.
- [19] C.M. Bacon, D.W. McVicar, J.R. Ortaldo, R.C. Rees, J.J. O'Shea, J.A. Johnston, Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12, *J. Exp. Med.* 181 (January (1)) (1995) 399–404.
- [20] J.A. Johnston, M. Kawamura, R.A. Kirken, Y.Q. Chen, T.B. Blake, K. Shibuya, J.R. Ortaldo, D.W. McVicar, J.J. O'Shea, Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2, *Nature* 370 (July (6485)) (1994) 151–153.
- [21] N. Stahl, T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, Et. Al, Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science* 263 (January (5143)) (1994) 92–95.
- [22] C. Abramovich, L.M. Shulman, E. Ratovitski, S. Harroch, M. Tovey, P. Eid, M. Revel, Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , *EMBO J.* 13 (December (24)) (1994) 5871–5877.
- [23] Doreen M. Floss, TobiasKlo'cker, Jutta Schro'der, Larissa Lamertz, Simone Mrotzek, Birgit Strobl, Heike Hermanns, Jürgen Scheller, Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor b1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases, *Mol. Biol. Cell* 27 (July (14)) (2016) 2301–2316.
- [24] Various JAK inhibitor clinical trials (US), available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=jak+inhibitor&cntry=&state=clinicaltrials.gov, accessed 12.12.2018>.
- [25] Dafna Gladman, William Rigby, Valderilio F. Azevedo, Frank Behrens, Ricardo Blanco, Andrzej Kaszuba, Elizabeth Kudlac, Cunshan Wang, Sujatha Menon, Thijs Hendrikx, Keith S. Kanik, Tofacitinib for Psoriatic Arthritis in Patients With an Inadequate Response to TNF Inhibitors, <http://dx.doi.org/gate2.inist.fr/10.1056/NEJMoa1615977>, October (2017).
- [26] Mark C. Genovese, Joel Kremer, Omid Zamani, Charles Ludvico, Marek Krogulec, Li Xie, Scott D. Beattie, Alisa E. Koch, Tracy E. Cardillo, Terence P. Rooney, William L. Macias, Stephanie de Bono, Douglas E. Schlichting, Josef S. Smolen, Baricitinib in Patients With Refractory Rheumatoid Arthritis, (2016), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507247> March.
- [27] Kevin L. Winthrop, The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease, *Nat. Rev. Rheumatol.* 13 (April (4)) (2017) 234–243.
- [28] Evan Parganas, Demin Wang, Dimitrios Stravopodis, David J. Topham, Jean-Christophe Marine, Stephan Teglund, Elio F. Vanin, Sara Bodner, Oscar

- R. Colamonici, Jan Mvan Deursen, Gerard Grosveld, James N. Ihle, Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors, *Cell* 93 (May (3)) (1998) 385–395.
- [29] Paolo Marci, Anna Villa, Silvia Giliani, Maria G. Sacco, Annalisa Frattini, Fulvio Porta, Alberto G. Ugazio, James A. Johnston, Fabio Candotti, John J. O'Shea, Paolo Vezzoni, Luigi D. Notarangelo, Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID), *Nature* 377 (September (6544)) (1995) 65–68.
- [30] Scott J. Rodig, Marco A. Meraz, J. Michael White, Pat A. Lampe, Joan K. Riley, Cora D. Arthur, Kathleen L. King, Kathleen C.F. Sheehan, Yin Li, Diane Pennica, Eugene M. Johnson, Robert D. Schreiber, Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses, *Cell* 93 (May (3)) (1998) 373–383.
- [31] Sally Yu Shi, Wei Zhang, Cynthia T. Luk, Tharini Silvasubramaniam, Jara J. Brunt, Stephanie A. Schroer, Harsh R. Desai, Alexandra Majerski, Minna Woo, JAK2 promotes brown adipose tissue function and is required for diet- and cold-induced thermogenesis in mice, *Diabetologia* 59 (January (1)) (2016) 187–196.
- [32] Momoko Chikugo, Mayu Sebe, Rie Tsutsumi, Marina Iuchi, Jun Kishi, Masashi Kuroda, Nagakatsu Harada, Yasuhiko Nishioka, Hiroshi Sakae, Effect of Janus kinase inhibition by tofacitinib on body composition and glucose metabolism, *J. Med. Investig.* 65 (2018) 5.
- [33] Paolo Gallipoli, Amy Cook, Susan Rhodes, Lisa Hopcroft, Helen Wheadon, Anthony D. Whetton, Heather G. Jørgensen, Ravi Bhatia, Tessa L. Holyoake, JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo, *Blood* 124 (August (9)) (2014) 1492–1501.
- [34] Dimitra Zacharakis, Roshanak Ghazanfari, Hongzhe Li, Hooi Ching Lim, Stefan Schelding, Effects of JAK1/2 inhibition on bone marrow stromal cells of myeloproliferative neoplasm (MPN) patients and healthy individuals, *Eur. J. Haematol.* 101 (July (1)) (2018) 57–67.
- [35] Sara C. Meyer, Matthew D. Keller, Brittany A. Woods, Lindsay M. LaFave, Lennart Bastian, Maria Kleppe, Neha Bhagwat, Sachie Marubayashi, Ross L. Levine, Genetic studies reveal an unexpected negative regulatory role for Jak2 in thrombopoiesis, *Blood* 124 (October (14)) (2014) 2280–2284.
- [36] Charles A. Janeway Jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik, Charles A. Janeway Jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik, *Immunobiology*, 5th edition, Garland Science, 2001.
- [37] C. Munz, Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells, *Blood* 105 (January (1)) (2005) 266–273.
- [38] Aleksandra Kezic, Natasa Stajic, Friedrich Thais, Innate immune response in kidney ischemia/Reperfusion injury: potential target for therapy, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017).
- [39] Quan Zhuang, Quan Liu, Sherric J. Divito, Qiang Zeng, Karim M. Yatim, Andrew D. Hughes, Darling M. Rojas-Canales, A. Nakao, William J. Shufesky, Amanda L. Williams, Rishab Humar, Rosemary A. Hoffman, Warren D. Shlomchik, Martin H. Oberbarnscheidt, Fadi G. Lakkis, Adrian E. Morelli, Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection, *Nat. Commun.* 7 (August) (2016) 12623.
- [40] Yanfei Huang, Peter Johnston, Borui Zhang, Asif Zakari, Tayseer Chowdhry, Rachel Ruckdeschel Smith, Eduardo Marba n, Hamid Rabb, Karl L. Womer, Kidney-derived stromal cells modulate dendritic and T cell responses, *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (April (4)) (2009) 831–841.
- [41] Andreas H. Wagner, Michael Conzelmann, Franziska Fitzer, Thomas Giese, Karsten Gülow, Christine S. Falk, Oliver H. Krämer, Sascha Dietrich, Markus Hecker, Thomas Luft, JAK1/STAT3 activation directly inhibits IL-12 production in dendritic cells by preventing CDK9/P-TEFb recruitment to the p35 promoter, *Biochem. Pharmacol.* 96 (July (1)) (2015) 52–64.
- [42] Patrick P.C. Boor, Petra E. de Ruiter, Patrick S. Asmawidjaja, Erik Lubberts, Luc J.W. van der Laan, Jaap Kwekkeboom, JAK-inhibitor tofacitinib suppresses interferon alfa production by plasmacytoid dendritic cells and inhibits arthrogenic and antiviral effects of interferon alfa, *Transl. Res.* 188 (October) (2017) 67–79.
- [43] Dhifaf Sarhan, Marzia Palma, Yumeng Mao, Lars Adamson, Rolf Kiessling, Hakan Mellstedt, Anders Österborg, Andreas Lundqvist, Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotxin- $\alpha$ , IL-12, and TGF- $\beta$ , *Eur. J. Immunol.* 45 (June (6)) (2015) 1783–1793.
- [44] Nicolas Degaugue, Sophie Brouard, Jean-Paul Soullillou, Cross-reactivity of TCR repertoire: current concepts, challenges, and implication for allotransplantation, *Front. Immunol.* 7 (March) (2016).
- [45] C.A. Su, S. Iida, T. Abe, R.L. Fairchild, Endogenous memory CD8 T cells directly mediate cardiac allograft rejection: endogenous memory CD8 T cell allograft rejection, *Am. J. Transplant.* 14 (March (3)) (2014) 568–579.
- [46] Prerak M. Trivedi, Kate L. Graham, Nicholas A. Scott, Misty R. Jenkins, Suktilang Majaw, Robyn M. Sutherland, Stacey Fynch, Andrew M. Lew, Christopher J. Burns, Balasubramanian Krishnamurthy, Thomas C. Brodnicki, Stuart I. Mannering, Thomas W. Kay, Helen E. Thomas, Repurposed JAK1/JAK2 inhibitor reverses established autoimmune insulinitis in NOD mice, *Diabetes* 66 (June (6)) (2017) 1650–1660.
- [47] E. van Gurp, W. Weimar, R. Gaston, D. Brennan, R. Mendez, J. Pirsch, S. Swan, M.D. Percovitz, G. Ni, C. Wang, S. Krishnaswami, V. Chow, G. Chan, Phase 1 dose-escalation study of CP-690 550 in stable renal allograft recipients: preliminary findings of safety, tolerability, effects on lymphocyte subsets and pharmacokinetics, *Am. J. Transplant.* 8 (August (8)) (2008) 1711–1718.
- [48] Ramin Vafadari, Monique E. Quaedackers, Marcia M. Kho, Wendy M. Mol, Gary Chan, Willem Weimar, Carla C. Baan, Pharmacodynamic analysis of tofacitinib and basiliximab in kidney allograft recipients, *Transplantation* 94 (September (5)) (2012) 465.
- [49] Bing Sun, Yuan Zhang, Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses, *Adv. Exp. Med. Biol.* 841 (2014) 1–13.
- [50] Kamran Ghoreschi, Michael I. Jesson, Xiong Li, Jamie L. Lee, Sarbani Ghosh, Jason W. Alsup, James D. Warner, Masao Tanaka, Scott M. Steward-Tharp, Massimo Gadina, Craig J. Thomas, John C. Minnerly, Chad E. Storer, Timothy P. LaBranche, Zaher A. Radi, Martin E. Dowty, Richard D. Head, Debra M. Meyer, Nandini Kishore, John J. O'Shea, Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550), *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 186 (April (7)) (2011) 4234–4243.
- [51] H. Kishi, S. Inui, A. Muraguchi, T. Hirano, Y. Yamamura, T. Kishimoto, Induction of IgG secretion in a human B cell clone with recombinant IL 2, *J. Immunol.* 134 (May (5)) (1985) 3104–3107.
- [52] O. Boyman, A.G.A. Kolios, M.E. Raeber, Modulation of T Cell Responses by IL-2 and IL-2 Complexes, (2015), p. 4.
- [53] A. Senik, S. Stefanos, J.P. Kolb, M. Lucero, E. Falcoff, Enhancement of mouse natural killer cell activity by type II interferon, *Ann. Immunol. (Paris)* 131C (June (3)) (1980) 349–361.
- [54] Carl F. Nathan, Henry W. Murray, Michael E. Wiebe, Berish Y. Rubin, Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J. Exp. Med.* 158 (September (3)) (1983) 670–689.
- [55] Orr-El Weizman, Nicholas M. Adams, Iona Schuster, Chirag Krishna, Yuri Pritykin, Colleen Lau, Mariapia A. Degli-Esposti, Christina S. Leslie, Joseph C. Sun, Timothy E. O'Sullivan, ILC1 confer early host protection at initial sites of viral infection, *Cell* 171 (November (4)) (2017) 795–808 e12.
- [56] W. Jungrathimayr, L. Ji, L. Yang, W. Weder, S. Korom, M. Hersberger, Increased T-bet to GATA-3 ratio during acute allograft rejection in the rat lung, *Transplant. Proc.* 41 (December (10)) (2009) 4316–4320.
- [57] Xiao-Jing Zuo, Yuji Matsumura, John Prehn, Ryo Saito, Alberto Marchevsky, Jack Matloff, Stanley C. Jordan, Cytokine gene expression in rejecting and tolerant rat lung allograft models: analysis by RT-PCR, *Transp. Immunol.* 3 (June (2)) (1995) 151–161.
- [58] Zhongmin Liu, Huimin Fan, Shuiping Jiang, CD4+ T-cell subsets in transplantation, *Immunol. Rev.* 252 (1) (2013) 183–191.
- [59] Keisuke Maeshima, Kunihiko Yamaoka, Satoshi Kubo, Kazuhisa Nakano, Shigeru Iwata, Kazuyoshi Saito, Masanobu Ohishi, Hisaaki Miyahara, Shinya Tanaka, Koji Ishii, Hironobu Yoshimatsu, Yoshiya Tanaka, The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon-g and interleukin-17 production by human CD4+ T cells, *Arthritis Rheum.* 64 (6) (2012).
- [60] Smadar Gertel, Hussein Mahagna, Gidi Karmon, Abdulla Wad, Howard Amital, Tofacitinib attenuates arthritis manifestations and reduces the pathogenic CD4 T cells in adjuvant arthritis rats, *Clin. Immunol.* 184 (November) (2017) 77–81.
- [61] J.S. Fridman, P.A. Scherle, R. Collins, T.C. Burn, Y. Li, J. Li, M.B. Covington, B. Thomas, P. Collier, M.F. Favata, X. Wen, J. Shi, R. McGee, J.J. Haley, S. Shepard, J.D. Rodgers, S. Yeleswaram, G. Hollis, R.C. Newton, B. Metcalf, S.M. Friedman, K. Vaddi, Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050, *J. Immunol.* 184 (May (9)) (2010) 5298–5307.
- [62] Jean-Baptiste Telliez, Martin E. Dowty, Lu Wang, Jason Jussif, Tsung Lin, Li Li, Erick Moy, Paul Balbo, Wei Li, Yajuan Zhao, Kimberly Cosue, Caitlyn Dickinson, Peter Symanowicz, Martin Hegen, Mary Ellen Banker, Fabien Vincent, Ray Unwalla, Sidney Liang, Adam M. Gilbert, Matthew F. Brown, Matthew Hayward, Justin Montgomery, Xin Yang, Jonathan Bauman, John I. Trujillo, Agustín Casimiro-García, Felix F. Vajdos, Louis Leung, Kieran F. Geoghegan, Amira Quazi, Dejun Xuan, Lyn Jones, Erik Hett, Katherine Wright, James D. Clark, Atli Thorarensen, Discovery of a JAK3-Selective Inhibitor: Functional Differentiation of JAK3-Selective Inhibition over pan-JAK or JAK1-Selective Inhibition, *ACS Chem. Biol.* 11 (December (12)) (2016) 3442–3451.
- [63] Tobias Deuse, Jeffrey B. Velotta, Grant Hoyt, Johannes A. Govaert, Vanessa Taylor, Esteban Masuda, Ellen Herlaar, Gary Park, David Carroll, Marc P. Pelletier, Robert C. Robbins, Sonja Schrepfer, Novel immunosuppression: R348, a JAK3- and syk-inhibitor attenuates acute cardiac allograft rejection, *Transplantation* 85 (March (6)) (2008) 885–892.
- [64] Masato Kubo, Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation, *Immunol. Rev.* 278 (1) (2017) 162–172.
- [65] T. Kouro, Y. Kikuchi, H. Kanazawa, K. Hirokawa, N. Harada, M. Shiiba, H. Wakao, S. Takaki, K. Takatsu, Critical proline residues of the cytoplasmic domain of the IL-5 receptor alpha chain and its function in IL-5-mediated activation of JAK kinase and STAT5, *Int. Immunol.* 8 (February (2)) (1996) 237–245.
- [66] Yoshihiko Chiba, Kumiko Goto, Miwa Misawa, Interleukin-13-induced activation of signal transducer and activator of transcription 6 is mediated by an activation of Janus kinase 1 in cultured human bronchial smooth muscle cells, *Pharmacological reports: PR* 64 (2) (2012) 454–458.
- [67] Mario M. D'elios, Regis Josien, Marta Manghetti, Amedeo Amedei, Marco de Carli, Maria Cristina Cuturi, Gilles Blanco, Francoise Buzelin, Gianfranco Del Prete, Jean-Paul Soullillou, Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts, *Kidney Int.* 51 (June (6)) (1997) 1876–1884.
- [68] Arcangelo Nocera, Augusto Tagliamacco, Raffaele De Palma, Francesco Del Galdo, Andrea Ferrante, Iris Fontana, Sergio Barocci, Fabrizio Ginevri, Davide Rolla, Jean Louis Ravetti, Umberto Valente, Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts, *Clin. Transplant.* 18 (October (5)) (2004) 564–570.
- [69] Kamran Ghoreschi, Michael I. Jesson, Xiong Li, Jamie L. Lee, Sarbani Ghosh, Jason W. Alsup, James D. Warner, Masao Tanaka, Scott M. Steward-Tharp, Massimo Gadina, Craig Thomas, John C. Minnerly, Chad E. Storer, Timothy P. LaBranche, Zaher A. Radi, Martin E. Dowty, Richard D. Head, Debra M. Meyer,

- Nandini Kishore, John J. O'Shea, Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550), *J. Immune.* (Baltimore, Md.: 1950) 186 (April (7)) (2011) 4234–4243.
- [70] Claude Haan, Catherine Rolvering, Friedrich Raulf, Manuela Kapp, Peter Druckes, Gebhard Thoma, Iris Behrmann, Hans-Gunter Zerwes, Jak1 Has a Dominant Role over Jak3 in Signal Transduction through gc-Containing Cytokine Receptors, *Chem. Biol.* 18 (March (3)) (2011) 314–323.
- [71] Eli M. Eisenstein, Calvin B. Williams, The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity, *Pediatr. Res.* 65 (May (5 Part 2)) (2009).
- [72] O. Palomares, M. Marín-Fonoteca, R. Lauener, C. Traidl-Hoffmann, O. Cavkaytar, M. Akdis, C.A. Akdis, Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- $\beta$ , *Genes Immun.* 15 (December (8)) (2014) 511–520.
- [73] Shuang Fu, Nan Zhang, Adam C. Yopp, Dongmei Chen, Minwei Mao, Dan Chen, Haojiang Zhang, Yaozhong Ding, S. Jonathan, Bromberg, TGF- $\beta$  induces Foxp3 + T-Regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors, *Am. J. Transplant.* 4 (October (10)) (2004) 1614–1627.
- [74] Ashutosh Chaudhry, Dipayan Rudra, Piper Treuting, Robert M. Samstein, Yuqiong Liang, Arnold Kas, Alexander Y. Rudenski, CD4 + regulatory T cells control Th17 responses in a Stat3-dependent manner, *Science* 326 (November (5955)) (2009) 986–991.
- [75] Thomas C. Mangold, Mikhail A. Van Herck, Sara Nullens, Jose Ramet, Jozef J. De Dooy, Philippe G. Jorens, Benedicte Y. De Winter, The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection, *Pediatr. Res.* 78 (November (5)) (2015) 483–491.
- [76] Brian C. Betts, Omar Abdel-Wahab, Shane A. Curran, Erin T. St Angelo, Priya Koppikar, Glenn Heller, Ross L. Levine, James W. Young, Janus kinase-2 inhibition induces durable tolerance to alloantigen by human dendritic cell-stimulated T cells yet preserves immunity to recall antigen, *Blood* 118 (November (19)) (2011) 5330–5339.
- [77] Jin-Sil Park, Jennifer Lee, Mi-Ae Lim, Eun-Kyung Kim, Sung-Min Kim, Jun-Geol Ryu, Jae Ho Lee, Seung-Ki Kwok, Kyung-Su Park, Ho-Youn Kim, Sung-Hwan Park, Mi-La Cho, JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T cells and Th17 cells, *J. Immunol.* 192 (May (9)) (2014) 4417–4424.
- [78] Brian C. Betts, David Bastian, Hung Nguyen, Jessica Lauren Heinrichs, Wu Yongxia, Anandharaman Veerapathran, Marie C. Lee, Jack Singer, Claudio Anasetti, Yu Xu-Zhong, Targeting JAK2 by Gene Knockout or pacritinib treatment reduces ghd and xenograft rejection by promoting induced treg differentiation, *Blood* 126 (December (23)) (2015) 1874–1874.
- [79] Marina Cetkovic-Cvrjje, Marin Olson, Ketaki Ghate, Targeting Janus tyrosine kinase 3 (JAK3) with an inhibitor induces secretion of TGF- $\beta$  by CD4 + T cells, *Cell. Mol. Immunol.* 9 (July (4)) (2012) 350–360.
- [80] Kamran Ghoreishi, Arian Laurence, Xiang-Ping Yang, Cristina M. Tato, Mandy J. McGeachy, Joanne Konkel, Haydee L. Ramos, Lai Wei, Todd Davidson, Nicolas Bouladoux, John Grainger, Qian Chen, Yuka Kanno, Wendy T. Watford, Hong-Wei Sun, Gerard Eberl, Ethan Shevach, Yasmine Belkaid, Daniel J. Cua, Wanjun Chen, John J. O'Shea, Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signaling, *Nature* 467 (October (7318)) (2010) 967–971.
- [81] M. Laan, Z.H. Cui, H. Hoshino, J. Lötvall, M. Sjöstrand, D.C. Gruenert, B.E. Skoogh, A. Lindén, Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways, *J. Immun.* (Baltimore, Md.: 1950) 162 (February (4)) (1999) 2347–2352.
- [82] M. Ishizaki, R. Murotomoto, T. Akimoto, Y. Sekine, S. Kon, M. Diwan, H. Maeda, S. Togi, K. Shimoda, K. Oritani, T. Matsuda, Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation, *Int. Immunol.* 26 (May (5)) (2014) 257–267.
- [83] Thomas Duhon, Rebekka Geiger, David Jarrossay, Antonio Lanzavecchia, Federica Sallusto, Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells, *Nat. Immunol.* 10 (August (8)) (2009) 857–863.
- [84] Ting Wang, Zhiwei Zhang, Huaixin Xing, Li Wang, Guoxiang Zhang, Na Yu, Junzhi Wang, Wei Guo, Jie Jiang, Elevated Th22 cells and related cytokines in patients with epithelial ovarian cancer, *Medicine* 96 (October (43)) (2017).
- [85] P.J. McLaughlin, A. Aikawa, H.M. Davies, R.G. Ward, A. Bakran, R.A. Sells, P.M. Johnson, Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients, *Transplantation* 51 (June (6)) (1991) 1225–1229.
- [86] S. Heidenreich, D. Lang, M. Tepel, K.H. Rahn, Monocyte activation for enhanced tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 6 production during chronic renal allograft rejection, *Transpl. Immunol.* 2 (1) (1994) 35–40.
- [87] P. Kapessidou, L. Poulin, L. Dumoutier, M. Goldman, J.-C. Renauld, M.Y. Braun, Interleukin-22 deficiency accelerates the rejection of full major histocompatibility complex-disparate heart allografts, *Transplant. Proc.* 40 (June (5)) (2008) 1593–1597.
- [88] He Chang, Haruo Hanawa, Hui Liu, Tsuyoshi Yoshida, Manabu Hayashi, Ritsuo Watanabe, Satoru Abe, Ken Toba, Kaori Yoshida, Raafat Elnaggar, Shiro Minagawa, Yuji Okura, Kiminori Kato, Makoto Kodama, Hiroki Maruyama, Junichi Miyazaki, Yoshifusa Aizawa, Hydrodynamic-based delivery of an Interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats, *J. Immunol.* 177 (September (6)) (2006) 3635–3643.
- [89] I. Gomez, N. Foudi, D. Longrois, X. Norel, The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 89 (August (2–3)) (2013) 55–63.
- [90] Chao-Chao Qin, Yan-Ling Liu, Ying Hu, Ying Yang, Zhi Chen, Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury, *World J. Gastroenterol.* 23 (May (17)) (2017) 3043–3052.
- [91] Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini, Bassel E. Sawaya, Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1): an overview, *J. Interferon Cytokine Res.* 29 (June (6)) (2009) 313–326.
- [92] Futoshi Shibata, [The role of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC) in inflammation], *Yakugaku Zasshi, J. Pharma. Soc. Japan* 122 (April (4)) (2002) 263–268.
- [93] Randolph J. Noelle, Elizabeth C. Nowak, Cellular sources and immune functions of interleukin-9, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (October (10)) (2010) 683–687.
- [94] Kirsten A. Kortekaas, Dorotya K. de Vries, Marlies E.J. Reinders, Ellen Lievers, Jan Ringers, Jan H.N. Lindeman, Alexander F.M. Schaapherder, Interleukin-9 release from human kidney grafts and its potential protective role in renal ischemia/reperfusion injury, *Inflamm. Res.* 62 (January (1)) (2013) 53–59.
- [95] Gajendra M. Jigdand, Suchitra Mohanty, Satish Devadas, Regulators of tfh cell differentiation, *Front. Immunol.* 7 (November) (2016).
- [96] Nathalie Schmitt, Rimpel Morita, Laure Bourdery, Salah Eddine Bentebibel, Sandra M. Zurawski, Jacques Banchereau, Hideki Ueno, Human dendritic cells induce the differentiation of Interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through Interleukin-12, *Immunity* 31 (July (1)) (2009) 158–169.
- [97] Sau K. Lee, Diego G. Silva, Jaime L. Martin, Alvin Pratama, Xin Hu, Pheh-Ping Chang, Giles Walters, Carola G. Vinuesa, Interferon- $\gamma$  excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers, *Immunity* 37 (November (5)) (2012) 880–892.
- [98] Christopher D.C. Allen, K. Mark Ansel, Caroline Low, Robin Lesley, Hirokazu Tamamura, obutaka Fujii, Jason G. Cyster, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, *Nat. Immunol.* 5 (September (9)) (2004) 943–952.
- [99] Anne Kolenbrander, Bastian Grewe, David Nemazee, Klaus Überla, Vladimir Temchura, Generation of T follicular helper cells in vitro: requirement for B-cell receptor cross-linking and cognate B- and T-cell interaction, *Immunology* 153 (February (2)) (2018) 214–224.
- [100] Kitty de Leur, Frank J.M.F. Dor, Marjolein Dieterich, Luc J.W. van der Laan, Rudi W. Hendriks, Carla C. Baan, IL-21 receptor antagonist inhibits differentiation of B cells toward plasmablasts upon alloantigen stimulation, *Front. Immunol.* 8 (March) (2017).
- [101] T. Defrance, B. Vanbervliet, J. Pène, J. Banchereau, Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM, *J. Immunol.* 141 (September (6)) (1988) 2000–2005.
- [102] G. N. de Graaf, M. Dieterich, D.A. Hesselink, K. Boer, M.C. Clahsen-van Groningen, R. Kraaijeveld, N.H.R. Lijfers, R. Bouamar, J. Vanderlocht, M. Tilanus, I. Houba, A. Boonstra, D.L. Roelen, F.H.J. Claas, M.G.H. Beijes, W. Weimar, C.C. Baan, Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients, *Clin. Exp. Immunol.* 180 (May (2)) (2015) 329–340.
- [103] Thomas M. Conlon, Kourosh Saeb-Parsy, Jennifer L. Cole, Reza Motallebzadeh, M. Saeed Qureshi, Sylvia Rehakova, Margaret C. Negus, Chris J. Callaghan, Eleanor M. Bolton, J. Andrew Bradley, Gavin J. Pettigrew, Germinal centre alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells, *J. Immunol.* 188 (March (6)) (2012) 2643–2652.
- [104] J. Marino, J.T. Paster, A. Trowell, L. Maxwell, K.H. Briggs, P. Crosby Bertonin, G. Benichou, B cell depletion with an Anti-CD20 antibody enhances alloreactive memory T cell responses after transplantation, *Am. J. Transplant.* 16 (February (2)) (2016) 672–678.
- [105] Eugenia J. Kim, Jean Kwun, Adriana C. Gibby, Jung Joo Hong, Alton B. Farris, Neal N. Iwakoshi, Francois Villingier, Allan D. Kirk, Stuart J. Knechtle, Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection, *Am. J. Transplant.* 14 (January (1)) (2014) 59–69.
- [106] Brodie Miles, Elizabeth Connick, Control of the germinal center by follicular regulatory T cells during infection, *Front. Immunol.* 9 (November) (2018).
- [107] Cindy S. Ma, Danielle T. Avery, Anna Chan, Marcel Batten, Jacinta Bustamante, Stephanie Boisson-Dupuis, Peter D. Arkwright, Alexandra Y. Kreins, Diana Averbuch, Dan Engelhard, Klaus Magdorf, Sara S. Kilic, Yoshiyuki Minegishi, Shigeaki Nonoyama, Martyn A. French, Sharon Choo, Joanne M. Smart, Jane Peake, Melanie Wong, Paul Gray, Matthew C. Cook, David A. Fulcher, Jean-Laurent Casanova, Elissa K. Deenick, Stuart G. Tangye, Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells, *Blood* 119 (April (17)) (2012) 3997–4008.
- [108] Ling Li, Zuoxiao Li, Effects of tofacitinib on Tfr/Th balance and expression of CXCL13 and TGF- $\beta$ 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis rats, *Cns Neurol. Disord. - Drug Targets* (September) (2018).
- [109] J. Punnonen, G. Aversa, J.E. de Vries, Human pre-B cells differentiate into Ig-secreting plasma cells in the presence of interleukin-4 and activated CD4 + T cells or their membranes, *Blood* 82 (November (9)) (1993) 2781–2789.
- [110] Terry-Ann M. Milford, Ruijun J. Su, Olivia L. Francis, Ineavly Baez, Shannalee R. Martinez, Jacqueline S. Coats, Abby J. Weldon, Mileris N. Calderon, Michael C. Nwosu, Allen R. Botimer, Batul T. Suterwala, Xiao-Bing Zhang, Christopher L. Morris, David J. Weldon, Sinisa Dovati, Kimberly J. Payne, TSLP or IL-7 provide an IL-7 $\alpha$  signal that is critical for human B lymphopoiesis, *Eur. J. Immunol.* 46 (September (9)) (2016) 2155–2161.
- [111] I.K. McNiece, K.E. Langley, K.M. Zsebo, The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7, *J. Immun.* (Baltimore, Md.: 1950) 146 (June (11)) (1991) 3785–3790.
- [112] Sheryl M. Gough, Liat Goldberg, Marbin Pineda, Robert L. Walker, Yuelin J. Zhu, Sven Bilke, Yang Jo Chung, Joseph Dufrain, Subhadip Kundu, Elad Jacoby, Terry J. Fry, Susanna Fischer, Renate Panzer-Grimmer, Paul S. Meltzer, Peter D. Aplan, Progenitor B-1 B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with collaborative mutations in 3 critical pathways, *Blood Adv.* 1 (September (20)) (2017) 1749–1759.
- [113] Ekkehard Mössner, Peter Brünker, Samuel Moser, Ursula Püntener, Carla Schmidt,

- Sylvia Herter, Roger Grau, Christian Gerdes, Adam Nopora, Erwin van Puijlenbroek, Claudia Ferrara, Peter Sondermann, Christiane Jäger, Pamela Strein, Georg Fertig, Thomas Friess, Christine Schüll, Sabine Bauer, Joseph Dal Porto, Christopher Del Nagro, Karim Dabbagh, Martin J.S. Dyer, Sibrand Poppema, Christian Klein, Pablo Umana, Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity, *Blood* 115 (June (22)) (2010) 4393–4402.
- [114] Tucker W. LeBien, F. Thomas, Tedder. B lymphocytes: how they develop and function, *Blood* 112 (September (5)) (2008) 1570–1580.
- [115] Vaclav Seda, Marek Mraz, B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells, *Eur. J. Haematol.* 94 (March (3)) (2015) 193–205.
- [116] Kathryn E. Gunn, Joseph W. Brewer, Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity, *J. Immunol.* 177 (September (6)) (2006) 3791–3798.
- [117] Thierry Defrance, Morgan Taillardet, Laurent Genestier, T cell-independent B cell memory, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (June (3)) (2011) 330–336.
- [118] Stephen L. Nutt, Philip D. Hodgkin, David M. Tarlinton, Lynn M. Corcoran, The generation of antibody-secreting plasma cells, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (March (3)) (2015) 160–171.
- [119] Alice Koenig, Christophe Mariat, Christiane Mousson, Kathryn J. Wood, Gérard Rife, Olivier Thauan, B cells and antibodies in transplantation, *Transplantation* 100 (July (7)) (2016) 1460.
- [120] Olivier Aubert, Alexandre Loupy, Luis Hidalgo, Jean-Paul Duongvan Huyen, Sarah Higgins, Denis Viglietti, Xavier Jouven, Denis Glotz, Christophe Legendre, Carmen Lefaucheur, Philip F. Halloran, Antibody-mediated rejection due to pre-existing versus de novo donor-specific antibodies in kidney allograft recipients, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (June (6)) (2017) 1912–1923.
- [121] Jean Kwun, Miriam Manook, Eugenia Page, Christopher Burghuber, Jungioo Hong, Stuart J. Knechtle, Cross-talk between T and B cells in the Germinal Center following transplantation, *Transplantation* 101 (April (4)) (2017) 704–712.
- [122] Yang Zhang, Laura Garcia-Ibanez, Kai-Michael Toellner, Regulation of germinal center B-cell differentiation, *Immunol. Rev.* 270 (March (1)) (2016) 8–19.
- [123] Maria Carmen Ochoa, Luna Minute, Inmaculada Rodriguez, Saray Garasa, Elisabeth Perez-Ruiz, Susana Inogé's, Ignacio Melero, Pedro Berraondo, Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells, *Immunol. Cell Biol.* 95 (4) (2017) 347–355.
- [124] C. Wehmeier, G. Hönger, H. Cun, P. Amico, P. Hirt-Minkowski, A. Georgalis, H. Hoffer, M. Dickemmann, J. Steiger, S. Schaub, Donor specificity but not broadness of sensitization is associated with antibody-mediated rejection and graft loss in renal allograft recipients, *Am. J. Transplant.* 17 (8) (2017) 2092–2102.
- [125] Gislaine Martins, Kathryn Calame, Regulation and functions of Blimp-1 in t and B lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (April (1)) (2008) 133–169.
- [126] B. Belinda Ding, Enguang Bi, Hongshan Chen, J. Jessica Yu, B. Hilda Ye, IL-21 and CD401 synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells, *J. Immunol.* 190 (February (4)) (2013) 1827–1836.
- [127] Elissa K. Deenick, Danielle T. Avery, Anna Chan, Lucinda J. Berglund, Megan L. Ives, Leen Moens, Jennifer L. Stoddard, Jacinta Bustamante, Stephanie Boisson-Dupuis, Miyuki Tsumura, Masao Kobayashi, Peter D. Arkwright, Diana Averbuch, Dan Engelhard, Joachim Roesler, Jane Peake, Melanie Wong, Stephen Adelstein, Sharon Choo, Joanne M. Smart, Martyn A. French, David A. Fulcher, Matthew C. Cook, Capucine Picard, Anne Durandy, Christoph Klein, Steven M. Holland, Gulbu Uzel, Jean-Laurent Casanova, Cindy S. Ma, Stuart G. Tangye, Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells, *J. Exp. Med.* 210 (November (12)) (2013) 2739–2753.
- [128] Satoshi Kubo, Shingo Nakayama, Kei Sakata, Yukihiro Kitanaga, Xiaoxue Ma, Seunghyun Lee, Akina Ishii, Kaoru Yamagata, Kazuhisa Nakano, Yoshiya Tanaka, Janus kinase inhibitor baricitinib modulates human innate and adaptive immune system, *Front. Immunol.* 9 (June) (2018).
- [129] Marta Rizzi, Raquel Lorenzetti, Kathleen Fischer, Julian Staniek, Iga Janowska, Arianna Troilo, Valentina Strohmeier, Mirjam Erlacher, Mirjam Kunze, Bettina Bannert, Diego Kyburz, Reinhard E. Voll, Nils Venhoff, Jens Thiel, Impact of tofacitinib treatment on human B-cells in vitro and in vivo, *J. Autoimmun.* 77 (February) (2017) 55–66.
- [130] Janet Stavnezer, Jeroen E.J. Guikema, Carol E. Schrader, Mechanism and regulation of class switch recombination, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 261–292.
- [131] Thomas F. Tedder, B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset, *J. Immunol.* 194 (February (4)) (2015) 1395–1401.
- [132] Mélanie Chesneau, Laure Michel, Emilie Dugast, Alexis Chenouard, Daniel Baron, Annaëck Pallier, Justine Durand, Faouzi Braza, Pierrick Guerif, David-Axel Laplaud, Jean-Paul Souillou, Magali Giral, Nicolas Degauque, Elise Chiffolleau, Sophie Brouard, Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (October (10)) (2015) 2588–2598.
- [133] Simon Fillatreau, Claire H. Sweenie, Mandy J. McGeachy, David Gray, Stephen M. Anderson, B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10, *Nat. Immunol.* 3 (October (10)) (2002) 944–950.
- [134] Avijit Ray, Luman Wang, Bonnie N. Dittel, IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action, *Int. Immunol.* 27 (October (10)) (2015) 531–536.
- [135] Xi Zhou, Yu-Xiong Su, Xiao-Mei Lao, Yu-Jie Liang, Gui-Qing Liao, CD19(+)/IL-10(+)/regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+)/Foxp3(+) regulatory T cells, *Oral Oncol.* 53 (February) (2016) 27–35.
- [136] Carole Brosseau, Maxim Durand, Luc Colas, Eugénie Durand, Aurore Foureau, Marie-Aude Cheminant, Gregory Bouchaud, Laure Castan, Martin Klein, Antoine Magnan, Sophie Brouard, CD9+ regulatory B cells induce t cell apoptosis via IL-10 and are reduced in severe asthmatic patients, *Front. Immunol.* 9 (2018).
- [137] Ren-Xi Wang, Cheng-Rong Yu, Ivy M. Dambuzza, Rashid M. Mahdi, Monika Dolinska, Yuri V. Sergeev, Paul T. Wingfield, Sung-Hye Kim, Charles E. Egwuagu, Interleukin-35 Induces regulatory B cells that suppress CNS autoimmune disease, *Nat. Med.* 20 (June (6)) (2014) 633–641.
- [138] Kang Mi Lee, Ryan T. Stott, Gaoping Zhao, Julie SooHoo, Wei Xiong, Moh Moh Lian, Lindsey Fitzgerald, Shuai Shi, Elsie Akrawi, Lei Ji, Shaoping Deng, Heidi Yeh, James F. Markmann, James I. Kim, TGF- $\beta$ -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance: immunomodulation, *Eur. J. Immunol.* 44 (June (6)) (2014) 1728–1736.
- [139] Kenneth A. Newell, Adam Asare, Allan D. Kirk, Trang D. Gisler, Kasia Bourcier, Manikkam Suthanthiran, William J. Burlingham, William H. Marks, Ignacio Sanz, Robert I. Lechler, Maria P. Hernandez-Fuentes, Laurence A. Turka, Vicki L. Seyfert-Margolis, Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans, *J. Clin. Invest.* 120 (June (6)) (2010) 1836–1847.
- [140] M. Chesneau, A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S. Le Gallou, D. Baron, M. Giral, R. Danger, P. Guerif, H. Aubert- Wastiaux, A. Ne'el, L. Michel, D.-A. Laplaud, N. Degauque, J.-P. Souillou, K. Tarte, S. Brouard, Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients, *Am. J. Transplant.* 14 (January (1)) (2014) 144–155.
- [141] Claudia Mauri, David Gray, Naseem Mushtaq, Marco Lonardi, Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells, *J. Exp. Med.* 197 (February (4)) (2003) 489–501.
- [142] Paul A. Blair, Lina Yassin Noreni, Fabian Flores-Borja, David J. Rawlings, David A. Isenberg, Michael R. Ehrenstein, Claudia Mauri, CD19+ CD24hi CD38hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients, *Immunity* 32 (January (1)) (2010) 129–140.
- [143] Hyuk Soon Kim, Jun Ho Lee, Hee Dong Han, A.-Ram Kim, Seung Taek Nam, Hyun Woo Kim, Young Hwan Park, Dajeong Lee, Min Bum Lee, Yeong Min Park, Hyung Sik Kim, Young Mi Kim, Chang You Ji, Wahn Soo Choi, Autocrine stimulation of IL-10 is critical to the enrichment of IL-10-producing CD40hi CD5+ regulatory B cells in vitro and in vivo, *BMB Rep.* 48 (January (1)) (2015) 54–59.
- [144] Marina Karaghiosoff, Hans Neubauer, Caroline Lassnig, Pavel Kovarik, Heike Schindler, Hanspeter Pircher, Barbara McCoy, Christian Bogdan, Thomas Decker, Gottfried Brem, Klaus Pfeffer, Mathias Müller, Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-Deficient mice, *Immunity* 13 (October (4)) (2000) 549–560.
- [145] Elisa Montaldo, Paola Vacca, Chiara Vitale, Francesca Moretta, Franco Locatelli, Maria Cristina Mingari, Lorenzo Moretta, Human innate lymphoid cells, *Immunol. Lett.* 179 (November) (2016) 2–8.
- [146] Elisa Montaldo, Genny Del Zotto, Mariella Della Chiesa, Maria Cristina Mingari, Alessandro Moretta, Andrea De Maria, Lorenzo Moretta, Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function, *Cytom. Part A* 83A (8) (2013) 702–713.
- [147] Obinna Chijioke, Christian Munz, Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation, *Front. Immunol.* 4 (November) (2013).
- [148] Asa Lindgren, Vojta Pavlovic, Carl-Fredrik Flach, Asa Sjöling, Samuel Lundin, Interferon-gamma secretion is induced in IL-12 stimulated human NK cells by recognition of Helicobacter pylori or TLR2 ligands, *Innate Immun.* 17 (April (2)) (2011) 191–203.
- [149] Diane Cosner, Michelle Rooney, Dilip Samarungavan, Wei Li, Steven Cohn, Vijay Mudunuri, Gampala Reddy, Leslie Rocher, Francis Dumler, Alan Koffron, Ping Zhang, Natural killer cells are involved in both acute antibody mediated rejection and acute cellular rejection, *Am. J. Clin. Pathol.* 142 (October (suppl 1)) (2014) A220–A220.
- [150] B. Dreßke, X. Zhu, C. Herwartz, K. Brötzmann, F. Fändrich, The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute graft rejection after allogeneic heart transplantation in the rat, *Transplant. Proc.* 29 (May (3)) (1997) 1715–1716.
- [151] Ning Gao, Tam Dang, Dorothy Yuan, IFN- $\gamma$ -Dependent and -Independent initiation of switch recombination by NK cells, *J. Immunol.* 167 (August (4)) (2001) 2011–2018.
- [152] Thomas Resch, Cornelia Fabritius, Susanne Ebner, Paul Ritschl, Katja Kotsch, The role of natural killer cells in humoral rejection, *Transplantation* 99 (July (7)) (2015) 1335–1340.
- [153] Evelien A.F.J. van Gorp, Wenda Schoordijk-Verschoor, Mariska Klepper, Sander S. Korevaar, Gary Chan, Willem Weimar, Carla C. Baan, The effect of the JAK inhibitor CP-690,550 on peripheral immune parameters in stable kidney allograft patients, *Transplantation* 87 (January (1)) (2009) 79–86.
- [154] M.L. Robinette, M. Cella, J.B. Telliez, T.K. Ulland, A.D. Barrow, K. Capuder, S. Gilfillan, L.-L. Lin, L.D. Notarangelo, M. Colonna, Jak3 deficiency blocks innate lymphoid cell development, *Mucosal Immunol.* 11 (January (1)) (2018) 50–60.
- [155] B. McDonald, K. Pittman, G.B. Menezes, S.A. Hirota, I. Slaba, C.C.M. Waterhouse, P.L. Beck, D.A. Muruve, P. Kubes, Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation, *Science* 330 (October (6002)) (2010) 362–366.
- [156] Taku Kambayashi, Terri M. Lauffer, Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* 14 (November (11)) (2014) 719–730.
- [157] Nick D. Jones, Matthew O. Brook, Manuela Carvalhal-Gaspar, Shiqiao Luo, Kathryn J. Wood, Regulatory T cells can prevent memory CD8+ T-cell-mediated rejection following polymorphonuclear cell depletion, *Eur. J. Immunol.* 40 (November (11))

- (2010) 3107–3116.
- [158] M.J. Bogman, I.M. Cornelissen, R.A. Koene, Absence of requirement for polymorphonuclear granulocytes in the acute antibody-mediated rejection of murine skin allografts, *Transplantation* 37 (April (4)) (1984) 402–405.
- [159] Elena Calama, Isabel Ramis, Anna Domech, Cristina Carreno, Jorge De Alba, Neus Prats, Montserrat Miralpeix, Tofacitinib ameliorates inflammation in a rat model of airway neutrophilia induced by inhaled LPS, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 43 (April) (2017) 60–67.
- [160] R.-F. Li, G.-F. Wang, JAK/STAT5 Signaling Pathway Inhibitor Ruxolitinib Reduces Airway Inflammation of Neutrophilic Asthma in Mice Model, *European Review*, February (2018).
- [161] Alain Le Moine, Véronique Flamand, François-Xavier Demoor, Jean-Christophe Noé, Murielle Surquin, Robert Kiss, Marie-Anne Nahori, Marina Pretolani, Michel Goldman, Daniel Abramowicz, Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection, *J. Clin. Invest.* 103 (June (12)) (1999) 1659–1667.
- [162] Wang Hongwei, Ranjit S. Nanna, Anne Stein, Leanne Avis, Anna Price, Adrian D. Hibberd, Eosinophils in acute renal allograft rejection, *Transpl. Immunol.* 2 (March (1)) (1994) 41–46.
- [163] P. Cravedi, D.A. Lessman, P.S. Heeger, Eosinophils are not required for the induction and maintenance of an alloantibody response: eosinophils in the alloantibody response, *Am. J. Transplant.* 13 (October (10)) (2013) 2696–2702.
- [164] K. Ochiai, E. Tanabe, C. Ishihara, M. Kagami, T. Sugiyama, M. Sueishi, N. Koya, H. Tomioka, Role of JAK2 signal transductional pathway in activation and survival of human peripheral eosinophils by interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), *Clin. Exp. Immunol.* 118 (December (3)) (1999) 340–343.
- [165] G. Schiechl, F.J. Hermann, M. Rodriguez Gomez, S. Kutzi, K. Schmidbauer, Y. Talke, S. Neumayer, N. Goebel, K. Renner, H. Brühl, H. Karasuyama, K. Obata-Ninomiya, K. Utpatel, M. Evert, S.W. Hirt, E.K. Geissler, S. Fichtner-Feigl, M. Mack, Basophils trigger fibroblast activation in cardiac allograft fibrosis development, *Am. J. Transplant.* 16 (September (9)) (2016) 2574–2588.
- [166] W. Schonfeld, A. Saak, G. Steinkamp, Histamine release from basophils in cystic fibrosis, *Clin. Exp. Immunol.* 76 (1989) 434–439.
- [167] B. Strober, M. Buonanno, J.D. Clark, T. Kawabata, H. Tan, R. Wolk, H. Valdez, R.G. Langley, J. Harness, A. Menter, K. Papp, Effect of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, on haematological parameters during 12 weeks of psoriasis treatment, *Br. J. Dermatol.* 169 (November (5)) (2013) 992–999.
- [168] D.K. Nayak, F. Zhou, M. Xu, J. Huang, M. Tsuji, R. Hachem, T. Mohanakumar, Long-term persistence of donor alveolar macrophages in human lung transplant recipients that influences donor-specific immune responses, *Am. J. Transplant.* 16 (August (8)) (2016) 2300–2311.
- [169] Ajda Tahereh Rowshani, Elly Johanna Francisca Vereyken, The role of macrophage lineage cells in kidney graft rejection and survival, *Transplantation* 94 (August (4)) (2012) 309.
- [170] E. Vinuesa, G. Hotter, M. Jung, I. Herrero-Fresneda, J. Torras, A. Sola, Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury, *J. Pathol.* 214 (January (1)) (2008) 104–113.
- [171] Y. Wang, Y.P. Wang, G. Zheng, V.W.S. Lee, L. Ouyang, D.H.H. Chang, D. Mahajan, J. Coombs, Y.M. Wang, S.I. Alexander, D.C.H. Harris, Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease, *Kidney Int.* 72 (August (3)) (2007) 290–299.
- [172] James A. Hutchinson, Paloma Riquelme, Beate G. Brem-Exner, Maren Schulze, Martina Matthi, Lutz Renders, Ulrich Kunzendorf, Edward K. Geissler, Fred Fndrich, Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation, *Transpl. Int.* 21 (August (8)) (2008) 728–741.
- [173] J.A. Hutchinson, P. Riquelme, B. Sawitzki, S. Tomiuk, P. Miqueu, M. Zuhayra, H.H. Oberg, A. Pascher, U. Lutzen, U. Janssen, C. Broichhausen, L. Renders, F. Thaiss, E. Scheuermann, E. Henze, H.-D. Volk, L. Chatenoud, R.I. Lechler, K.J. Wood, D. Kabelitz, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, F. Fandrich, Cutting edge: immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients, *J. Immunol.* 187 (September (5)) (2011) 2072–2078.
- [174] Marie Febvre-James, Valérie Lecreur, Yu Augagneur, Abdullah Mayati, Olivier Fardel, Repression of interferon b-regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophages, *Int. Immunopharmacol.* 54 (January) (2018) 354–365.
- [175] Yan-Bing Liang, Hao Tang, Zhi-Bin Chen, Li-Jin Zeng, Jing-Guo Wu, Wen Yang, Zhen-Yu Li, Ma. Zhong-Fu, Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type, *Mol. Med. Rep.* 16 (November (5)) (2017) 6405–6411.
- [176] Yingxin Yu, Bart R. Blokhuis, Johan Garssen, Frank A. Redegeld, Non-IgE mediated mast cell activation, *Eur. J. Pharmacol.* 778 (May) (2016) 33–43.
- [177] Christopher J. Wingard, Dianne M. Walters, Brook L. Cathey, Susana C. Hilderbrand, Pranita Katwa, Sijie Lin, Pu Chun Ke, Ramakrishna Podila, Apparao Rao, Robert M. Lust, Jared M. Brown, Mast cells contribute to altered vascular reactivity and ischemia-reperfusion injury following cerium oxide nanoparticle instillation, *Nanotoxicology* 5 (December (4)) (2011) 531–545.
- [178] M. Su, E.Y. Chi, M.J. Bishop, W.R. Henderson, Lung mast cells increase in number and degranulate during pulmonary artery occlusion/reperfusion injury in dogs, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (February (2)) (1993) 448–456.
- [179] Maud A.W. Hermans, Benjamin Schrijver, Conny C.P.A. van Holten-Neelen, Roy Gerthvan Wijk, P. Martin van Hagen, Paul L.Avan Daele, Willem A. Dik, The JAK1/JAK2-inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release, *Clin. Exp. Allergy* 48 (November (11)) (2018).
- [180] Janusz J. Kulagowski, Wade Blair, Richard J. Bull, Christine Chang, Gauri Deshmukh, Hazel J. Dyke, Charles Eigenbrot, Nico Ghilardi, Paul Gibbons, Trevor K. Harrison, Peter R. Hewitt, Marya Liimatta, Christopher A. Hurley, Adam Johnson, Tony Johnson, Jane R. Kenny, Pawan Bir Kohli, Robert J. Maxey, Rohan Mendonca, Kyle Mortara, Jeremy Murray, Raman Narukulla, Steven Shia, Micah Steffek, Savita Ubhayakar, Mark Ultsch, Annevan Abbema, Stuart I. Ward, Bohdan Waszkowycz, Mark Zak, Identification of imidazo-pyrrolopyridines as novel and potent JAK1 inhibitors, *J. Med. Chem.* 55 (June (12)) (2012) 5901–5921.
- [181] Mi Kyoung Kim, Heerim Shin, Kwang-su Park, Hyungmi Kim, Jiseon Park, Kangeon Kim, Joonwoo Nam, Hyunah Choo, Youhoon Chong, Benzimidazole derivatives as potent JAK1-Selective inhibitors, *J. Med. Chem.* 58 (September (18)) (2015) 7596–7602.
- [182] Kent J. Weinhold, Jack F. Bukowski, Todd V. Brennan, Robert J. Noveck, Janet S. Staats, Liwen Lin, Linda Stempora, Constance Hammond, Ann Wouters, Christopher F. Mojcik, John Cheng, Mark Collinge, Michael I. Jesson, Anasuya Hazra, Pinaki Biswas, Shuping Lan, James D. Clark, Jennifer A. Hodge, Reversibility of peripheral blood leukocyte phenotypic and functional changes after exposure to and withdrawal from tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in healthy volunteers, *Clin. Immunol.* 191 (June) (2018) 10–20.



## Extracellular Vesicles in Transplantation

Nicolas Sailliet<sup>1</sup>, Matti Ullah<sup>2</sup>, Amandine Dupuy<sup>1</sup>, Amanda K. A. Silva<sup>2</sup>, Florence Gazeau<sup>2</sup>, Hoa Le Mai<sup>1</sup> and Sophie Brouard<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Nantes Université, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, Nantes, France, <sup>2</sup> MSC-med, INSERM U7057, Université de Paris, Paris, France, <sup>3</sup> Labex IGO, Nantes, France

Extracellular vesicles (EVs) have been extensively studied in the last two decades. It is now well documented that they can actively participate in the activation or regulation of immune system functions through different mechanisms, the most studied of which include protein–protein interactions and miRNA transfers. The functional diversity of EV-secreting cells makes EVs potential targets for immunotherapies through immune cell-derived EV functions. They are also a potential source of biomarkers of graft rejection through donor cells or graft environment-derived EV content modification. This review focuses on preclinical studies that describe the role of EVs from different cell types in immune suppression and graft tolerance and on the search for biomarkers of rejection.

**Keywords:** extracellular vesicles, biomarkers, transplantation, immunomodulation, immunology

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Gilles Benichou,  
Harvard Medical School, United States

#### Reviewed by:

Veronika Lukacs-Kornek,  
University of Bonn, Germany  
Philippe Saas,  
INSERM U1098 Interactions Hôte-  
Greffon-Tumeur & Ingénierie Cellulaire  
et Génique, France

#### \*Correspondence:

Sophie Brouard  
sophie.brouard@univ-nantes.fr

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Alloimmunity and Transplantation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 22 October 2021

**Accepted:** 11 January 2022

**Published:** 03 February 2022

#### Citation:

Sailliet N, Ullah M, Dupuy A,  
Silva AKA, Gazeau F, Le Mai H  
and Brouard S (2022) Extracellular  
Vesicles in Transplantation.  
Front. Immunol. 13:800018.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.800018

### INTRODUCTION

Communication among cells is an essential event in all living organisms that is achieved through several mechanisms, among which secretion of soluble elements is an important factor. For the past two decades, a new method of intercellular communication has been unleashed through secretion of membrane-bound, nanosized particles known as extracellular vesicles (EVs). Briefly, EVs are lipid bilayer vesicles with a size range of 50–2,000 nm in diameter that are released by cells into the extracellular spaces and are recognized as a new method of intracellular communication with a range of signaling (1, 2). They are considered cargo delivery vesicles because they harbor nucleic acids, proteins, lipids and metabolites that reflect their cellular origin. EVs are released in extracellular spaces during physiological and pathological conditions by several types of cells (3, 4). EVs are found in almost every fluid of the body from synovial fluids and breast milk to saliva, plasma and urine (2) and play fundamental roles in regulating normal physiological processes and in the progression of disease and reflect the state of parent cells at the time of release (5).

The term “extracellular vesicle” was first used in the literature in 1971 by a study that involved electron microscopic analysis of the freshwater alga ‘*Ochromonas danica*’ (6). Stahl and Johnstone independently investigated and provided insights into the mechanisms involved in the secretion of EVs from reticulocytes (7, 8). At that time, several names were used to mention EVs, such as



shedding vesicles, membrane fragments, plasma membrane vesicles, microvesicles and exosomes. One of the breakthroughs for EVs was in 1996, when Graca Raposo et al. reported the participation of EVs in immune responses by their role in activating the adaptive immune response (9).

## THE DIFFERENT TYPES OF EVs

Extracellular vesicles can be classified on the basis of their biogenesis, origin, biological function or cargo (10). However, the most acceptable classification for EVs is based on their genesis. Generally, they are three classes of EVs known as exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. The common term ectosomes can be used for MVs and apoptotic bodies, as both are shed through blubbing of the cellular membrane (11). In all three subtypes of EVs, there is a lipid bilayer membrane that surrounds their content, e.g., proteins, RNA, or cellular debris. Their genesis involves different mechanisms and has different sizes and buoyant densities (12). Apoptotic bodies are generally the largest in; however, their size ranges from 50 nm to 5000 nm, and their density ranges from 1.16–1.28. As indicated by their name, these vesicles are released by apoptotic cells containing some apoptotic bodies. However, in contrast to what their name suggests, they are not simple debris of apoptotic cells; these EVs have important roles in immune regulation and activate pathways to aid in phagocytosis and removal of dead cells (13).

The other two types of EVs, exosomes and microvesicles, are regularly secreted by cells to maintain intercellular communication. They are quite similar in properties and are very difficult to separate. The two have been characterized based on their size, morphology, and lipid bilayer composition (14). One of the major differences between the two is the way they are produced. Exosomes are formed through the endolysosomal pathway following invagination of endosomal membranes to form multivesicular bodies and are released after fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane (15). Microvesicles are formed by outward budding of the membrane; they are larger in size ranging from 100 nm to 1000 nm, while exosomes are smaller in size ranging from 50 nm to 150 nm and have a buoyant density from 1.10 to 1.14 gram/ml. As exosomes are formed inside the cellular membrane, they are more enriched in phosphatidylserine, whereas the composition of microvesicles is closer to that of the parent cell (14). The general composition of both EVs is same, i.e., each contain cytoplasmic proteins, lipids, mRNA, miRNA and receptors. Some criteria identified in the Minimal information for studies of extracellular vesicles MISEV 2018 attempt to better discriminate exosome-specific features. However, considering the difficulties in determining the precise classification, the terminology extracellular vesicles is recommended as a more appropriate designation.

In addition to the abovementioned classification, EVs can be classified to reflect their tissue origin. Prostatosomes are EVs that originate from the prostate, while epididymosomes are vesicles secreted by epididymal epithelial cells. However, these terms

include all the EVs that have the same origin irrelevant to the type of EVs present or the way they are produced. Hence, there is confusion in identifying the true nature of EVs. Other examples of such classification include cardiosomes (heart), dexosomes (dendritic cells), oncosomes/texosomes (tumor cells) and others (16).

## THE CARGO COMPONENTS AND FUNCTIONS OF EVs

EVs are membrane-bound vesicles that reflect the composition of the cells from which they are derived. Hence, depending on the origin, EVs contain different types of proteins, mRNAs, miRNAs, DNA and lipids (including cholesterol and receptors, cytokines and low molecular weight metabolites, e.g., glutathione, amino acids and ATP).

As found in most of the fluids in the body, EVs are associated with regular physiological processes, especially those that involve communication between cells (17) such as stem cell pluripotency (18), angiogenesis (19–21), coagulation (22, 23) and either immune activation or attenuation (14, 24, 25). EVs also impact various pathological conditions, among which the most documented is cancer formation through angiogenesis or cell-cell communication (22, 26). EVs favor HIV-1 infection through the transfer of chemokine receptor 5, facilitating viral entry, and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, where EVs are associated with amyloid  $\beta$  peptides, help in the deposition of this toxic protein to several parts of the brain (27, 28). EVs function through the cargo they carry to specific delivery sites. Either through direct action, such as matrix degradation by MMP carried by EVs that aid in the formation of capillary structures (20), or through the activation/inhibition of "resident" cells, EVs can stimulate the production of ROS that decrease NO and inhibit the VEGF-induced pathway (21). The functions of EVs can vary based on the type of components they carry. They may be immune suppressive or immune stimulatory depending on the various components present in EVs.

### Proteins

The protein composition of EVs has been extensively studied through different techniques and coined in different databases, e.g., Urinary Exosomes Protein Database (<http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/exosome/>) and ExoCarta (<http://exocarta.ludwig.edu.au/>). This component is essentially a characteristic of the origin cells. Lötval et al. categorized proteins present in EVs into four distinct groups. Most EVs contain a common group of proteins that are involved in vesicle structure, genesis and transport and are known as vesicular proteins. These proteins are transmembranous or lipid bound and mainly include tetraspanins (CD9, CD63 and CD81), integrins that help attachment EVs, and other cell adhesion molecules (such as PECAM-1, ICAM-1 and VCAM-1). The second group of proteins is those present in the cytosol that can bind to the membrane or receptors, e.g., endosome-binding proteins (annexins) and signal transduction proteins (syntenin). The other groups of proteins are intracellular proteins that are present in

different compartments, such as mitochondrial proteins (cytochrome C) and Golgi components (GM130). Finally, the last group is composed of extracellular proteins that are membrane bound, e.g., acetylcholinesterase, ECM (including fibronectin and collagen type IV) and other soluble proteins, such as cytokines (bFGF, VEGFR2, TGF- $\beta$ ) and growth factors (29, 30).

### Nucleic Acids

EVs contain different nucleic acids, such as mRNA, miRNA, long noncoding RNAs, rRNA, tRNA mitochondrial DNAs and short DNA sequences (31), collected in the Exocarta database. mRNA or miRNAs can be transferred functionally to other cells, resulting in reprogramming of recipient cells (18, 32, 33). Different studies have shown that mRNA in EVs is functional and can be translated to proteins in recipient cells (34, 35). miRNAs have been extensively studied in the context of cancer, and several miRNAs have been identified to be linked to immune suppression that promotes cancer growth or is associated with other diseases, such as Alzheimer's disease (36–38). The treatment of MSCs with high concentrations of RNase significantly decreased the protective effect of MSC-derived EVs in ischemia-reperfusion-induced kidney patients, suggesting an important role of exosomal RNAs in epigenetic reprogramming necessary for the regenerative effect of MSC-derived EVs (39). Additionally, the presence of miRNAs in EVs has been linked to enhanced engraftment and hematopoietic stem cell function upon treatment (40).

### Lipids

Extracellular vesicles have lipids as an essential component of their structure that maintain vesicular integrity, rigidity, function and intercellular fusion of EVs. Some of the lipids are more enriched in EVs than in their cells of origin. Although the proportion of different types of lipids varies from cell to cell, cholesterol is the major form of EV present in all sources, ranging from 15% (mast cells) to 59% (PC-3 cells; prostate cancer cell line) (41, 42). Other lipid constituents are sphingomyelin, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, ganglioside GM3, lysophospholipids and phosphatidylinositol. EVs also contain prostaglandins such as PGE2, PGF2, PGJ2 and PGD2 at a concentration that is enough to trigger biological responses such as PPAR $\gamma$  or LxR pathways in target cells, which can further suppress the transcription of proinflammatory cytokine and chemokines mRNA (43, 44).

## EV-INDUCED IMMUNE MODULATION IN THE MANAGEMENT OF SOLID ORGAN TRANSPLANTATION

Organ replacement is the best option for several organ failure diseases in terms of quality of life and survivability. Through kidney, heart, lung, liver and pancreas transplantation, 2.3 million life-years were gained in 2017 in the US. Nevertheless, the risk of rejection is a major concern with a poor long-term outcome due to chronic rejection even with immunosuppressive

treatments. The lack of donors makes transplantation a scarce resource. Thus, it is important to develop new strategies to improve graft survival. EVs can either activate or suppress the immune system depending on the type of cargo and the cells from which they are produced. For example, EVs produced by T cells help prime DCs through the transfer of DNA in a feedback mechanism, while EVs produced by tumor cells are enriched in several miRNAs, such as miR-21-3-p and miR-181d-5p, that can reprogram neighboring macrophages to support tumor growth by suppressing the immune system (45, 46). Whether EVs stimulate or suppress the immune system depends on EV-secreting cells. For example, an *in vivo* study showed that the administration of exosomes derived from mature or immature DCs had different protein compositions. Mature DC exosome administration resulted in induced effector T cells that led to skin graft rejection, while exosomes derived from immature DCs resulted in T cell activation but not skin graft rejection. This was linked to the absence of ICAM-1 and MHC-II molecules on exosomes derived from immature DCs (47).

The role of EVs in the induction of graft rejection has been extensively studied. It is now well established that the direct recognition of donor cells is not the major transplant recognition pathway. EVs carrying donor MHC molecules and peptides can initiate the immune response that ultimately results in graft rejection. Marino et al. showed that although donor dendritic cells still reside in donor tissue, host APCs in lymph nodes present vesicles bearing donor MHC I and II molecules and are responsible for T cell activation after skin and heart transplants (48). This suggests that host APCs can acquire donor MHC molecules present on EVs secreted by donor cells and thereby initiate immune responses and further determine the fate of the allograft in a semi-direct pathway (24). In another study, Becker et al., described the role of EVs in allograft recognition in an indirect pathway (49). The semi-direct pathway have been linked with the cross dressing of donor class I MHC onto host APC that favors the "three cell model" of alloreactive CD8+ T cell activation (50). Moreover, in the model of fetal tolerance to maternal antigens during pregnancy proposed by W.Burlingham in which maternal (or donor) cells generates MHC-containing exosomes leading to semi-direct and indirect pathways, the indirect pathway does induce tolerogenic APC through the co-expression of PD-L1 and CD86 with donor MHC. Whereas in the semi-direct pathway, the APC side of the immune synapse is exclusively composed of donor exosomal material where PD-L1 and CD86 are absent and thus, induces clonal activation of CD4 T cells (51). As a result, EVs are a major interface between donor and host environment and this suggest a potential therapeutic use of donor EVs to promote tolerance. This would require the inhibition of the semi-direct pathway in those APC to prevent effector T cell activation. This has not been reported in the literature which focuses on the use of EVs that have been shown to regulate physiological processes linked to graft survival improvement such as immune modulation (52) and tissue repair (53). There are several studies testing the effects of EVs in the prevention of allograft rejection (see parts 2.1-2.5). We still need to know which one to use. Although EVs can be secreted by virtually all cell types, it is still unclear which cell types can produce

the EVs that will efficiently prevent graft rejection or induce graft tolerance. The outcome will be highly dependent of the producing cell type and the presence of donor MHC molecules (54). We herein review the most studied candidates for EV therapies: Mesenchymal stromal cells (MSC)-EVs, DC-EVs and Tregs-EVs. Other cell types produce EVs with immunoregulatory properties: Platelet-EVs or neutrophils-EVs but for now, no data are available in transplantation models. Thus, these EVs are only mentioned.

### MSC-Derived EVs

MSCs are nonimmune cells with immunoregulatory properties capable of inhibiting immune effector cell activity (55) and are thus a suitable candidate for EV therapies. MSC-derived EVs exert their protective effects on allografts through the modulation of different biological processes, such as inflammation (56), apoptosis (57), fibrosis (58), angiogenesis (59) and tissue repair (60). When cocultured with CD2/CD3/CD28-stimulated T cells or PHA-stimulated PBMCs, human MSC-derived EVs were able to decrease the proliferation rate, maturation and migration ability of T cells, B cells and NK cells (61) and to reduce IFN- $\gamma$  production by T cells (62). In a chronic GvHD mouse model, treatment with MSC-derived EVs reduced the percentage of T follicular helper, germinal center B cells and macrophages as well as macrophage production of TGF $\beta$  and SMAD2 in the skin (63). In a rat model of kidney allografts, adipose tissue-derived MSC-EVs reduced T and NK cell graft infiltration but did not prolong graft survival, whereas bone marrow MSC-derived EVs from donors slightly improved graft survival but did not affect graft lymphocyte infiltration (54). This study and others suggests that the origin of EVs may be determinant in the development of EV-based therapies, as MSC-derived EVs have different immunoregulatory and regenerative functions depending on their origin (64). Interestingly, bone marrow MSC-derived EVs from chronic kidney disease (CKD) patients showed no differences from those from healthy donors in the capacity to induce angiogenesis and tissue repair, as measured by *in vitro* assays (65), suggesting that bone marrow MSC-derived EVs are fully functional in CKD patients.

In a mouse model of renal ischemia/reperfusion Injury (IRI), administration of bone marrow-derived MSC-EVs reduced renal epithelial cell apoptosis and improved kidney function (66). These results are in accordance with the results from other teams working on other types of MSC-EVs, including Wharton's jelly MSC-EVs (67), human induced pluripotent stem cells derived MSC-EVs (68), and BM MSC-EVs (39) using different models such as in hepatic (69, 70) lung (71, 72), islets (73), BM (63) or heart (67) transplantation models.

MSC-EV injection also has a protective role when perfused *ex vivo* in lungs from deceased donors that did not match the criteria for transplantation. This was associated with an elevation in the rate of alveolar fluid clearance. These data suggest that EV injections before surgery could be part of the treatments and could increase the potential donor pool (74). Interestingly, administration of bone marrow MSC-derived EVs to a patient with GVHD decreased proinflammatory cytokine responses and improved clinical symptoms (75).

### DC-Derived EVs

Exosomes derived from mature DCs or immature DCs have different protein compositions. *In vivo*, mature DC exosome administration resulted in induced effector T cells that led to skin graft rejection. However, exosomes derived from immature DCs resulted in T cell activation without rejection (47).

Immature DC exosomes (imDEX) express low levels of ICAM-I, MHC-II, CD80 and CD86, which characterize suppressive functions (47). Four studies described the role of donor-derived imDEX in mouse and rat transplantation models (76–79) in kidney, liver, heart and intestinal transplantation. Li et al. showed in a cardiac transplant model in BALB-C mice that donor-derived imDEX prolong graft survival. These EVs induce IL-10, inhibit IFN- $\gamma$  and IL-17 mRNA production by T-cells and favor FoxP3 expression in the T-cell compartment. Together, these data corroborate the induction of tolerance by imDEX. In these studies, EVs promoted short-term graft survival. The best results were obtained when EVs were injected in combination with either rapamycin or Tregs. However, imDEX has not been studied in chronic allograft models.

### Treg-Derived EVs

In a rat kidney transplantation model, EVs secreted by regulatory T-cells are immunosuppressive in nature and inhibit T-cell proliferation (52). Murine Tregs secrete more EVs than other murine T cells, such as CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and Th1 cells (80). Moreover, in a mouse model, EVs secreted by allo-Tregs are known to have specific miRNAs. miR-150–5p and miR-142–3p suppress IFN- $\gamma$  secretion by T helper cells (81) and IL-6 secretion by DCs while increasing anti-inflammatory IL-10 production by DCs (82). miR-Let7d reduces Th1 cell proliferation and cytokine production (TNF, IFN- $\gamma$ ) (83). EVs derived from Tregs reduce CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and decrease proinflammatory cytokine release, e.g., IL-2 and IFN- $\gamma$ . This has been attributed to the presence of the ectoenzyme NT5E or CD73, which plays a role in the immunosuppressive function of Tregs by binding to the adenosine receptor A2aR (84–87). This tolerogenic profile prolongs renal allograft survival in a model of acute rejection in rats and inhibits effector T-cell proliferation (88). Treg-EVs also decrease CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte (CTL) proliferation and viability. Interestingly, the proportion of CTLs in G0/G1 was higher when cocultured with Treg-EVs than when cocultured with Tregs alone. Alongside CTL proliferation, Treg-EVs decrease perforin and IFN- $\gamma$  production. When treated with Treg-EVs, liver-transplanted rats had better short-term survival (89).

### Macrophage-Derived EVs

Macrophages, which are mainly part of innate immunity but also contribute to adaptive immunity (90), release EVs that carry pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or invader (e.g., mycobacteria) components that result in increased cytokine production by macrophages *via* Toll-like receptors (TLRs) and by memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (91, 92). Macrophage-derived EVs contain miR-223, which helps differentiate myeloid cells and plays a role in graft rejection (93, 94).

Macrophage-derived EVs present enzymes for leukotriene biosynthesis, suggesting the ability to induce *in vitro* neutrophil chemotaxis (95, 96). The stimulation of macrophages with LPS causes secretion of EVs enriched in cytokines and miRNA, which promote inflammation through activation of NF- $\kappa$ B pathways in naive immune cells (97). Furthermore, EVs can be identified as M1 or M2-like depending on the type of macrophages that secrete the EVs (98), with EVs from M2 macrophages that help promote gastric cancer cell migration. This suggests a role of these EVs either in supporting cancer cells or in immune suppression (99).

### Modified EVs

*In vitro* modifications of EVs may improve their therapeutic potential, either to increase their suppressive function or to deliver drugs. Engineering the parent cell is an interesting way to modify EVs without *in vitro* manipulation of the EVs themselves. However, Tapparo et al. reported that EVs enriched with different miRNAs, known to be pro-regenerative, were ineffective in ameliorating graft fate compared to naive EVs (100). In their study, they only tested 3 miRNAs, miR-127 and miR-10a miR-486. Further studies may highlight other miRNAs or proteins whose enrichment would be beneficial.

EV modifications are not necessarily directed toward the immunosuppressive activity of EVs. To be effective, EVs delivery needs to be directed toward the graft environment, and EVs elimination may be reduced. In this aim, scaffolds were engineered to promote EVs deposition in the graft. For example, a MMP2-sensitive self-assembling antigen (KMP2) hydrogel releases EVs only in the presence of metalloproteases and other endogenous proteases and peptidases. KMP2-EVs were shown to have greater bioactivity in a renal IRI model than EVs alone (101). In another example, to increase EV bioavailability, EVs may be coated with the hydrophobic polymer PEG to reduce liver uptake (102) and then functionalized with cell-specific nanobodies (103). Modified EVs may also be synthesized *in vitro*, out of the cell, to provide continuous delivery of pro-tolerogenic factors (104). Such microparticles delivering cytokines (TGF $\beta$ 1 and IL-2) or drugs (rapamycin) were reported to induce Tregs and promote allograft survival in animal models (105).

### EVs AS A SOURCE OF BIOMARKERS OF GRAFT REJECTION

In addition to expectancies as therapeutics, EVs carry a fraction of their parent cell intracellular and membrane proteins. Making it one more source of biomarkers. The advantage of EVs as biomarkers compared to engrafted cells is their circulating ability through different fluids, the most obvious being serum, which makes EV harvesting less invasive than biopsies. There is no consensus method for EV isolation and the duration of the procedures as well as their cost are variable. EVs purity and integrity after the procedure is also an important point that has to be considered. Differential ultracentrifugation is the most used method for EVs purification. It is easy-to-use but the procedure

is long and require specific equipment. Ultrafiltration and PolyEthyleneGlycol-Based precipitation are fast, low-cost and easy-to-use protocols counterbalanced by relatively important contaminations with low- mRNA/miRNA quality. Other methods, based on immunoaffinity of tetraspanin detection such as CD9 expression allow better purity, yet may exclude CD9neg EVs. Moreover, the removal of antibodies uses harsh protocols that may alter membrane-bound proteins. Finally, the size exclusion chromatography has demonstrated good purification performances. Yet, better purifications require more expensive columns. All these methods strengths and weaknesses are more extensively discussed here (106).

### Biomarkers of Renal Transplant Rejection in Blood and Urine

Kidney rejection is associated with different pathological conditions that induce changes in the urinary compartment that may also contain EVs. In humans, urine EVs are thus increased after transplantation and in chronic kidney diseases (107) and are a potential source of biomarkers (108). Ultracentrifugation isolated-EVs from blood of kidney transplant recipients with glomerulopathy have higher levels (up to 2-fold) of fibronectin and type IV collagen than EVs from patients with a stable transplant (109). These two molecules act as self-antigens and activate autoimmunity. Proteomics by mass spectrometry techniques on EVs isolated by differential centrifugations can discriminate cell-mediated rejection (CMR), antibody-mediated rejection (ABMR) and tubular injury (TI). Each of these pathways can be associated with biological processes: tubular injury is associated with elevated sodium ion transport, CMR with cytoskeletal organization and epithelial cell differentiation and ABMR with protein trafficking, inflammatory and complement pathways. The GO term "immune response" was enriched in the ABMR and CMR groups but not in the TI group (110). Urinary EVs from a long-term graft survival (LGS) group were compared with EVs from a chronic antibody-mediated rejection (CAMR) group through another proteomic analysis using nano-UPLC-MS/MS (Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry). Six proteins (known to be present in EVs and mentioned in the literature to be related to graft rejection) were upregulated in the CAMR group (APOA1, PIGR, TTR, AZGP1, HPX and CP). APOA1 was the most efficient biomarker in the list to predict graft outcome (111). The same analysis in urine from kidney transplanted patients with stable function and acute T cell-mediated rejection highlighted HPX and TSPAN1, and the combination of these markers can discriminate stable and acute TCMR (112). In another study, by using mass spectrometry of EVs content after differential centrifugations Sigdel et al. identified 11 proteins upregulated in EVs in urine from patients with acute rejection (A2M, APOA2, APOM, CD5L, CLCA1, FGA, FGB, IGHM, DEFA5, PROS1 and KIAA0753) (113).

### Biomarkers of Lung Rejection in Blood and Bronchoalveolar Lavages

EVs derived from the sera and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids of patients with bronchiolitis obliterans syndrome (BOS),

acute rejection (AR) and purified with ultracentrifugation have been described to contain the self-antigens Collagen-V and K $\alpha$ IT. In the patients tested, an increase in collagen-V in EVs was visible as early as 1-month post transplantation, whereas the clinical diagnosis of acute rejection was at 1.5, 1.9 and 2.8 months. In contrast, collagen-V expression in EVs remained stable at 1 month and was undetectable at 3 and 6 months in stable patients. miRNA profiling in EVs from a cohort of 30 patients showed high expression of miR-92a and miR-182 involved in endothelial activation and inflammation in AR and BOS. miR-155 (inflammation) and miR-142-5p (antibody-mediated rejection) were linked to EVs from patients with BOS (114). In the same patients, these markers of rejection were also differentially expressed in EVs from BAL. Interestingly, Gunasekaran et al. showed that only EVs from patients rejecting their graft expressed the costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 (115). In another study, EVs in BAL fluids from patients with acute rejection overexpressed olfactory receptors, complement, surfactants, defensins, TLR2, MYD88, and nitric oxide synthase pathways and downregulated CXCL16, IL-33 and EEA-1 compared with EVs from BAL of patients with stable graft function (116).

### Biomarkers of Heart Rejection

Heart rejection has also been associated with changes in EVs content compared to patients stable patients. Acute Cellular Rejection (ACR) and ABMR were associated with significantly higher expression of the immune and nonimmune markers HLA-I, CD41b, ROR1, and SSEA-4 in EVs isolated by ultracentrifugation. ACR was specifically associated with the T-cell markers CD2 and CD3, and ABMR was associated with the B-cell markers CD19, CD20, HLA-II, CD25, and the epithelial cell adhesion molecule CD326 (117). Together, these markers have good potential for rejection diagnosis. When comparing composition of EVs isolated with a commercially available kit based on EV precipitation in heart transplanted patients, heart failure patients and healthy controls, there are greater similarities between healthy controls and heart failure patients than with transplanted patients with no rejection (118). This indicates the ability of EVs to describe the immune and nonimmune changes following transplantation independently of the rejection.

### Biomarkers of Islets Rejection

In islet transplantation, there were changes as early as day 1 in islet-derived EVs and T cell-derived EVs, where glucose kinetic changes were observed at day 6. Serum EV modifications are visible both in quantification (relative decrease in total serum EVs) and composition with the downregulation of heat shock cognate protein 70 (HSC70) and angiopoietin-1 and the upregulation of hemopexin, complement C3 and 39 miRNAs (2-fold increase or more). In a clinical cohort of islet-transplanted diabetic patients, the drop in islet-derived exosomes correlated with the rise in donor-specific antibodies, while clinical markers of rejection were still unchanged (119).

## Clinical Applications: Benefits and Limitations

EVs are a source of therapeutic and diagnostic tools that have not yet been fully explored and offer promising perspectives in the field of solid organ transplantation. Their use, like cellular therapies and other synthetic delivery vehicles (liposomes, nanoparticles), has many advantages. Due to their natural origin, EVs present better biocompatibility and biodistribution (120). Their membrane composed of a lipidic bilayer protects their molecular content and ensures their transport within fluids by protecting them from degradation (18, 121, 122). Moreover, their size has proven to be a major asset, allowing better accessibility in highly vascularized organs. Indeed, cell therapies, based for example on the use of MSCs, have shown that their invasive size (20-30 $\mu$ m) leads to their accumulation in pulmonary capillaries (5-10 $\mu$ m) when administered systemically (123). Finally, compared to liposomal or cellular therapies, EVs present a reduced toxicity and immunogenicity (124-126). In addition to the advantages linked to their intrinsic properties, EVs present a reduced and more adapted production time in comparison of cells therapy, as well as a capacity to be stored (127, 128). The production and use of EVs in an allogeneic production and administration model is of great interest, especially in the context of pathologies with a reduced window of therapeutic action (129).

Nevertheless, the use of EVs, whether for therapeutic or diagnostic purposes, also has a number of limitations. The absence of a consensus method for the isolation, purification and characterization of EVs makes their use in the clinic complex at the present time (130). Indeed, the current isolation methods do not allow a complete purification of EVs with a practically systematic co-isolation of proteins and contaminating particles of the same size/density or a yield in EVs that is too low (131). Moreover, the absence of markers results in a heterogeneous suspension of EVs, whose different subtypes and functionality remain difficult to determine (132). Furthermore, comparative studies agree that the use of different isolation and characterization techniques leads to heterogeneity of results obtained for the same samples (133). The development of diagnostic tools would then be subject to a material investment with a consequent cost, making the use and generalization of EVs as biomarkers complex. Finally, the content and properties of EVs remain dependent on the cell culture conditions. Hypoxia (134), serum deprivation (135), etc. are some of the factors that can modify the secretome of candidate cells, and consequently, their potential therapeutic activity. Obtaining stable batches of EVs of acceptable quality for clinical use will require further development to ensure the quality and safety of the EVs produced.

In addition to the technical aspects, the use of EVs is also subject to their biological source. Indeed, the production of EVs is conditioned by the availability of a sufficient quantity of cells, and the capacity to produce them in large quantities without altering their phenotype, morphology and content. In order to overcome this problem, several teams try to increase the secretion of EVs, not without consequences. The processes used generate cellular

**TABLE 1 |** Markers of graft rejection in the EV compartment.

Transplanted organ	Syndrome	Origin of Evs	Biomarkers positively correlated with rejection	Biomarkers negatively correlated with rejection	Ref	Transplanted organ	Syndrome	Origin of Evs	Biomarkers positively correlated with rejection	Biomarkers negatively correlated with rejection	Ref	
Lung	Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS)	Isolated from BAL fluids and serum by ultracentrifugation	Collagen-V, K $\alpha$ 1T, miR-92a, miR-182, miR-155, miR-142-5p, olfactory receptors, complement, surfactants, defensins, TLR2, MYD88	CXCL16, IL-33, EEA-1	(114–116, 139)	Kidney	Kidney glomerulopathy	exosomes isolated from plasma by ultracentrifugation followed by sucrose cushion	Fibronectin, Collagen type IV		(109)	
	Acute Rejection	Isolated from BAL fluids and serum by ultracentrifugation	miR-182, miR-92a		(114)		Tubular injury	Isolated from 20mL urines by differential centrifugation	sodium-ion transport (26 proteins)			(110)
Heart	Acute Cellular Rejection (ACR)	Isolated from plasma by differential centrifugation	KV302, HV304, ITIH1, FRMPD1	FIBB, FIBG, C1QA, C1R, HV315, APOL1, F13A, FIBA, FINC, TSP1, ACTB	(117)	Kidney	Cell mediated rejection (CMR)	Isolated from 20mL or 500 $\mu$ L urines by differential centrifugation	Actin filament based process (47 proteins) Epithelial cell idfferenciation (21 proteins) Cytoskeleton organization (63 proteins) HPX, TSPAN, LGALS3BP		(110, 112)	
	Antibody Mediated Rejection (ABMR)	Isolated from plasma by differential centrifugation	KV302, HV304	FIBB, FIBG, C1QA, C1R, HV315, ITIH1, APOL1, F13A, FIBA, FINC, TSP1, ACTB	(117)		AntiBody Mediated Rejection (ABMR)	isolated from 200 $\mu$ L plasma with exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit	GP130, CAV1, DARC, SH2D1B, CCL4, TNF $\alpha$ ,	IL-10, IL-23 $\alpha$		(138)
	Cardiac Allograft Vasculopathy	Isolated from BAL fluids and serum by ultracentrifugation	Myo, Vm				(140)	AntiBody Mediated Rejection (ABMR)	Isolated from 50mL pool of urines by differential centrifugation	Protein transport (97 proteins) Protein localization (103 proteins) Acute inflammatory response (18 proteins) Proteine maturation by peptide bond cleavage (15 proteins) APOA1, PIGR, TTR, AZGP1, HPX and CP)		
Islets	Acute rejection	Isolated from plasma using Invitrogen Total Exosome Isolation Kit from serum	Hemopexin, C3, 39 miRNAs	HSC70, angiotensin-1	(117, 118)	Kidney	Acute rejection	Isolated from 10mL urines by differential centrifugation	A2M, APOA2, APOM, CD5L, CLCA1, FGA, FGB, IGHM, DEFA5, PROS1 and KIAA0753			(113)

stress and impact the phenotype of the exposed cells. This leads to a modification of their secretory profile and the immunoregulatory properties of the generated EVs (136, 137).

It is undeniable that research is still required for the use of EVs in the clinic. Nevertheless, EVs could represent a new, more efficient and reliable therapeutic approach in solid organ transplantation, to complement and perhaps one day replace current treatments, whose side effects remain heavy and which are no longer sufficient for long-term graft stability.

## CONCLUSION

The acquisition of tolerance toward the graft is the final step to improve patient's quality of life after transplantation. However, understanding the mechanisms of tolerance may require years/decades of research. Therefore, the management of transplantation is still dependent on two conditions: an adequate immune suppression to delay graft rejection and a continuous monitoring of graft rejection through different biomarkers. The use of EVs is a promising method for transplantation management. On the one hand, they have shown their ability to reflect the transplanted environment and to discriminate rejection events from stable patients through a rapid increase in immune-associated proteins and miRNA (summarized in **Table 1**). These changes are certainly linked to a function of the EV compartment in the process of graft rejection. EVs are a potent intermediate that promotes contact between donor antigens and the host immune system, as they are enriched in MHC and costimulatory molecules for most types of transplant rejection (139, 141–143).

On the other hand, EVs are extensively studied for their utilization as therapeutics in transplantation. EVs derived from regulatory cells have shown immunosuppressive abilities that are not identical but complementary to their parental functions. EV therapies are based on the same principles as cellular therapies and mostly involve common pathways. However, EV therapies are free of any cellular context and EVs have no replicative properties.

## REFERENCES

- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* (2015) 65:783–97. doi: 10.1093/biosci/biv084
- Yáñez-Mó M, Sijlander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *J Extracellular Vesicles* (2015) 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066
- Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, et al. Extracellular Vesicles From Neural Stem Cells Transfer IFN- $\gamma$  via Ifngr1 to Activate Stat1 Signaling in Target Cells. *Mol Cell* (2014) 56:193–204. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.020
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:569–79. doi: 10.1038/nri855
- Meldolesi J. Extracellular Vesicles, News About Their Role in Immune Cells: Physiology, Pathology and Diseases. *Clin Exp Immunol* (2019) 196:318–27. doi: 10.1111/cei.13274
- Aaronson S. The Synthesis of Extracellular Macromolecules and Membranes by A Population of the Phytoflagellate *Ochromonas Danica* 1:

There is no risk of engrafting *in vitro* engineered cells in patients. However, no data on the long-term impact of EV-induced immune suppression are available yet in transplanted patients. We reviewed *in vivo* studies that have demonstrated the efficacy of such treatments in delaying graft rejection in preclinical models. The results from one patient suffering from GvHD and treated with MSC EVs were encouraging (75), but we are still far from clinical trials for solid organ transplantation or GvHD as we still need GMP suitable protocols for EVs preparation (e.g. EVs origin, isolation method, monitoring). Initiatives emerge to propose precise recommendations about EVs handling (144) and are taken to grow. As far as we know, the choice of the isolation methods depends from the attempted perspectives since different protocols may alter different EV cargo compartment. Among the 3 main components of EVs, namely lipids, proteins and RNA, the researches in the field of transplantation mainly focuses on miRNA-induced gene inhibition and protein interactions with relatively important knowledge in the search of biomarkers or immunomodulators, whereas the impact of lipids has not been extensively studied, whilst they have demonstrated their role in immune functions (39, 40, 43, 44, 48).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

NS and MU wrote the original manuscript. AD, AS, FG, HM, and SB revised the manuscript and actively contributed to the final version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The editing and publishing fees were financially supported by Ceva Santé Animale CIFRE grant n° 2019/0388 and by the Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire (IRSRLP).

Extracellular Secretion by *Ochromonas*. *Limnol Oceanogr* (1971) 16:1–9. doi: 10.4319/lo.1971.16.1.0001

- Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and Intracellular Processing of Transferrin and Colloidal Gold-Transferrin in Rat Reticulocytes: Demonstration of a Pathway for Receptor Shedding. *Eur J Cell Biol* (1984) 35:256–63.
- Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the Transferrin Receptor During Maturation of Sheep Reticulocytes *In Vitro*: Selective Externalization of the Receptor. *Cell* (1983) 33:967–78. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-Presenting Vesicles. *J Exp Med* (1996) 183:1161–72. doi: 10.1084/jem.183.3.1161
- Vlassov AV, Magdalen S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current Knowledge of Their Composition, Biological Functions, and Diagnostic and Therapeutic Potentials. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Gen Subj* (2012) 1820:940–8. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Lee Y, Andaloussi EL S, & Wood, M. J. A. Exosomes and Microvesicles: Extracellular Vesicles for Genetic Information Transfer and Gene Therapy. *Hum Mol Genet* (2012) 21:R125–34. doi: 10.1093/hmg/ddc317

12. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular Organelles Important in Intercellular Communication. *J Proteomics* (2010) 73:1907–20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006
13. Caruso S, Poon IKH. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol* (2018) 9:1486. doi: 10.3389/fimmu.2018.01486
14. Andaloussi EL, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Drug Discovery* (2013) 12:347–57. doi: 10.1038/nrd3978
15. Slomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol* (2018) 9:2723. doi: 10.3389/fimmu.2018.02723
16. Aalberts M, Stout TAE, Stoorvogel W. Prostatomes: Extracellular Vesicles From the Prostate. *REPRODUCTION* (2014) 147:R1–R14. doi: 10.1530/REP-13-0358
17. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular Vesicles in Physiological and Pathological Conditions. *Blood Rev* (2013) 27:31–9. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.002
18. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dworak P, et al. Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Reprogram Hematopoietic Progenitors: Evidence for Horizontal Transfer of mRNA and Protein Delivery. *Leukemia* (2006) 20:847–56. doi: 10.1038/sj.leu.2404132
19. Tarabouletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as Membrane Vesicle-Associated Components by Endothelial Cells. *Am J Pathol* (2002) 160:673–80. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64887-0
20. Kim HK, Song KS, Chung J-H, Lee KR, Lee S-N. Platelet Microparticles Induce Angiogenesis *In Vitro*. *Br J Haematol* (2004) 124:376–84. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04773.x
21. Yang C, Mwaikambo BR, Zhu T, Gagnon C, Lafleur J, Seshadri S, et al. Lymphocytic Microparticles Inhibit Angiogenesis by Stimulating Oxidative Stress and Negatively Regulating VEGF-Induced Pathways. *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiol* (2008) 294:R467–76. doi: 10.1152/ajpregu.00432.2007
22. Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-Derived Vesicles Exposing Coagulant Tissue Factor in Saliva. *Blood* (2011) 117:3172–80. doi: 10.1182/blood-2010-06-290460
23. Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, et al. Tissue Factor-Bearing Microparticles Derived From Tumor Cells: Impact on Coagulation Activation. *J Thromb Haemostasis* (2008) 6:1517–24. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02987.x
24. Gasser O, Schifferli JA. Activated Polymorphonuclear Neutrophils Disseminate Anti-Inflammatory Microparticles by Ectocytosis. *Blood* (2004) 104:2543–8. doi: 10.1182/blood-2004-01-0361
25. Benichou G, Wang M, Ahrens K, Madsen JC. Extracellular Vesicles in Allograft Rejection and Tolerance. *Cell Immunol* (2020) 349:104063. doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104063
26. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, et al. Blood Platelets Contain Tumor-Derived RNA Biomarkers. *Blood* (2011) 118:3680–3. doi: 10.1182/blood-2011-03-344408
27. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the Chemokine Receptor CCR5 Between Cells by Membrane-Derived Microparticles: A Mechanism for Cellular Human Immunodeficiency Virus 1 Infection. *Nat Med* (2000) 6:769–75. doi: 10.1038/77498
28. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated With Neurodegenerative Diseases? *Front Physiol* (2012) 3. doi: 10.3389/fphys.2012.00124
29. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal Experimental Requirements for Definition of Extracellular Vesicles and Their Functions: A Position Statement From the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracellular Vesicles* (2014) 3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913
30. Tokarz A, Szuścik I, Kuśnierz-Cabala B, Kapusta M, Konkolewska M, Żurakowski A, et al. Extracellular Vesicles Participate in the Transport of Cytokines and Angiogenic Factors in Diabetic Patients With Ocular Complications. *Folia Medica Cracoviensis* (2015) LV4:35–48.
31. Nolte-'t Hoen ENM, Buermans HPJ, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MHM, 't Hoen PAC. Deep Sequencing of RNA From Immune Cell-Derived Vesicles Uncovers the Selective Incorporation of Small Non-Coding RNA Biotypes With Potential Regulatory Functions. *Nucleic Acids Res* (2012) 40:9272–85. doi: 10.1093/nar/gks658
32. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Beer Stolz D, Sullivan MLG, Karlsson JM, et al. Mechanism of Transfer of Functional microRNAs Between Mouse Dendritic Cells via Exosomes. *Blood* (2012) 119:756–66. doi: 10.1182/blood-2011-02-338004
33. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-Mediated Transfer of mRNAs and microRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange Between Cells. *Nat Cell Biol* (2007) 9:654–9. doi: 10.1038/ncb1596
34. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJG, Zeiher AM, et al. Atheroprotective Communication Between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Through miRNAs. *Nat Cell Biol* (2012) 14:249–56. doi: 10.1038/ncb2441
35. Tannous BA, Kim D-E, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and *In Vivo*. *Mol Ther* (2005) 11:435–43. doi: 10.1016/j.jymth.2004.10.016
36. Nishida-Aoki N, Ochiya T. Interactions Between Cancer Cells and Normal Cells via miRNAs in Extracellular Vesicles. *Cell Mol Life Sci* (2015) 72:1849–61. doi: 10.1007/s00018-014-1811-0
37. Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Phillips S, Kaimal V, Mao Y, et al. miRNA Contents of Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles in Glioblastoma Patients. *J Neurooncol* (2015) 123:205–16. doi: 10.1007/s11060-015-1784-3
38. Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG, et al. Plasma Exosomal miRNAs in Persons With and Without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PLoS One* (2015) 10:e0139233. doi: 10.1371/journal.pone.0139233
39. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles Derived From Human Adult Mesenchymal Stem Cells Protect Against Ischaemia-Reperfusion-Induced Acute and Chronic Kidney Injury. *Nephrol Dialysis Transplant* (2011) 26:1474–83. doi: 10.1093/ndt/grf015
40. De Luca L, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. miRNAs and piRNAs From Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles Induce Cell Survival and Inhibit Cell Differentiation of Cord Blood Hematopoietic Stem Cells: A New Insight in Transplantation. *Oncotarget* (2016) 7:6676–92. doi: 10.18632/oncotarget.6791
41. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux J-F, et al. Mast Cell- and Dendritic Cell-Derived Exosomes Display a Specific Lipid Composition and an Unusual Membrane Organization. *Biochem J* (2004) 380:161–71. doi: 10.1042/bj20031594
42. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhaneen D, Rög T, Orlowski A, et al. Molecular Lipidomics of Exosomes Released by PC-3 Prostate Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids* (2013) 1831:1302–9. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.04.011
43. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes Account for Vesicle-Mediated Transcellular Transport of Activatable Phospholipases and Prostaglandins. *J Lipid Res* (2010) 51:2105–20. doi: 10.1194/jlr.M003657
44. Ceroi A, Delettre FA, Marotel C, Gauthier T, Asgarova A, Büchle S, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Derived Microparticles in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Involve Liver X Receptor Activation. *Haematologica* (2016) 101:e72–6. doi: 10.3324/haematol.2015.135459
45. Chen X, Zhou J, Li X, Wang X, Lin Y, Wang X. Exosomes Derived From Hypoxic Epithelial Ovarian Cancer Cells Deliver microRNAs to Macrophages and Elicit a Tumor-Promoted Phenotype. *Cancer Lett* (2018) 435:80–91. doi: 10.1016/j.canlet.2018.08.001
46. Torralba D, Baixauli F, Villarroya-Beltri C, Fernández-Delgado I, Latorre-Pellicer A, Acín-Pérez R, et al. Priming of Dendritic Cells by DNA-Containing Extracellular Vesicles From Activated T Cells Through Antigen-Driven Contacts. *Nat Commun* (2018) 9:2658. doi: 10.1038/s41467-018-05077-9



47. Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo C, Batteux F, et al. ICAM-1 on Exosomes From Mature Dendritic Cells Is Critical for Efficient Naive T-Cell Priming. *Blood* (2005) 106:216–23. doi: 10.1182/blood-2005-01-0220
48. Marino J, Babiker-Mohamed MH, Crosby-Bertorini P, Paster JT, LeGuern C, Germana S, et al. Donor Exosomes Rather Than Passenger Leukocytes Initiate Alloreactive T Cell Responses After Transplantation. *Sci Immunol* (2016) 1:aaf8759–aaf8759. doi: 10.1126/sciimmunol.aaf8759
49. Becker PD, Ratnasothy K, Sen M, Peng Q, Romano M, Bazoer J, et al. B Lymphocytes Contribute to Indirect Pathway T Cell Sensitization via Acquisition of Extracellular Vesicles. *Am J Transplant* (2021) 21:1415–26. doi: 10.1111/ajt.16088
50. Mastoridis S, Londoño M, Kurt A, Kodela E, Crespo E, Mason J, et al. Impact of Donor Extracellular Vesicle Release on Recipient Cell “Cross-Dressing” Following Clinical Liver and Kidney Transplantation. *Am J Transplant* (2021) 21:2387–98. doi: 10.1111/ajt.16123
51. Bracamonte-Baran W, Burlingham W. Non-Inherited Maternal Antigens, Pregnancy, and Allotolerance. *BioMed J* (2015) 38:39. doi: 10.4103/2319-4170.143498
52. Aiello S, Rocchetta F, Longaretti L, Faravelli S, Todeschini M, Cassis L, et al. Extracellular Vesicles Derived From T Regulatory Cells Suppress T Cell Proliferation and Prolong Allograft Survival. *Sci Rep* (2017) 7:11518. doi: 10.1038/s41598-017-08617-3
53. Varderdidou-Minasian S, Lorenowicz MJ. Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Tissue Repair: Challenges and Opportunities. *Theranostics* (2020) 10:5979–97. doi: 10.7150/thno.40122
54. Ramirez-Bajo MJ, Rovira J, Lazo-Rodríguez M, Banon-Maneus E, Tubita V, Moya-Rull D, et al. Impact of Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles in a Rat Model of Kidney Rejection. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8:10. doi: 10.3389/fcell.2020.00010
55. Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, et al. The Challenges and Promises of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Use as a Cell-Based Therapy. *Stem Cell Res Ther* (2015) 6:234. doi: 10.1186/s13287-015-0240-9
56. Wise AF, Ricardo SD. Mesenchymal Stem Cells in Kidney Inflammation and Repair: MSC in Kidney Repair. *Nephrology* (2012) 17:1–10. doi: 10.1111/j.1440-1797.2011.01501.x
57. Sung P-H, Chang C-L, Tsai T-H, Chang L-T, Leu S, Chen Y-L, et al. Apoptotic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy Protects Against Lung and Kidney Injury in Sepsis Syndrome Caused by Cecal Ligation Puncture in Rats. *Stem Cell Res Ther* (2013) 4:155. doi: 10.1186/srct385
58. Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Functional Improvement of Chronic Renal Failure. *Stem Cells Dev* (2009) 18:521–30. doi: 10.1089/scd.2008.0097
59. Gonzalez-King H, Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, Ciria M, Montero JA, Sepúlveda P. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Angiogenesis Mediated by Jagged1 in MSC Exosomes. *Stem Cells* (2017) 35:1747–59. doi: 10.1002/stem.2618
60. Qi K, Li N, Zhang Z, Melino G. Tissue Regeneration: The Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and Immune Response. *Cell Immunol* (2018) 326:86–93. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.11.010
61. Trapani MD. Differential and Transferable Modulatory Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles on T, B and NK Cell Functions. *Sci Rep* (2016) 13:1–13. doi: 10.1038/srep24120
62. Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Álvarez V, Tarazona R, et al. Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on *In Vitro* Stimulated T Cells. *Front Immunol* (2014) 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00556
63. Guo L, Lai P, Wang Y, Huang T, Chen X, Geng S, et al. Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells Prevent Skin Fibrosis in the cGVHD Mouse Model by Suppressing the Activation of Macrophages and B Cells Immune Response. *Int Immunopharmacol* (2020) 84:106541. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106541
64. Liu Y, Holmes C. Tissue Regeneration Capacity of Extracellular Vesicles Isolated From Bone Marrow-Derived and Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:648098. doi: 10.3389/fcell.2021.648098
65. van Rhijn-Brouwer FCC, van Balkom BWM, Papazova DA, Hazenbrink DHM, Meijer AJ, Brete I, et al. Paracrine Proangiogenic Function of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Is Not Affected by Chronic Kidney Disease. *Stem Cells Int* (2019) 2019:1–12. doi: 10.1155/2019/1232810
66. Wang C, Zhu G, He W, Yin H, Lin F, Gou X, et al. BMSCs Protect Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Secreting Exosomes Loaded With miR-199a-5p That Target BIP to Inhibit Endoplasmic Reticulum Stress at the Very Early Reperfusion Stages. *FASEB J* (2019) 33:5440–56. doi: 10.1096/fj.201801821R
67. Wu X, Yan T, Wang Z, Wu X, Cao G, Zhang C, et al. Micro-Vesicles Derived From Human Wharton’s Jelly Mesenchymal Stromal Cells Mitigate Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats After Cardiac Death Renal Transplantation. *J Cell Biochem* (2018) 119:1879–88. doi: 10.1002/jcb.26348
68. Yuan X, Li D, Chen X, Han C, Xu L, Huang T, et al. Extracellular Vesicles From Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hiPSC-MSCs) Protect Against Renal Ischemia/Reperfusion Injury via Delivering Specificity Protein (SP1) and Transcriptional Activating of Sphingosine Kinase 1 and Inhibiting Necroptosis. *Cell Death Dis* (2017) 8:3200. doi: 10.1038/s41419-017-0041-4
69. Haga H, Yan IK, Borrelli DA, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, et al. Extracellular Vesicles From Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Protect Against Murine Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury: Haga Et al. *Liver Transpl* (2017) 23:791–803. doi: 10.1002/lt.24770
70. Anger F, Camara M, Ellinger E, Germer C-T, Schlegel N, Otto C, et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Improve Liver Regeneration After Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *Stem Cells Dev* (2019) 28:1451–62. doi: 10.1089/scd.2019.0085
71. Lonati C, Bassani GA, Brambilla D, Leonardi P, Carlin A, Maggioni M, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Improve the Molecular Phenotype of Isolated Rat Lungs During Ischemia/Reperfusion Injury. *J Heart Lung Transplant* (2019) 38:1306–16. doi: 10.1016/j.jhealun.2019.08.016
72. Stone ML, Zhao Y, Robert Smith J, Weiss ML, Kron IL, Laubach VE, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Lung Ischemia-Reperfusion Injury and Enhance Reconditioning of Donor Lungs After Circulatory Death. *Respir Res* (2017) 18:212. doi: 10.1186/s12931-017-0704-9
73. Wen D, Peng Y, Liu D, Weizmann Y, Mahato RI. Mesenchymal Stem Cell and Derived Exosome as Small RNA Carrier and Immunomodulator to Improve Islet Transplantation. *J Controlled Release* (2016) 238:166–75. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.044
74. Gennai S, Monsel A, Hao Q, Park J, Matthey MA, Lee JW. Microvesicles Derived From Human Mesenchymal Stem Cells Restore Alveolar Fluid Clearance in Human Lungs Rejected for Transplantation: MSC Microvesicles Rehabilitate Marginal Lungs. *Am J Transplant* (2015) 15:2404–12. doi: 10.1111/ajt.13271
75. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A-K, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-Derived Exosomes: A Novel Tool to Treat Therapy-Refractory Graft-Versus-Host Disease. *Leukemia* (2014) 28:970–3. doi: 10.1038/leu.2014.41
76. Pang X-L, Wang Z-G, Liu L, Feng Y-H, Wang J-X, Xie H-C, et al. Immature Dendritic Cells Derived Exosomes Promotes Immune Tolerance by Regulating T Cell Differentiation in Renal Transplantation. *aging* (2019) 11:8911–24. doi: 10.18632/aging.102346
77. Ma B, Yang J-Y, Song W, Ding R, Zhang Z, Ji H, et al. Combining Exosomes Derived From Immature DCs With Donor Antigen-Specific Treg Cells Induces Tolerance in a Rat Liver Allograft Model. *Sci Rep* (2016) 6:32971. doi: 10.1038/srep32971
78. Li X, Li J-J, Yang J-Y, Wang D-S, Zhao W, Song W-J, et al. Tolerance Induction by Exosomes From Immature Dendritic Cells and Rapamycin in a Mouse Cardiac Allograft Model. *PLoS One* (2012) 7:e44045. doi: 10.1371/journal.pone.0044045
79. Yang X, Meng S, Jiang H, Zhu C, Wu W. Exosomes Derived From Immature Bone Marrow Dendritic Cells Induce Tolerogenicity of Intestinal Transplantation in Rats. *J Surg Res* (2011) 171:826–32. doi: 10.1016/j.jss.2010.05.021
80. Agarwal A, Fanelli G, Letizia M, Tung SL, Boardman D, Lechler R, et al. Regulatory T Cell-Derived Exosomes: Possible Therapeutic and Diagnostic Tools in Transplantation. *Front Immunol* (2014) 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00555

81. Tung SL, Fanelli G, Matthews RI, Bazoer J, Letizia M, Vizcay-Barrena G, et al. Regulatory T Cell Extracellular Vesicles Modify T-Effector Cell Cytokine Production and Protect Against Human Skin Allograft Damage. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8:317. doi: 10.3389/fcell.2020.00317
82. Tung SL, Boardman DA, Sen M, Letizia M, Peng Q, Cianci N, et al. Regulatory T Cell-Derived Extracellular Vesicles Modify Dendritic Cell Function. *Sci Rep* (2018) 8:6065. doi: 10.1038/s41598-018-24531-8
83. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, et al. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* (2014) 41:89–103. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.019
84. Smyth LA, Ratnasothy K, Tsang JYS, Boardman D, Warley A, Lechler R, et al. CD73 Expression on Extracellular Vesicles Derived From CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T Cells Contributes to Their Regulatory Function: Immunomodulation. *Eur J Immunol* (2013) 43:2430–40. doi: 10.1002/eji.201242909
85. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular Purine Metabolism and Signaling of CD73-Derived Adenosine in Murine Treg and Tef Cells. *Am J Physiology-Cell Physiol* (2011) 301:C530–9. doi: 10.1152/ajpcell.00385.2010
86. Lappas CM, Rieger JM, Linden JA. Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- $\gamma$  Production in Murine CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol* (2005) 174:1073–80. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.1073
87. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression. *J Exp Med* (2007) 204:1257–65. doi: 10.1084/jem.20062512
88. Yu X, Huang C, Song B, Xiao Y, Fang M, Feng J, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells-Derived Exosomes Prolonged Kidney Allograft Survival in a Rat Model. *Cell Immunol* (2013) 285:62–8. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.06.010
89. Chen L, Huang H, Zhang W, Ding F, Fan Z, Zeng Z. Exosomes Derived From T Regulatory Cells Suppress CD8<sup>+</sup> Cytotoxic T Lymphocyte Proliferation and Prolong Liver Allograft Survival. *Med Sci Monit* (2019) 25:4877–84. doi: 10.12659/MSM.917058
90. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The Role of Macrophages in Allograft Rejection. *Transplantation* (2005) 80:1641–7. doi: 10.1097/01.tp.0000173903.26886.20
91. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes Released From Macrophages Infected With Intracellular Pathogens Stimulate a Proinflammatory Response. *Vitro Vivo Blood* (2007) 110:3234–44. doi: 10.1182/blood-2007-03-079152
92. Giri PK, Schorey JS. Exosomes Derived From M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *In Vitro In Vivo PLoS One* (2008) 3:e2461. doi: 10.1371/journal.pone.0002461
93. Ismail N, Wang Y, Dakhallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, et al. Macrophage Microvesicles Induce Macrophage Differentiation and miR-223 Transfer. *Blood* (2013) 121:984–95. doi: 10.1182/blood-2011-08-374793
94. Chain R, Chakhtoura M, Gallucci S. The Role of Myeloid Cells in Graft Rejection (TRAN3P.893). *J Immunol* (2014) 192:202.32.
95. Esser J, Gehrmann U, D'Alexandri FL, Hidalgo-Estévez AM, Wheelock CE, Scheynius A, et al. Exosomes From Human Macrophages and Dendritic Cells Contain Enzymes for Leukotriene Biosynthesis and Promote Granulocyte Migration. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 126:1032–1040.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.039
96. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, et al. Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: A UNIQUE GENE DELIVERY/EXPRESSION SYSTEM IDEAL FOR CELL REPROGRAMMING. *J Biol Chem* (2011) 286:4760–71. doi: 10.1074/jbc.M110.183780
97. Vickers NJ. Animal Communication: When I'm Calling You, Will You Answer Too? *Curr Biol* (2017) 27:R713–5. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.064
98. Garzetti L, Menon R, Finardi A, Bergami A, Sica A, Martino G, et al. Activated Macrophages Release Microvesicles Containing Polarized M1 or M2 mRNAs. *J Leukocyte Biol* (2014) 95:817–25. doi: 10.1189/jlb.0913485
99. Zheng P, Luo Q, Wang W, Li J, Wang T, Wang P, et al. Tumor-Associated Macrophages-Derived Exosomes Promote the Migration of Gastric Cancer Cells by Transfer of Functional Apolipoprotein E. *Cell Death Dis* (2018) 9:434. doi: 10.1038/s41419-018-0465-5
100. Tapparo M, Bruno S, Collino F, Togliatto G, Deregibus MC, Provero P, et al. Renal Regenerative Potential of Extracellular Vesicles Derived From miRNA-Engineered Mesenchymal Stromal Cells. *IJMS* (2019) 20:2381. doi: 10.3390/ijms20102381
101. Zhou Y, Liu S, Zhao M, Wang C, Li L, Yuan Y, et al. Injectable Extracellular Vesicle-Released Self-Assembling Peptide Nanofiber Hydrogel as an Enhanced Cell-Free Therapy for Tissue Regeneration. *J Controlled Release* (2019) 316:93–104. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.11.003
102. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Advanced Drug Delivery Rev* (2016) 99:28–51. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012
103. Kooijmans SAA, Fliervoet LAL, van der Meel R, Fens MHAM, Heijnen HFG, van Bergen en Henegouwen PMP, et al. PEGylated and Targeted Extracellular Vesicles Display Enhanced Cell Specificity and Circulation Time. *J Controlled Release* (2016) 224:77–85. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.009
104. Jhunjhunwala S, Balmert SC, Raimondi G, Dons E, Nichols EE, Thomson AW, et al. Controlled Release Formulations of IL-2, TGF- $\beta$ 1 and Rapamycin for the Induction of Regulatory T Cells. *J Controlled Release* (2012) 159:78–84. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.013
105. Fisher JD, Balmert SC, Zhang W, Schweizer R, Schneider JT, Komatsu C, et al. Treg-Inducing Microparticles Promote Donor-Specific Tolerance in Experimental Vascularized Composite Allotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116:25784–9. doi: 10.1073/pnas.1910701116
106. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *IJMS* (2020) 21:6466. doi: 10.3390/ijms21186466
107. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, Fernando M, Pugh DJ, McNamara K, et al. A Comparison of the Ability of Levels of Urinary Biomarker Proteins and Exosomal mRNA to Predict Outcomes After Renal Transplantation. *PLoS One* (2014) 9:e98644. doi: 10.1371/journal.pone.0098644
108. Braun F, Rinschen M, Buchner D, Bohl K, Plagmann I, Bachurski D, et al. The Proteomic Landscape of Small Urinary Extracellular Vesicles During Kidney Transplantation. *J Extracellular Vesicles* (2020) 10. doi: 10.1002/jev2.12026
109. Sharma M, Ravichandran R, Bansal S, Bremner RM, Smith MA, Mohanakumar T. Tissue-Associated Self-Antigens Containing Exosomes: Role in Allograft Rejection. *Hum Immunol* (2018) 79:653–8. doi: 10.1016/j.humimm.2018.06.005
110. Pisitkun T, Gandolfo MT, Das S, Knepper MA, Bagnasco SM. Application of Systems Biology Principles to Protein Biomarker Discovery: Urinary Exosomal Proteome in Renal Transplantation. *Prot Clin Appl* (2012) 6:268–78. doi: 10.1002/prca.201100108
111. Jung H-Y, Lee C-H, Choi J-Y, Cho J-H, Park S-H, Kim Y-L, et al. Potential Urinary Extracellular Vesicle Protein Biomarkers of Chronic Active Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. *J Chromatogr B* (2020) 1138:121958. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121958
112. Lim J-H, Lee C-H, Kim KY, Jung H-Y, Choi J-Y, Cho J-H, et al. Novel Urinary Exosomal Biomarkers of Acute T Cell-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients: A Cross-Sectional Study. *PLoS One* (2018) 13:e0204204. doi: 10.1371/journal.pone.0204204
113. Sigdel TK, Ng YW, Lee S, Nicora CD, Qian W-J, Smith RD, et al. Perturbations in the Urinary Exosome in Transplant Rejection. *Front Med* (2015) 1. doi: 10.3389/fmed.2014.00057
114. Gunasekaran M, Xu Z, Nayak DK, Sharma M, Hachem R, Walia R, et al. Donor-Derived Exosomes With Lung Self-Antigens in Human Lung Allograft Rejection. *Am J Transplant* (2017) 17:474–84. doi: 10.1111/ajt.13915
115. Gunasekaran M, Sharma M, Hachem R, Bremner R, Smith MA, Mohanakumar T. Circulating Exosomes With Distinct Properties During Chronic Lung Allograft Rejection. *J I* (2018) 200:2535–41. doi: 10.4049/jimmunol.1701587
116. Gregson AL, Hoji A, Injean P, Poynter ST, Briones C, Palchevskiy V, et al. Altered Exosomal RNA Profiles in Bronchoalveolar Lavage From Lung Transplants With Acute Rejection. *Am J Respir Crit Care Med* (2015) 192:1490–503. doi: 10.1164/rccm.201503-0558OC

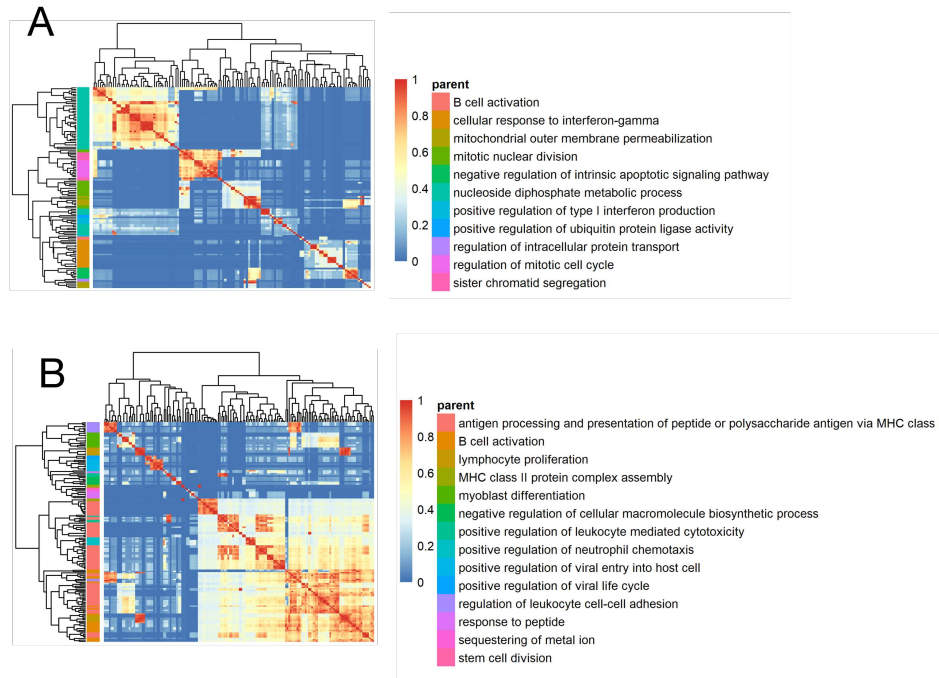
117. Castellani C, Burrello J, Fedrigo M, Burrello A, Bolis S, Di Silvestre D, et al. Circulating Extracellular Vesicles as non-Invasive Biomarker of Rejection in Heart Transplant. *J Heart Lung Transplant* (2020) 39:1136–48. doi: 10.1016/j.healun.2020.06.011
118. Kennel PJ, Saha A, Maldonado DA, Givens R, Brunjes DL, Castillero E, et al. Serum Exosomal Protein Profiling for the Non-Invasive Detection of Cardiac Allograft Rejection. *J Heart Lung Transplant* (2018) 37:409–17. doi: 10.1016/j.healun.2017.07.012
119. Vallabhajosyula P, Korutla L, Habertheuer A, Yu M, Rostami S, Yuan C-X, et al. Tissue-Specific Exosome Biomarkers for Noninvasively Monitoring Immunologic Rejection of Transplanted Tissue. *J Clin Invest* (2017) 127:1375–91. doi: 10.1172/JCI87993
120. Millard M, Posty S, Piffoux M, Jasniewski J, Lassalle H-P, Yakavets I, et al. mTHPC-Loaded Extracellular Vesicles Significantly Improve mTHPC Diffusion and Photodynamic Activity in Preclinical Models. *Pharmaceutics* (2020) 12:676. doi: 10.3390/pharmaceutics12070676
121. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhil S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes. *Nat Biotechnol* (2011) 29:341–5. doi: 10.1038/nbt.1807
122. Batrakova EV, Kim MS. Using Exosomes, Naturally-Equipped Nanocarriers, for Drug Delivery. *J Controlled Release* (2015) 219:396–405. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.030
123. Scarfe L, Taylor A, Sharkey J, Harwood R, Barrow M, Comenge J, et al. Non-Invasive Imaging Reveals Conditions That Impact Distribution and Persistence of Cells After *In Vivo* Administration. *Stem Cell Res Ther* (2018) 9:332. doi: 10.1186/s13287-018-1076-x
124. Fu W, Lei C, Liu S, Cui Y, Wang C, Qian K, et al. CAR Exosomes Derived From Effector CAR-T Cells Have Potent Antitumor Effects and Low Toxicity. *Nat Commun* (2019) 10:4355. doi: 10.1038/s41467-019-12321-3
125. Zhu X, Badawi M, Pomeroy S, Sutaria DS, Xie Z, Baek A, et al. Comprehensive Toxicity and Immunogenicity Studies Reveal Minimal Effects in Mice Following Sustained Dosing of Extracellular Vesicles Derived From HEK293T Cells. *J Extracellular Vesicles* (2017) 6:1324730. doi: 10.1080/20013078.2017.1324730
126. Saleh AF, Lázaro-Ibáñez E, Forsgard MA-M, Shatnyeva O, Osteikoetxea X, Karlsson F, et al. Extracellular Vesicles Induce Minimal Hepatotoxicity and Immunogenicity. *Nanoscale* (2019) 11:6990–7001. doi: 10.1039/C8NR08720B
127. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in Plasma Exosome Is Stable Under Different Storage Conditions. *Molecules* (2014) 19:1568–75. doi: 10.3390/molecules19021568
128. Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J* (2018) 20:1. doi: 10.1208/s12248-017-0160-y
129. Adlerz K, Patel D, Rowley J, Ng K, Ahsan T. Strategies for Scalable Manufacturing and Translation of MSC-Derived Extracellular Vesicles. *Stem Cell Res* (2020) 48:101978. doi: 10.1016/j.scr.2020.101978
130. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of Sample Collection, Isolation and Analysis Methods in Extracellular Vesicle Research. *J Extracellular Vesicles* (2013) 2:20360. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360
131. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res* (2017) 120:1632–48. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309417
132. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primal-Bengtson B, et al. Proteomic Comparison Defines Novel Markers to Characterize Heterogeneous Populations of Extracellular Vesicle Subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2016) 113:E968–77. doi: 10.1073/pnas.1521230113
133. Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim C, Mallick E, Jing Y, et al. Comprehensive Evaluation of Methods for Small Extracellular Vesicles Separation From Human Plasma, Urine and Cell Culture Medium. *J Extracellular Vesicles* (2020) 10. doi: 10.1002/jev.2.12044
134. Patton MC, Zubair H, Khan MA, Singh S, Singh AP. Hypoxia Alters the Release and Size Distribution of Extracellular Vesicles in Pancreatic Cancer Cells to Support Their Adaptive Survival. *J Cell Biochem* (2020) 121:828–39. doi: 10.1002/jcb.29328
135. Li J, Lee Y, Johansson HJ, Mäger I, Vader P, Nordin JZ, et al. Serum-Free Culture Alters the Quantity and Protein Composition of Neuroblastoma-Derived Extracellular Vesicles. *J Extracellular Vesicles* (2015) 4:26883. doi: 10.3402/jev.v4.26883
136. Colao IL, Corteling R, Bracewell D, Wall I. Manufacturing Exosomes: A Promising Therapeutic Platform. *Trends Mol Med* (2018) 24:242–56. doi: 10.1016/j.molmed.2018.01.006
137. Palviainen M, Saari H, Kärkkäinen O, Pekkinen J, Auriola S, Yliperttula M, et al. Metabolic Signature of Extracellular Vesicles Depends on the Cell Culture Conditions. *J Extracellular Vesicles* (2019) 8:1596669. doi: 10.1080/20013078.2019.1596669
138. Zhang H, Huang E, Kahwaji J, Nast CC, Li P, Mirocha J, et al. Plasma Exosomes From HLA-Sensitized Kidney Transplant Recipients Contain mRNA Transcripts Which Predict Development of Antibody-Mediated Rejection. *Transplantation* (2017) 101:2419–28. doi: 10.1097/TP.0000000000001834
139. Gunasekaran M, Bansal S, Ravichandran R, Sharma M, Perincheri S, Rodriguez F, et al. Respiratory Viral Infection in Lung Transplantation Induces Exosomes That Trigger Chronic Rejection. *J Heart Lung Transplant* (2020) 39:379–88. doi: 10.1016/j.healun.2019.12.009
140. Sharma M, Liu W, Perincheri S, Gunasekaran M, Mohanakumar T. Exosomes Expressing the Self-Antigens Myosin and Vimentin Play an Important Role in Syngeneic Cardiac Transplant Rejection Induced by Antibodies to Cardiac Myosin. *Am J Transplant* (2018) 18:1626–35. doi: 10.1111/ajt.14650
141. Hwang B, Bryers J, Mulligan MS. Potential Role of Exosome-Based Alloreognition Pathways Involved in Lung Transplant Rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2021) 161:e129–34. doi: 10.1016/j.jtcvs.2020.04.183
142. Jankowska-Gan E, Agashe VV, Lema DA, Zhou Y, Gonzalez Bosc L, Sullivan JA, et al. Donor HLA-DR Drives the Development of *De Novo* Autoimmunity Following Lung and Heart Transplantation. *Transplant Direct* (2020) 6:e607. doi: 10.1097/TXD.0000000000001062
143. Zeng F, Chen Z, Chen R, Shufesky WJ, Bandyopadhyay M, Camirand G, et al. Graft-Derived Extracellular Vesicles Transported Across Subcapsular Sinus Macrophages Elicit B Cell Alloimmunity After Transplantation. *Sci Transl Med* (2021) 13:eabb0122. doi: 10.1126/scitranslmed.abb0122
144. Silva AKA, Morille M, Piffoux M, Arumugam S, Mauduit P, Larghero J, et al. Development of Extracellular Vesicle-Based Medicinal Products: A Position Paper of the Group “Extracellular Vesicle translation to clinical perspectives – EVOLVE France”. *Advanced Drug Delivery Rev* (2021) 179:114001. doi: 10.1016/j.addr.2021.114001

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

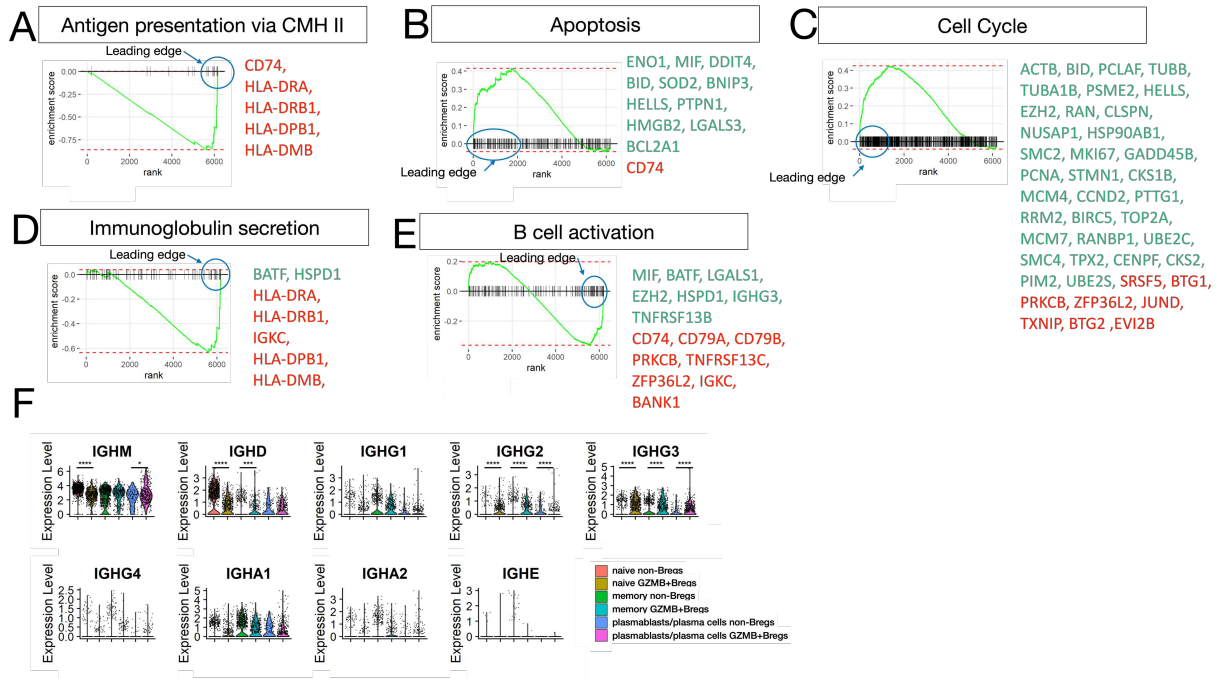
**Publisher’s Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Sailliet, Ullah, Dupuy, Silva, Gazeau, Le Mai and Brouard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

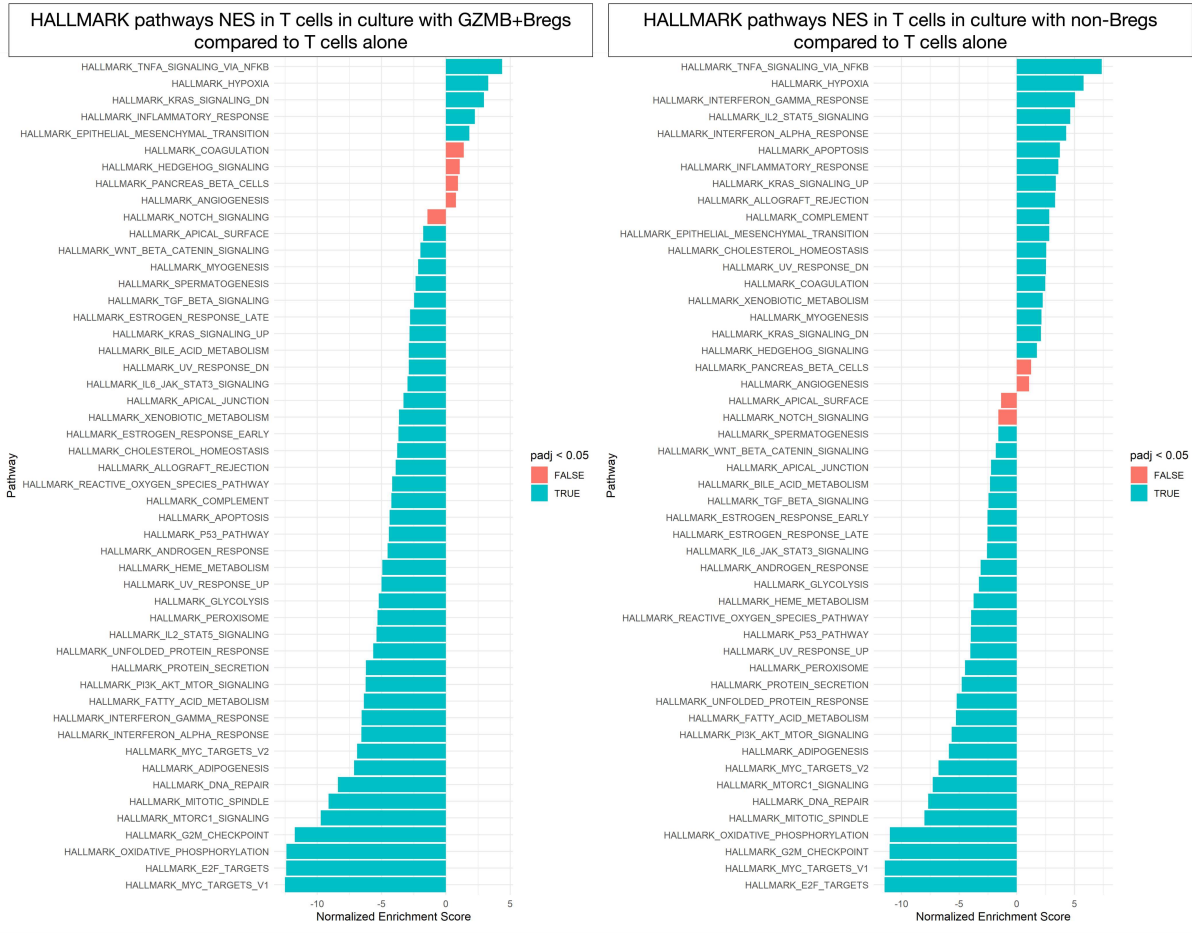
## Annexe 6 : Résultats complémentaires de la Caractérisation transcriptomique, phénotypique et fonctionnelle du lymphocyte B régulateur exprimant le granzyme B



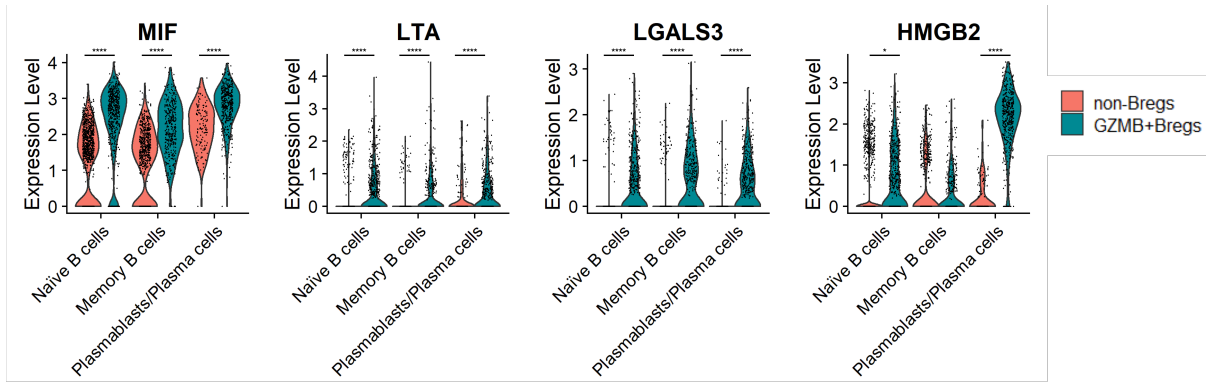
**Figure S1 : GZMB+Bregs gene ontology reduction:** Gene ontology analysis was performed on the 104 up- and 45 down-regulated DEGs. The list of terms was then reduced using the *rvvgo* package (1.8.0). Heatmaps are representing term reduction of gene ontologies associated to genes enriched (A) or repressed (B) in GZMB+Bregs vs non-Bregs, color scale represents the homology between terms before reduction.



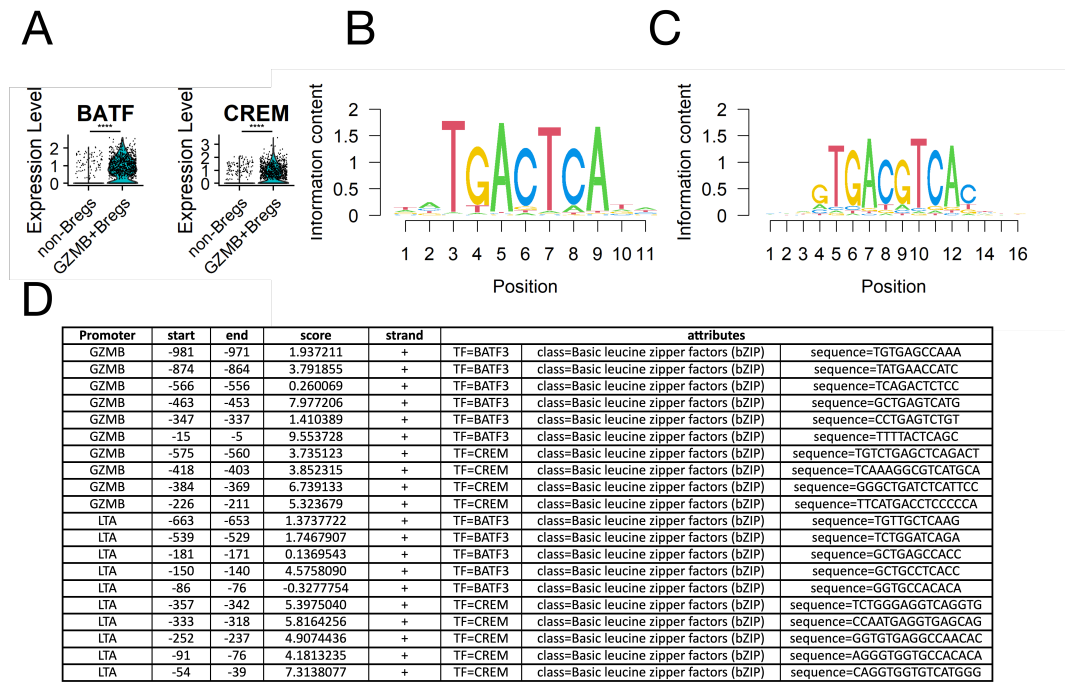
**Figure S2: Enrichment analysis of B cell functions and transcriptomic regulators:** (A-E) Graphs of GSEA enrichment with highly enriched (green) or repressed (red) contributing genes. (F) Differential expression of Ig heavy chains in Bregs versus non-Bregs.



**Figure S3: T cell differential expression by GSEA:** GSEA analysis performed with the Hallmark gene sets (H) from the Molecular Signature Database (MSigDB) in T cells between T cells in coculture with GZMB+Bregs vs T cells alone (left) and in coculture with non-Bregs vs T cells alone (right) represented as a Barplot with the Normalized enrichment score in length. Gene sets with significant adjusted p-values are colored in blue.



**Figure S4: Ligands expression among B cell population:** HMGB2, LTA, LGALS3 and MIF expression were compared between non-Bregs and GZMB+Bregs in plasmablasts, naive and memory B cells. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).



**Figure S5: sequence and sites of fixation for BATF and CREM:** (A) Violin plots for the two transcription factors BATF and CREM. (B-C) The consensus binding sequences for BATF (A) and CREM (B). Size of the letters are corresponding to the probability of getting the given nucleotide at that position. (C) Promoter sequences (0 to -1000 pb) of LTA and GZMB were fetched and scanned using the TFBSTools package to highlight patterns of BATF and CREM with a threshold of 70% of homology with their binding sequences. Differences were defined as statistically significant when  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) and  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).



**Titre :** Caractérisation transcriptionnelle phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B GZMB+ dans le sang des volontaires sains / développement de tests immunologiques pour mesurer l'impact des voies JAK dans la dermatite atopique

**Mots clés :** Tolérance opérationnelle, Lymphocytes B régulateurs, Granzyme B, inhibiteurs de JAK, dermatite atopique

**Résumé :** Les lymphocytes B régulateurs sont une population hautement hétérogène qui a montré son efficacité à supprimer les mécanismes effecteurs du système immunitaire. Dans la première partie de cette thèse nous allons étudier la population de lymphocytes B régulateurs mis en évidence chez les patients transplantés rénaux opérationnellement tolérants, les lymphocytes B régulateurs exprimant le granzyme B en comparant le transcriptome, le phénotype et la fonction de lymphocytes B après induction de granzyme B et d'une fonction régulatrice à des lymphocytes B non régulateurs, n'exprimant pas le granzyme B. Nous avons pu mettre en évidence le rôle de la lymphotoxine alpha dans la biologie de ces cellules, où l'inhibition de cette cytokine par le Pateclizumab

diminue l'expression de granzyme B et réduit leur fonction suppressive.

L'inflammation de type 2 et l'expression de cytokines hautement inflammatoires et pruriteuses tels que l'IL-13 et l'IL-33 sont hautement pathogéniques dans la dermatite atopique et les traitements anti-JAK ciblant ces voies cytokiniques de façon non spécifique ont montré leur efficacité chez des patients ne répondant pas aux traitements conventionnels. Dans la seconde partie de cette thèse, nous évoquerons la caractérisation fonctionnelle et phénotypique des cellules immunitaires circulantes de patients atteints de dermatite modérée à sévère, et le développement de tests immunologiques pour caractériser l'impact des inhibiteurs de JAK dans ce contexte pathologique.

**Title :** Transcriptional, Phenotypic and functional transcriptional characterization of GZMB+ B cells in the blood of healthy volunteers / development of immunoassays to measure the impact of JAK pathways in atopic dermatitis

**Keywords:** Operational tolerance, regulatory B cell, granzyme B, Jak inhibitors, atopic dermatitis

**Abstract:** Regulatory B cells are a highly heterogeneous population that has been shown to suppress immune effector functions. In the first part of this thesis, we will study the population of regulatory B lymphocytes found in operationally tolerant kidney transplant patients, the regulatory B lymphocytes expressing granzyme B by comparing the transcriptome, phenotype and function of B cells after induction of granzyme B and regulatory function to non-regulatory B cells, not expressing granzyme B. We were able to demonstrate the role of lymphotoxin alpha in the biology of these cells, where inhibition of this cytokine by Pateclizumab decreases granzyme B expression and reduces their suppressive function.

Type 2 inflammation and the expression of highly inflammatory and pruritic cytokines such as IL-13 and IL-33 are highly pathogenic in atopic dermatitis and anti-JAK therapies targeting these cytokine pathways in a non-specific manner have shown efficacy in patients not responding to conventional treatments. In the second part of this thesis, we will discuss the functional and phenotypic characterization of circulating immune cells from patients with moderate to severe dermatitis, and the development of immunological assays to characterize the impact of JAK inhibitors in this pathological context.